

**Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique.**

République du Mali
Un Peuple—Un But—Une Foi

**Université des Sciences des Techniques
Et des Technologies de Bamako (USTTB)**

Faculté de Pharmacie (F.P)

Année Universitaire 2011 – 2012 Thèse N°...../P

TITRE

**CONTRIBUTION À L'ASSURANCE QUALITÉ DANS LE
DIAGNOSTIC DES SALMONELLOSES MAJEURES AU
LABORATOIRE D'ANALYSES BIOMÉDICALES
DU CHU GABRIEL TOURE**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le __/__/ 2012 devant la Faculté de Pharmacie (F.P.)

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

Par

M. Allaye TRAORE

JURY

Président

Professeur Soukalo DAO

Membres

M. Seydou S. DIARRA

Docteur Samba A. SANGARE

Co- directeur de thèse

Professeur Souleymane DIALLO

Directeur de thèse

Professeur Flabou BOUGOUDOGO

DEDICACES ET REMERCIEMENTS

Je remercie :

Dieu, le Tout Puissant le Clément et le Miséricordieux.

Par ta bonté et ta grâce, tu m'as permis de mener à terme ce travail si long et pénible. Fasse que je me souvienne toujours de toi en toute circonstance, à chaque instant du reste de ma vie.

Son PROPHETE MOHAMED paix et salut sur LUI.

Je dédie ce travail :

➤ **A la mémoire de Amadou TRAORE dit AT (dors en paix « Papa ») !**

Excuses-moi de te déranger dans ton sommeil profond. Qu'ALLAH le Tout Puissant t'accorde sa grâce et t'accueille dans son Paradis Amen ! Je ne sais pas comment te remercier. La bonté de ton cœur et ta bienveillance ne quitteront jamais mon esprit. Tu n'as jamais cessé de croire que je pouvais devenir ce que je suis aujourd'hui. Reçois ici l'expression de ma profonde gratitude.

➤ **A ma très chère grand-mère :**

Adama DEMBELE dite Anna. Merci pour ton affection, ton soutien moral et tes bénédictions. Je ne saurai quels mots utilisés pour exprimer toute ma satisfaction à ton égard. Que Dieu te garde très longtemps parmi nous. Amen !

➤ **A mon père**

Karamogo dit Oumar TRORE surnommé « BABY »

Merci pour ta très grande contribution, ton soutien et tes conseils qui m'ont été d'une très grande utilité. Grâce à toi je n'ai jamais manqué de quoi que ce soit depuis les bas âges jusqu'au jour d'aujourd'hui. Je m'excuse pour les erreurs de jeunesse et prie Dieu de m'accorder la force et la foi de veiller sur toi et t'obéir toute la vie. Ce travail est également le tien. Puisse, Dieu t'accompagner dans tout ce que tu fais, qu'il protège toute la famille.

Merci pour tout, Baba.

➤ **A ma mère**

Madame TRAORE Djéréto MAIGA

Ton amour, ta grande estime, tes encouragements et surtout ta rigueur par rapport à l'éducation de tes enfants m'ont donné la force de persévérer dans les études. Ce travail t'honore et est le fruit de tes sages conseils. Reçois ici mes sincères remerciements.

➤ **A mes tantes**

Oumou, Fanta et Nia MAIGA, Dicko CISSE, Coumba, Dédé, Ami et Aminata TRAORE, Ada TAPILY

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

➤ **A mes oncles**

Cheick Oumar SOUMANO, Moctar MAIGA, Macky TRAORE.

Je n'ai aucune expression pour traduire mes sentiments à votre égard. Vos encouragements et votre rigueur dans le travail m'ont fait ce que je suis et ce que je deviendrais. Trouvez alors dans ce travail le fruit des efforts que vous avez consentis à mon égard. Ce travail est le vôtre. Courage et bonne chance. Que le Tout Puissant vous prête longue vie, Amen !

➤ **A mes frères**

Hamadoun et Abdoulaye TRAORE, Fousseyni SOUMANO

Pour votre amour, vos encouragements constants, vos soutiens financiers ainsi que vos prières et bénédictions. Ce travail est le modeste témoignage de toute mon affection et de ma profonde reconnaissance. Que Dieu le Tout Puissant vous garde encore très longtemps auprès de nous. Amen!

➤ **A mes frères et sœurs**

Abdoulaye dit Bassi, Adama, Daouda dit Vieux, Mouminatou dite Coumba, Issa, Boubacar dit Boubiss et Kassim dit Castel TRAORE, Aya MAIGA et Abdoulaye MAIGA dit Mobo.

« Que pourrais-je dire, que pourrais-je faire pour montrer que je vous aime ? »

Encore merci et restons unis pour la vie.

➤ **A mes amis et frères**

Cissé, Dogomo, Boucar, Sadio, Vieux Type, Saint Boura, Baba dit usine. Je ne saurais oublier ce lien d'amitié de fraternité et de grande complicité qui nous unis.

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

➤ **A mes cousins et cousines**

Bassi, Bouba, Acky, Djeneba, Sory, Oumar, Disco, Oussou, Fantiss, Macou et Anna TRAORE, Mamou bongo, Méné, Faty, Assa chef, Inako, Sadio, Ramata, Mah, Ina, Papou, Tonton, Ballack, Sekou, Mohamed, Baya, Moctar, Djougou, Ti, Tonton Soumano, Fatim dite Joli et tous les autres ainsi que toutes vos familles.

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

➤ **A tous mes amis chers**

D'enfance, du fondamental, du lycée et tous les autres.

Comme on a l'habitude de le dire: « c'est dans les moments difficiles qu'on reconnaît ses amis ». Sachez qu'en aucun instant je n'ai regretté votre compagnie. Merci pour votre affection et pour votre sincère fidélité. Que Dieu renforce davantage ce lien si sacré qui nous unit.

➤ **A mes camarades de promotion de la FMPOS**

Ensemble on a su regrouper nos forces afin de s'aider mutuellement pour franchir les différents obstacles de la vie estudiantine. Je vous dis encore merci pour votre courage et votre persévérance et surtout pour vos soutiens dans les peines partagées.

➤ **A mes enseignants des premier et second cycles, du lycée et de la FMPOS**

Vous n'avez jamais hésité à transmettre à vos élèves et étudiants tout le nécessaire de connaissance. Votre estime particulière et votre accompagnement pendant tout le trajet m'ont permis d'arriver au niveau où je suis aujourd'hui. Ce travail n'est que la somme de vos efforts. Trouvez ici toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

➤ **A mes aînés et à mes camarades de promotion du laboratoire du CHU Gabriel TOURE**

Drs Ténin Samaké, Cheick Fanta Mady Diabaté, Samba A Sangaré, Mahamadou O. Maïga, Boubacar O. Cissé, Maimouna Goro, Mohamed Z. Dembélé, Abdoul Aziz Maïga, Koumba Diallo, Ousmane Traoré, Youssouf Tembiné, Blaise Ky, Mariam Koné, Sarmoye Traoré, Fatoumata Daou ...

Issaka Touré, Aminata Coulibaly, Hammadoun Maïga...

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

➤ **A tout le personnel du laboratoire du CHU Gabriel Touré**
Au Professeur :

- Colonel Souleymane Diallo

Aux Docteurs :

- Samba Adama Sangaré
- Cheik Fanta Mady Diabaté
- Tenin Samaké.

A Messieurs :

- Youssouf Touré
- Amadou Keïta
- Abraham Poudiougou

A Madames :

- Konaté
- Sangaré
- Traoré
- Soumaoro
- Sidibé
- Koné
- Sanogo

Merci pour votre disponibilité. Trouvez ici ma profonde reconnaissance.

➤ **A tous les Internes du Laboratoire du CHU Gabriel Touré**

Toute ma reconnaissance pour l'estime et le respect que vous avez manifestés à mon égard. Merci pour vos conseils et vos encouragements.

➤ **A tous ceux dont je n'ai pu citer le nom : sachez que je vous porte tous dans mon cœur et merci.**

HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY

À NOTRE MAÎTRE ET PRÉSIDENT DU JURY,

Professeur Soukalo DAO,

**Maître de Conférences à la Faculté de Médecine, de Pharmacie
et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS) ;**

**Président de la Société Malienne de Pathologie infectieuse
(SOMAPiT) ;**

**Membre de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue
française (SPILF) ;**

**Investigateur Clinique au Centre de Recherche et de la
Formation sur la tuberculose /VIH.**

Homme de grandes qualités scientifiques, nous avons été séduits
par la simplicité, la clarté et la rigueur de vos enseignements ;

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

Nous vous exprimons cher Maître, toute notre reconnaissance.

À NOTRE MAÎTRE ET JUGE,

M. Seydou S. DIARRA,

Spécialiste en microbiologie ;

Chef de service de bactériologie à l'INRSP ;

**Maître chargé de l'enseignement de la bactériologie à l'institut
de formation des techniciens de laboratoire.**

Cher Maître, vous nous faites un grand honneur en acceptant de siéger dans ce jury malgré vos multiples occupations. Votre simplicité, votre modestie et votre rigueur dans la recherche scientifique font de vous un homme respecté et admirable.

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

À NOTRE MAÎTRE ET JUGE,

Docteur Samba Adama SANGARE,

**Pharmacien chercheur au laboratoire de bactériologie CVD -
Mali (Centre pour le Développement des Vaccins - Mali) du
CHU Gabriel Touré ;**

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

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

Votre simplicité, votre sérénité, votre disponibilité, et votre esprit
communicatif font de vous un Maître admiré de tous.

Soyez rassuré, cher Maître de notre profond attachement aux
valeurs qui vous sont chères tels que le travail bien fait et le
courage;

Veillez trouver ici notre profond respect et nos sincères
remerciements.

À NOTRE MAÎTRE ET CO- DIRECTEUR DE THÈSE,

Professeur Souleymane DIALLO,

Pharmacien biologiste, Colonel des Forces Armées du Mali ;

**Chef du département médico-technique du CHU Gabriel
TOURÉ ;**

**Directeur Général du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux
du Mali ;**

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

Cher Maître, nous ne cesserons jamais de vous remercier pour la confiance que vous avez placée en nous pour effectuer ce travail. Les mots nous manquent pour exprimer combien cela fut un plaisir de travailler avec vous. Homme de principe, votre simplicité, votre sérénité, votre disponibilité et votre rigueur scientifique font de vous un Maître exemplaire et reconnu de tous.

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

À NOTRE MAÎTRE ET DIRECTEUR DE THÈSE,

Professeur Flabou BOUGOUDOGO,

**Maître de conférences agrégé en Bactériologie et Virologie à la
Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie
(FMPOS);**

**Directeur général de l'Institut National de Recherche en Santé
Publique ;**

**Responsable des cours de bactériologie et virologie à la
Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie
(FMPOS) ;**

Chevalier de l'ordre de mérite de la santé.

Cher Maître, nous vous sommes infiniment reconnaissants d'avoir
accepté de diriger cette thèse.

Vous nous avez toujours montré un grand intérêt pour tout ce qui
touche à notre formation.

Homme de principe, votre rigueur scientifique fait de vous un
Maître exemplaire et reconnu de tous.

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

SIGLES ET ABRÉVIATIONS.

AQ : Assurance de la Qualité.

ATCC: American Type Culture Collection.

CHU : Centre Hospitalier Universitaire.

CQ : Contrôle de Qualité.

CQE : Contrôle de qualité externe.

CQI : Contrôle de qualité interne.

DPM : Direction de la Pharmacie et du Médicament.

EDTA : Acide Ethylène Diamino Tétracétique.

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay.

EPH : Etablissements Publics à caractère Hospitalier.

EQ : Évaluation de la Qualité.

GBEA : Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale.

INRSP : Institut national de Recherche en Santé Publique.

MON : Modes Opératoires Normalisés.

NCTC : National Collection of Type Cultures.

SOPs: Standard Operating Procedures.

SS: *Salmonella- Shigella*.

PLAN

1. INTRODUCTION.
2. GÉNÉRALITÉS.
3. MÉTHODOLOGIE.
4. RÉSULTATS.
5. COMMENTAIRES ET DISCUSSION.
6. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.
7. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.
8. ANNEXES.

TABLE DES MATIERES.

1. INTRODUCTION.....	1
1.1. OBJECTIF GENERAL.....	2
1.2. OBJECTIFS SPECIFIQUES.....	2
2. GÉNÉRALITÉS	3
2.1. Assurance qualité.....	3
2.1.1. Règles de fonctionnement du laboratoire d'analyses biomédicales.....	3
2.1.2. Exécution des analyses.....	12
2.1.3. Mise en place de l'Assurance Qualité.....	18
2.1.4. Documentation du laboratoire.....	21
2.2. Les salmonelloses majeures.....	23
2.2.1. Définition et systématique.....	23
2.2.2. Caractères bactériologiques.....	24
2.2.3. Diagnostic biologique.....	31
2.2.4. Traitement - Prophylaxie.....	37
3. METHODOLOGIE.....	40
3.1. Cadre d'étude.....	40
3.1.1. Historique.....	40
3.1.2. Organisation.	40
3.1.3. Laboratoire.....	40
3.2. Population d'étude	42
3.3. Type d'étude.....	42
3.4. Critères d'inclusion et de non inclusion.....	42
3.4.1. Critères d'inclusion.	42
3.4.2. Critères de non inclusion.....	42

3.5. Aspects éthiques.....	42
3.5.1. Confidentialité.....	42
3.5.2. Consentement éclairé.....	43
3.5.3. Risques liés à l'étude.....	43
3.5.4. Respect des références bibliographiques.....	43
3.6. Echantillonnage.....	43
3.6.1. Méthode et techniques d'échantillonnage.	43
3.6.2. Taille de l'échantillon.....	43
3.6.3. Variables étudiées.....	43
3.6.4. Collecte des données.....	43
3.6.5. Saisie et analyse des données.....	44
3.7. Conditions de sécurité au laboratoire.....	44
3.8. Optimisation des conditions opératoires.....	45
3.9. Méthodes de laboratoire.....	45
3.9.1. Méthodes indirectes: Sérodiagnostic de Widal et Félix.....	48
3.9.2. Méthodes directes : Hémoculture et coproculture.....	53
4. RESULTATS.....	82
4.1. Résultat d'évaluation du laboratoire.....	82
4.2. Nombre de tests effectués au laboratoire.....	89
5. COMMENTAIRES ET DISCUSSION.....	93
5.1. Du point de vue de la méthode.....	94
5.1.1. Contraintes techniques.....	94
5.2. Les données sociodémographiques.....	95
5.2.1. Age	95
5.2.2. Sexe.....	95
5.3. Du point de vue des résultats.....	95
5.3.1. Résultat de l'évaluation du laboratoire.....	95
5.3.2. Résultat du sérodiagnostic.....	95

5.3.3. Résultat du sérodiagnostic par rapport au sexe.....	96
5.3.4. Résultat du sérodiagnostic par à l'âge.....	96
5.3.5. Enregistrement.....	96
6. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	99
7. BIBLIOGRAPHIE.....	100
8. ANNEXES.....	103
8.1. Annexe 1. Prélèvements sanguins.....	103
8.2. Annexe 2. Durée et température de conservation après analyse de certains échantillons biologiques en fonction des examens demandés.....	107
8.3. Annexe 3. Définition des termes.....	108
8.4. Annexe 4. Chronogramme des activités.....	113

LISTE DES FIGURES.

Figure n°1 : Les <i>Salmonella</i> vues au microscope électronique...	24
Figure n°2 : Aspect de la gélose SS après la culture.....	26
Figure n°3 : Présentation de la gélose Hektoen après la culture.....	28
Figure n°4 : Evolution du titre des agglutinines des anticorps au cours des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes.....	35
Figure n°5: Agglutination par dilution dans un tube.....	51
Figure n°6 : Agglutination sur lame.....	51
Figure n°7 : flacon BD Bactec TM PEDS PLUS /F.....	55
Figure n°8 : BACTEC 9050.....	55
Figure n°9 : Milieu sélectif d'enrichissement pour la recherche des Salmonelles.....	79
Figure n°10 : Milieu sélectif pour l'isolement des bacilles Gram négatif <i>Salmonella</i> et <i>Shigella</i> ainsi que des bactéries coliformes dans les eaux, les produits alimentaires, les produits pharmaceutiques et biologiques.....	80
Figure n°11 : Gélose <i>Salmonella- Shigella</i> milieu sélectif permettant l'isolement d'entérobactéries pathogènes.....	81
Figure n°12 : Répartition des patients en fonction du sexe.....	90
Figure n°13 : Répartition des patients selon le résultat.....	90

LISTE DES TABLEAUX.

Tableau I : Caractères des souches de Salmonella Typiques, des Salmonella fermentant le lactose sur les milieux de culture.....	32
Tableau II : Exemple d'interprétation du sérodiagnostic de Widal et Félix.....	36
Tableau III : Présentation d'un flacon de 50ml de réactifs.....	49
Tableau IV : Évaluation des conditions du bâtiment, fluides et généralités.....	82
Tableau V : Évaluation de la biosécurité et de l'hygiène du laboratoire.....	83
Tableau VI : Évaluation des prélèvements et de l'hygiène.....	84
Tableau VII : Quantité minimum des équipements présents dans le laboratoire de sérologie (GBEA MALI).....	85
Tableau VIII : Évaluation des réactifs et approvisionnement.....	86
Tableau IX : Évaluation de la qualité totale.....	87
Tableau X : Récapitulatif de tous les paramètres étudiés avec les appréciations.....	88
Tableau XI : Répartition des patients en fonction de l'âge.....	89
Tableau XII : Fréquence des demandes d'examen de Sérodiagnostic de Widal et Félix pendant la période d'étude.....	91
Tableau XIII : Répartition des résultats en fonction des tranches d'âge.....	92
Tableau XIV : Répartition des résultats en fonction du sexe.....	92
Tableau XV : Durée et température de conservation après analyse de certains échantillons biologiques en fonction des examens demandés.....	107

Tableau XVI : Chronogramme des activités pour l'élaboration de la
thèse.....113

1. INTRODUCTION.

Le laboratoire d'analyses médicales joue un rôle essentiel dans l'amélioration de la qualité des soins, le suivi des malades et la surveillance des maladies. Malheureusement, dans beaucoup de pays en voie de développement, il est vu comme un appendice accessoire du système de santé ; dans le secteur public, il est souvent considéré comme un simple consommateur de budget et donc négligé. Son rôle d'appui à la clinique est insuffisamment connu et exploité.

Au Mali, le Ministère de la Santé a entrepris depuis 1996 un vaste programme de développement sanitaire afin de donner aux populations, un niveau de santé qui leur permet de mener une vie socialement et économiquement productive. L'objectif principal de ce programme était de garantir la viabilité du système de santé et la qualité des prestations. [1]

Conscient du rôle du laboratoire dans l'atteinte de cet objectif, le Ministère de la Santé a confié à la Direction de la Pharmacie et du Médicament (DPM) la mission d'«assurer la disponibilité et la qualité des analyses de biologie médicale par niveau de soins ».

L'acte de biologie médicale s'inscrit dans une démarche préventive, diagnostique, pronostique et thérapeutique. Le biologiste ou le responsable de laboratoire assure la responsabilité de cet acte qui inclut le prélèvement, l'exécution de l'analyse, la validation des résultats, et si nécessaire leur confrontation avec les données cliniques et biologiques des patients. Il participe par ses commentaires, le cas échéant, à l'interprétation des résultats de l'analyse de biologie médicale. Ces résultats concourent au diagnostic et à la prescription des soins. C'est pourquoi la recherche de la qualité doit être la préoccupation essentielle et constante du biologiste et de l'ensemble du personnel du laboratoire. La bonne exécution des analyses de biologie médicale est une des conditions déterminantes de cette qualité. [1]

Il est donc essentiel d'appliquer cette qualité au diagnostic des infections par les salmonelloses majeures. C'est pourquoi nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

1.1. OBJECTIF GENERAL.

Contribuer à l'Assurance Qualité dans le diagnostic des salmonelloses majeures au laboratoire d'analyses biomédicales du CHU Gabriel TOURE.

1.2. OBJECTIFS SPECIFIQUES.

- Évaluer la mise en œuvre de l'Assurance Qualité dans le domaine de la biologie médicale ;
- Décrire le diagnostic des salmonelloses majeures;
- Analyser les résultats de 2009 à 2010.

2. GÉNÉRALITÉS :

2.1. Assurance qualité.

2.1.1. Règles de fonctionnement du laboratoire d'analyses biomédicales.

2.1.1.1. Organisation.

Tout laboratoire réalisant des analyses de biologie médicale doit disposer d'un système d'assurance de qualité fondé sur des procédures et des modes opératoires écrits concernant les différentes étapes de l'analyse et les conditions de son exécution.

La qualité de l'analyse dépend de l'organisation générale du laboratoire, de la qualification et de la motivation du personnel ainsi que du respect des procédures opératoires lors des différentes étapes de l'exécution des examens : pré-analytique, analytique et post-analytique.

Un système d'assurance de qualité doit être permanent et doit conserver une trace des contrôles effectués et de l'efficacité des actions correctives. Sans cette traçabilité, il est difficile, et parfois impossible, de retrouver une erreur et/ou d'en analyser les causes pour en éviter la répétition.

L'assurance de qualité des différents services ou unités d'un établissement de santé doit avoir le même objectif. [1]

➤ Responsabilités de l'administration

Pour assurer la fonctionnalité d'un laboratoire de biologie médicale et la qualité des analyses, l'administration doit en collaboration avec le biologiste ou le responsable du laboratoire réunir les préalables suivants :

- mettre à disposition des locaux appropriés ;
- mettre à disposition les équipements nécessaires (appareils, fournitures de bureau, outils informatiques...) ;
- recruter les ressources humaines qualifiées et compétentes ;
- mettre en place un système d'approvisionnement fonctionnel en réactifs, consommables et petits matériels ;
- planifier la formation continue du personnel et sa participation aux congrès, colloques, séminaires nationaux et internationaux;
- mettre en place un mécanisme efficace de motivation du personnel ;

- créer un système d'information et de communication à l'interne et externe (téléphone, fax, Internet...) ;
- prendre les dispositions pour intégrer le laboratoire dans un réseau de contrôle de qualité.

L'ensemble du personnel de l'Etablissement Sanitaire doit être impliqué dans le système d'assurance de qualité qui est placé sous l'autorité et la responsabilité du directeur de l'établissement. [2]

➤ **Obligations des responsables du laboratoire**

● **Concernant le personnel :**

- établir un organigramme du laboratoire ;
- s'assurer que le personnel est apte aux tâches qui lui sont confiées et assurer la formation nécessaire à cet effet ;
- s'assurer que chaque opération réalisée au laboratoire est confiée à une personne présentant la qualification, la formation et l'expérience appropriées ;
- mettre à la disposition du personnel les procédures et modes opératoires ;
- informer le personnel de la mise en place de toute nouvelle procédure et mode opératoire et de leur(s) modification(s) ultérieure(s) éventuelle(s). [3]

● **Concernant les procédures :**

- s'assurer que les procédures en vigueur, écrites, vérifiées, approuvées et datées, sont mises en œuvre par le personnel ;
- s'assurer que toute modification justifiée de procédure est écrite, approuvée, enregistrée, datée, communiquée et que le personnel est formé à l'application de cette modification ;
- s'assurer que toute modification de procédure susceptible de changer le libellé ou la remise des résultats entraîne l'information du prescripteur sur les comptes rendus d'analyses afin d'éviter des interprétations erronées ;
- conserver un fichier chronologique de toutes les procédures ;
- veiller à la réalisation, par un personnel qualifié et compétent, de l'exécution du programme d'assurance de qualité défini par le guide ;
- procéder, en cas de dysfonctionnement révélé par les contrôles de qualité, à toutes les opérations susceptibles de corriger les anomalies et s'assurer de l'enregistrement des mesures correctives entreprises et évaluer leurs résultats ;
- s'assurer de la gestion des archives.
-

- **Concernant les installations, l'équipement, l'instrumentation, les produits fongibles et les réactifs:**
 - s'assurer que les installations, l'équipement et l'instrumentation du laboratoire sont fonctionnels ;
 - s'assurer que les produits fongibles sont appropriés ;
 - s'assurer que les réactifs sont disponibles, non périmés, conservés dans les conditions définies par le fabricant et conformes à la réglementation en vigueur ;
 - s'assurer que les installations, l'équipement, les produits fongibles et les réactifs utilisés sont adaptés à l'évolution des connaissances scientifiques et des données techniques ;
 - s'assurer que les logiciels utilisés, soit pour le fonctionnement des appareils, soit pour l'aide à l'interprétation des résultats, sont protégés de toute intrusion non autorisée et adaptés à l'évolution des connaissances scientifiques et des données techniques.
- **Concernant la sécurité du personnel :**
 - S'assurer que les mesures concernant la santé, la sécurité du personnel et la protection de l'environnement, notamment l'interdiction de fumer et l'interdiction d'introduire, de conserver et de consommer des denrées alimentaires dans les locaux de prélèvement, de réception des prélèvements et d'analyses, sont appliquées conformément aux textes en vigueur et, le cas échéant, en coordination avec le médecin du travail et le comité d'hygiène, de sécurité et des conditions de travail ;
 - Établir et mettre en œuvre les procédures applicables relatives à l'hygiène et à la sécurité du personnel, par exemple : utilisation de gants, de verres protecteurs, changement de blouses et utilisation de sur-blouses, interdiction de porter à la bouche des pipettes lors de l'aspiration de liquides, non recapuchonnage des aiguilles après prélèvement, utilisation de hottes lors de la manipulation de produits dangereux et/ou contaminants, nettoyage des plans de travail et des appareillages avec respect des durées d'action des désinfectants et des décontaminants ;
 - s'assurer du respect des mesures techniques de prévention pour les travailleurs en fonction de la toxicité des produits employés et de la classification des germes;
 - s'assurer de l'élimination des déchets : manipuler, conserver et éliminer les déchets en prenant toutes les précautions nécessaires pour éviter les contaminations. [3]

➤ **Obligations du personnel de laboratoire**

Le personnel doit se conformer à toutes les procédures et modes opératoires en vigueur dans le laboratoire. Le personnel a l'obligation d'appliquer les prescriptions du guide de bonne exécution des examens et doit tenir compte de ses recommandations.

➤ **Compte rendu d'analyse**

Le biologiste ou le responsable du laboratoire doit, en accord avec les dispositions réglementaires :

- Valider les résultats des examens biologiques après s'être assuré que leur exécution est conforme aux recommandations du guide;
- signer les comptes rendus d'analyses ;
- s'assurer que leur transmission se fait dans les délais compatibles avec leur bonne utilisation clinique et dans des conditions de confidentialité préservant le secret professionnel [1].

2.1.1.2. Locaux.

➤ **Aménagement, accessibilité et entretien.**

Les dimensions, la construction et la localisation du laboratoire doivent être conformes à des normes :

- un local de réception ;
- un bureau ;
- un secrétariat et archives ;
- deux salles de prélèvement ;
- des salles affectées aux activités techniques du laboratoire ;
- des toilettes.

Le bâtiment abritant le laboratoire doit être séparé de ceux des autres structures, et facile d'accès.

Les zones de stockage des matières premières et/ou des réactifs toxiques ou potentiellement dangereux ou contaminants doivent être séparées.

Le nettoyage du matériel et le tri des déchets doivent se faire dans des conditions de sécurité pour le personnel et pour la qualité des analyses. [2]

➤ **Sécurité**

Pour des raisons de sécurité des personnes, d'intégrité des processus et de confidentialité, l'accès des locaux est réservé aux utilisateurs autorisés. Les mouvements des visiteurs et intervenants extérieurs sont strictement limités.

Les locaux sont équipés de dispositifs de protection contre le feu, d'alarme et d'extinction suffisants et bien répartis. Ils peuvent être évacués rapidement.

Les risques chimiques, microbiologiques ou radioactifs sont confinés.

2.1.1.3. Équipements.

Un laboratoire réalisant des analyses de biologie médicale doit disposer du matériel adéquat et doit s'équiper de tout le matériel nécessaire en fonction des analyses, y compris les analyses d'urgence qu'il déclare effectuer.

Le biologiste doit s'assurer du respect des modalités d'installation, de fonctionnement et d'entretien préconisées dans la notice du fabricant des matériels et des automates présents dans le laboratoire. [1]

➤ **Équipements de base**

L'équipement de base recommandé pour un laboratoire réalisant des analyses de biologie médicale est le suivant :

- un microscope pourvu des accessoires indispensables à l'exécution des actes pratiqués par le laboratoire ;
- une centrifugeuse adaptée aux examens pratiqués avec ses accessoires et permettant d'obtenir au fond des tubes une accélération comprise entre 500 et 2500 g ;
- un spectrophotomètre disposant d'une gamme spectrale comprise entre 340 et 700 nm ; l'appareil doit comporter un dispositif de régulation thermique des cuves ;
- une balance permettant d'apprécier le milligramme ;
- une étuve à température réglable jusqu'à 120°C ;
- un bain-marie à température réglable jusqu'à 70°C ;
- un réfrigérateur à 2-8°C ;
- un congélateur permettant d'obtenir une température égale ou inférieure à -18°C ;
- le petit matériel permettant de mesurer avec précision les volumes et la verrerie courante ;

- un autoclave ;
- un agitateur de Kline ;
- des bacs de coloration ;
- un générateur d'eau distillée ou désionisée.
- un dispositif de gestion des déchets biomédicaux ou la possibilité d'accès à ce dispositif.

Ce matériel doit être maintenu en permanence en bon état de fonctionnement. [3]

➤ **Équipements par spécialités.**

Le matériel ci-dessus cité doit être complété, dans certains cas, par un équipement spécifique :

• **Pour les laboratoires autorisés à pratiquer les examens relevant de la biochimie :**

- un dispositif permettant le dosage du sodium et du potassium ;
- un dispositif d'électrophorèse permettant l'étude qualitative et quantitative des protéines et des lipoprotéines pour les laboratoires pratiquant ces analyses ;
- un dispositif permettant l'application des méthodes immunochimiques ;
- un dispositif permettant le dosage des gaz du sang et la détermination du pH sanguin pour les laboratoires pratiquant des analyses pour des établissements de santé si ces déterminations ne sont pas effectuées par les établissements eux-mêmes.

Ces dispositifs peuvent être inclus dans des automates prévus à cet effet. [1]

• **Pour les laboratoires autorisés à pratiquer les examens relevant de la microbiologie (bactériologie et virologie, de la mycologie et de la parasitologie) :**

- un dispositif permettant la centrifugation en nacelles étanches;
- deux étuves à températures réglables, dont une à CO₂ ;
- un dispositif permettant de produire et d'entretenir une atmosphère appauvrie en oxygène et/ou enrichie en dioxyde de carbone dans une enceinte appropriée;
- pour les laboratoires pratiquant l'identification et, le cas échéant, les antibiogrammes des agents infectieux (mycobactéries, *chlamydiae* et certains virus) une hotte de confinement doit être adaptée;
- un congélateur à -80°C et un microscope inversé pour les laboratoires pratiquant les cultures virales;

- un micromètre oculaire étalonné pour la parasitologie ;
- une lampe de Wood, des curettes...
- **Pour les laboratoires autorisés à pratiquer les examens relevant de l'hématologie clinique et biologique (cytologie sanguine et hémostase)**
 - un congélateur à -30°C ou un congélateur à -20°C selon les exigences des examens pratiqués;
 - un dispositif permettant le comptage des éléments figurés dans le sang (y compris les cytomètres de flux, des pipettes de dilution appropriées et des cellules à numération) ;
 - un dispositif permettant la coloration des lames ;
 - un dispositif permettant la détermination de l'hématocrite ;
 - un dispositif permettant la mesure de la vitesse de sédimentation des hématies;
 - deux chronomètres permettant de mesurer des temps compris entre zéro et trente minutes avec une précision au moins égale à la seconde ;
 - un dispositif permettant la mesure du temps de saignement ;
 - un dispositif permettant les examens en hémostase ;
 - un dispositif permettant l'électrophorèse des hémoglobines ;
 - un hémoglobinomètre.
- **Pour les laboratoires autorisés à pratiquer les examens relevant de l'immuno-hématologie :**
 - un jeu de plaques d'opaline ou de plastique translucide ou un système de plaques à usage unique ;
 - un dispositif permettant de pratiquer la détermination des groupes sanguins dans le système ABO, les phénotypes Rh et Kell, et la recherche des agglutinines irrégulières, le cas échéant.
- **Pour les laboratoires autorisés à pratiquer les examens relevant de la séro- immunologie :**
 - un dispositif permettant l'application des méthodes immunochimiques au dosage des antigènes ;
 - un agitateur de type Kline à mouvement circulaire (100 tours par minute), si la ou les techniques utilisées le nécessitent ;
- **Pour les laboratoires autorisés à pratiquer les examens in vitro utilisant des éléments radioactifs:**
 - les locaux et le matériel doivent être conformes à la réglementation spécifique en vigueur. [1]

2.1.1.4. Petits matériels.

Le petit matériel indispensable au fonctionnement des appareils doit être conforme aux normes marquées par les constructeurs et doit être utilisé uniquement selon l'usage et les modalités prévues dans la notice. [2]

2.1.1.5. Réactifs et consommables.

Les réactifs et les consommables doivent être certifiés conformes.

L'étiquetage des réactifs, milieux de culture, matériels de contrôle, étalons et consommables est conforme à la législation et aux normes en vigueur.

Un procès-verbal reprenant ces indications est tenu à jour pour chaque système analytique.

Les composants de plusieurs troussees ne sont pas permutables sans autorisation du fabricant. [3]

2.1.1.6. Secrétariat.

Le secrétariat doit être équipé en terme d'outils informatiques, de photocopieuses et de fournitures de bureau.

Le système informatique doit comprendre des dispositifs efficaces de protection contre toute tentative d'accès par des personnes non autorisées. Toute modification des informations ou des programmes ne peut être effectuée que par une personne autorisée et identifiée. La trace d'une modification d'un programme doit être conservée.

Le responsable du laboratoire ou de l'établissement dont il dépend doit passer une convention avec l'organisme chargé de la maintenance du système informatique. Cette convention doit préciser entre autres:

- que le personnel de cet organisme est soumis aux règles du secret professionnel ; que les moyens nécessaires sont mis en œuvre pour assurer la protection des données médicales confidentielles ;
- que chaque intervention effectuée sur place, ou à distance par télémaintenance, ne peut être réalisée qu'à la demande du

biologiste, par du personnel autorisé et identifié, et doit faire l'objet d'un compte rendu détaillé, comportant l'identification de l'intervenant, signé, adressé au biologiste qui le consigne et l'annexe au registre de maintenance du système.

2.1.1.7. Gestion des déchets biomédicaux.

La gestion des déchets doit être conforme à la législation et à la réglementation.

La filière d'élimination des déchets doit être conduite de manière à ne pas compromettre la santé et la sécurité du personnel du laboratoire, ainsi que celles du personnel de collecte et à ne pas polluer l'environnement. La procédure se fait par collecte, tri puis destruction des déchets. Les laboratoires doivent disposer d'un incinérateur à cet effet, même à distance du site de l'établissement.

Les déchets liquides doivent être traités avant leur élimination. [1]

➤ **Élimination des déchets de prélèvements**

Pour leur élimination, les matériels utilisés pour les prélèvements peuvent être classés en deux catégories :

- **les matériels piquants ou coupants** qui doivent obligatoirement être recueillis dans des récipients spéciaux (boîtes de collecte) ;
- **les autres matériels** qui constituent des déchets d'activités de soins à risques infectieux, doivent être collectés dans les sacs plastiques.

➤ **Élimination des déchets générés par l'exécution des analyses**

Ces déchets sont séparés en deux groupes :

- déchets à risques ;
- autres déchets assimilables à des ordures ménagères.
- **Les déchets à risques sont séparés en trois groupes :**
 - déchets potentiellement contaminés : déchets d'activité de soins à risques infectieux y compris les restes d'échantillons biologiques analysés, les déchets piquants ou coupants, les produits sanguins et les déchets anatomiques ;
 - produits toxiques ou chimiques ;
 - produits radioactifs.

Pour chaque groupe, une filière d'élimination doit être mise en place avec des modalités spécifiques de conditionnement, de

stockage, de transport, de traitement et de prétraitement. Lorsqu'une société prestataire de services effectue l'élimination, un contrat doit être établi avec le laboratoire réalisant des analyses de biologie médicale ou avec l'établissement dont il dépend. Chaque filière doit donner lieu à l'élaboration d'un bordereau de suivi. Celui-ci permet au laboratoire de justifier des quantités de déchets éliminés ainsi que des modalités de cette élimination.

- **Les déchets assimilables à des ordures ménagères**

Sont à entreposer en conteneurs en vue de leur élimination par le circuit des ordures ménagères après accord de la collectivité locale.

[1]

2.1.2. Exécution des analyses.

2.1.2.1. Procédures et Modes Opératoires.

➤ **Généralités**

Tout laboratoire réalisant des analyses de biologie médicale doit disposer des procédures et des Modes Opératoires Normalisés (MON) ou « Standard Operating Procedures (SOPs)» écrits, datés et techniquement validés, afin d'assurer la qualité des résultats et la conformité au Guide de Bonne Exécution des Analyses.

Dans chaque zone d'activité spécifique du laboratoire, les procédures et modes opératoires relatifs aux opérations qui y sont réalisées doivent être immédiatement disponibles. Des livres, des articles, des manuels peuvent être utilisés comme complément sans s'y substituer. Ces procédures et modes opératoires ne doivent pas être figés dans le temps, mais être adaptés à l'évolution des connaissances et des données techniques. Toute modification d'une procédure doit être écrite. Elle doit être approuvée par le biologiste, directeur du laboratoire ou chef de service ou de département, le cas échéant, par le biologiste responsable de l'activité concernée, et éventuellement après avis de la personne chargée de l'assurance de qualité. Elle doit faire l'objet d'une information et d'une formation du personnel.

La réalisation des actes de biologie doit respecter les obligations techniques prévues par la nomenclature des actes de biologie médicale et par les textes en vigueur concernant les réactifs et les appareils de mesure.

La période d'utilisation au laboratoire de chaque lot de réactif doit être consignée, de sorte qu'en cas de besoin on puisse rapprocher un résultat avec les réactifs ayant permis de les obtenir.

Le mélange de plusieurs échantillons issus d'individus différents est interdit pour des analyses individuelles de biologie médicale : chaque échantillon biologique doit être traité séparément. [2]

➤ **Applications.**

Les procédures et modes opératoires disponibles concernent les points suivants :

- les instructions relatives à la préparation du patient et aux modalités du prélèvement ;
- le choix du récipient destiné à recevoir l'échantillon ;
- le mode de prélèvement ;
- l'identification du patient et de l'échantillon : nom patronymique, prénom, nom marital, sexe, date de naissance ;
- le transport éventuel des échantillons ;
- le traitement préalable de l'échantillon (centrifugation, répartition en fractions aliquotes...) ; les interférences des médicaments et/ou des aliments susceptibles de modifier les résultats de l'analyse ;
- la conservation avant et après analyse ;
- l'appareillage (utilisation, entretien, étalonnage, vérification) ;
- les conditions d'utilisation des réactifs en application de la réglementation en vigueur; la réalisation de l'analyse avec une description de la méthode utilisée. Il est important que cette méthode soit adaptée aux connaissances théoriques et données techniques du moment.
- Dans la mesure du possible, elle suivra les recommandations des sociétés savantes de biologie nationales ou internationales:
- les règles de validation ;
- la transmission des analyses ;
- l'hygiène et la sécurité du laboratoire ;
- l'assurance de qualité ;
- la gestion des systèmes informatiques éventuels. [3]

2.1.2.2 Échantillons.

➤ **Prélèvements des échantillons.**

Le biologiste ou le responsable du laboratoire fournit aux médecins prescripteurs toutes les précisions utiles aux conditions de mise en œuvre des analyses médicales.

La fiche de demande d'examen accompagnant l'échantillon doit comporter tous les renseignements nécessaires à la bonne exécution des analyses et à l'interprétation des résultats.

Le prélèvement peut être effectué par le médecin prescripteur, par le biologiste ou par le personnel qualifié et autorisé. Ces personnes doivent être formées aux procédures de prélèvement du laboratoire et informées des risques d'erreurs sur les résultats d'analyses consécutives à la réalisation défectueuse du prélèvement et à la nécessité de préciser au biologiste ou au responsable du laboratoire tout incident survenu au cours du prélèvement.

Le biologiste ou le responsable du laboratoire vérifie la conformité des échantillons biologiques acceptés dans son laboratoire. Il doit refuser tout échantillon prélevé ou transmis dans des conditions non conformes aux procédures techniques et réglementaires. Le motif du refus sera porté à la connaissance du médecin prescripteur. Lorsqu'il s'agit d'un prélèvement difficile ou unique, les critères d'acceptation doivent être appréciés avec circonspection ; le résultat doit faire mention de ces éventuelles réserves si cela est nécessaire. Chaque fois que cela est possible, il est souhaitable que le prélèvement soit effectué au laboratoire.

Le prélèvement doit être réalisé en règle générale avec du matériel stérile à usage unique. Le récipient destiné à recevoir l'échantillon biologique doit être adapté à la nature de l'échantillon et à celle des analyses. En particulier, la nature du récipient, son système de fermeture, la nature et la quantité ou la concentration des substances adjuvantes qu'il peut contenir doivent être connus et précisés en fonction de l'échantillon auquel ils sont destinés. Le récipient doit être conçu pour éviter tout risque de contamination et de pollution.

Le patient doit être informé et rassuré des conditions de prélèvements. [2]

➤ **Identifications des échantillons.**

• **Tubes ou récipients primaires :**

L'étiquetage des récipients contenant l'échantillon biologique doit être fait au moment du prélèvement par la personne ayant réalisé celui-ci. L'étiquetage doit être conçu pour éviter toute erreur sur l'identité de la personne. Il doit mentionner, outre l'identité et la date de naissance, déclinées par le patient lui-même dans la mesure du possible, le nom de jeune fille si une procédure le

prévoit, le sexe, la nature de l'échantillon, le nom du préleveur, la date et, chaque fois qu'une procédure le prévoit, l'heure du prélèvement et/ou sa localisation. Si la taille du tube ne permet pas l'apposition d'une étiquette comportant l'ensemble des renseignements précités ou si la confidentialité l'exige, le tube portera seulement le numéro d'identification joint à une fiche de renseignement.

Le biologiste doit mettre en place une procédure permettant de lier l'échantillon biologique au patient, même si l'identité de celui-ci est incomplète ou approximative, ou lorsque l'anonymat est souhaité. Cette procédure indiquera également la marche à suivre si l'échantillon biologique fourni par le préleveur ne possède aucune identification.

• **Tubes ou récipients secondaires :**

Lors de la préparation de fractions aliquotes, l'étiquetage des tubes ou récipients secondaires doit se faire selon les procédures rigoureuses permettant l'identification sans ambiguïté de chaque échantillon au sein du poste de travail ou du poste de stockage.

➤ **Transport et transmission des échantillons :**

Le transport des échantillons doit respecter des règles qui assurent l'intégrité de l'échantillon et la sécurité du personnel. Le transport des échantillons biologiques doit s'effectuer le plus rapidement possible au laboratoire en prenant toutes les précautions pour éviter les risques de contamination et de dégradation des constituants.

Si l'échantillon doit être transmis à un autre laboratoire, la fiche de demande d'examen ou sa copie ou, à défaut, une fiche de renseignements établie par le biologiste doit être associée. Les dates et les heures de réception des échantillons biologiques au laboratoire destinataire doivent être enregistrées.

➤ **Conservation des échantillons**

Les conditions de conservation doivent être conformes aux règles de sécurité et d'hygiène en vigueur pour éviter toute contamination du personnel ou toute pollution.

Les échantillons de calibrage et de contrôle doivent être conservés avec soin dans les conditions précisées par le fabricant. Toutes les précautions doivent être prises pour éviter les phénomènes d'évaporation et de contamination.

Avant exécution des analyses, si celles-ci sont différées, les échantillons et leurs fractions aliquotes doivent être conservés dans des conditions qui préservent leur qualité. La congélation de fractions aliquotes obtenues après reconstitution d'échantillons lyophilisés (calibrateurs et contrôles) engage la responsabilité du biologiste. [2]

Après exécution des analyses, les échantillons peuvent être conservés pour permettre une comparaison ou une vérification ultérieure. Cette conservation est d'ailleurs obligatoire pour certains examens précisés en **Annexe 2**.

Les conditions d'identification, de fermeture des récipients et de température de conservation doivent être rigoureusement observées pour éviter tout risque d'erreur, de modification qualitative et/ou quantitative et de contamination. La durée de conservation pour chaque cas particulier doit, si elle n'est pas réglementée, être fixée par le biologiste ou le responsable du laboratoire et inscrite sur les procédures opératoires.

2.1.2.3. Validation des résultats.

La validation des résultats est double : elle comporte une validation analytique, qui peut être réalisée par le personnel d'exécution sous la responsabilité du biologiste, et une validation biologique, qui est de la compétence exclusive du biologiste ou le responsable du laboratoire.

➤ Validation analytique (responsabilité technique)

La validation analytique des examens doit être soumise à des procédures précises écrites. Elle ne doit être effectuée qu'après avoir vérifié les indicateurs de bon fonctionnement des instruments et pris connaissance des résultats du contrôle de qualité interne.

➤ Validation biologique (par le Biologiste ou le responsable du laboratoire)

La validation biologique doit s'assurer de la compatibilité des résultats de l'ensemble des analyses réalisées pour le même patient à des temps différents, compte tenu, des variations de son état clinique, des traitements subis et des résultats antérieurs. Le recours à un système d'aide à la validation ne décharge pas le biologiste de sa responsabilité en matière de validation biologique pour chaque compte rendu. [1]

2.1.2.4. Expression des résultats et comptes rendus d'analyses.

➤ Expression des résultats

L'expression des résultats doit être précise et sans équivoque. Les valeurs de référence doivent être indiquées. La méthode d'analyse et/ou les réactifs utilisé(e)(s) doivent être mentionné(e)(s) chaque fois qu'ils peuvent influencer sur l'expression du résultat ainsi que lorsque la réglementation l'exige.

Pour les résultats quantitatifs, les performances analytiques de la méthode peuvent être indiquées. Les unités du système international (SI) doivent être utilisées quand elles existent.

➤ Comptes rendus d'analyse et signature

Les comptes rendus d'analyses doivent figurer sur un papier avec l'en-tête du laboratoire comportant les mentions fixées réglementairement et être signés par le biologiste. Les comptes rendus ne peuvent être communiqués qu'après les opérations de validation. Toutefois, pour les patients hospitalisés et dans le cas des examens demandés en urgence, des résultats partiels peuvent être transmis dans des conditions définies par le biologiste et sous sa responsabilité, avant la validation biologique de l'ensemble des résultats demandés. Ils doivent être confirmés dès que celle-ci aura été effectuée par un biologiste et le médecin traitant doit être informé de cette particularité. [2]

2.1.2.5. Transmission des résultats.

Elle doit se conformer à la législation et à la réglementation en vigueur et assurer le respect du secret professionnel.

Les résultats d'analyses sont remis comme suit :

- au patient en main propre ou envoyés sous pli fermé et cacheté, à son nom et à l'adresse qu'il a communiqué ;
- au médecin prescripteur, sauf opposition du patient ;
- à une tierce personne dûment mandatée par le patient ;
- au médecin prescripteur, lorsque le patient est hospitalisé ;

Lorsque le patient est un mineur ou un majeur protégé par la loi, le biologiste ne peut donner les résultats qu'au représentant légal ou au médecin prescripteur. Lorsque le résultat d'un examen biologique met en jeu le pronostic vital, le biologiste doit tout mettre en œuvre pour joindre et avertir le médecin traitant ou l'équipe médicale dans les plus brefs délais. Un résultat laissant

présager un pronostic grave ou fatal ne doit être révélé qu'avec la plus grande circonspection. Si les résultats ne peuvent pas être communiqués au médecin prescripteur (changement de médecin, analyses effectuées à l'initiative du biologiste ou ajoutées à la demande du patient), le biologiste doit demander au malade de lui désigner le médecin à qui il souhaiterait que les résultats soient remis.

- Les comptes rendus des analyses de cytogénétique ou de biologie destinées à établir un diagnostic prénatal ne peuvent être remis à la femme enceinte que par l'intermédiaire du médecin prescripteur.
- Les comptes rendus d'analyses effectués sur réquisition judiciaire ne peuvent être adressés qu'à l'autorité requérante dans des conditions garantissant la confidentialité.
- Le compte rendu d'analyses prescrites par le médecin du travail dans le cadre de sa mission (avis d'aptitude notamment) lui est directement communiqué par le laboratoire qui les a effectuées. Le médecin du travail informe le salarié des résultats.
- Un biologiste ne peut pas répondre à une demande de renseignements faite par une compagnie d'assurances concernant une analyse, même si cette demande émane du médecin de la compagnie. Les résultats d'analyses destinés à des compagnies d'assurances ne peuvent être remis qu'au patient en main propre, lequel reste libre d'en faire l'usage qu'il désire. [1]

2.1.3. Mise en place de l'Assurance Qualité.

2.1.3.1. Mise en place de la démarche qualité.

Tout laboratoire réalisant des analyses de biologie médicale doit disposer d'un système d'assurance de qualité basé sur des procédures opératoires écrites concernant les différentes étapes de l'analyse et les conditions de son exécution.

La qualité de l'analyse dépend de l'organisation générale du laboratoire, de la qualification et de la motivation du personnel et du respect des procédures opératoires lors des différentes étapes de l'exécution des examens : pré-analytique, analytique et post-analytique.

Toute l'équipe du laboratoire est concernée par ce système d'assurance qualité qui est placé sous l'autorité du biologiste ou du responsable du laboratoire.

Un système d'assurance de qualité doit être permanent et prévoir une trace des contrôles effectués.

Sans cette trace, il est difficile et parfois impossible de retrouver une erreur et/ou d'en analyser les causes pour en éviter la répétition. [1]

2.1.3.2. Responsabilités de la personne chargée de l'Assurance Qualité.

L'organisation du système d'assurance de qualité du laboratoire est confiée au biologiste, au responsable du laboratoire ou à toute autre personne qui devrait avoir la formation, la compétence et l'expérience nécessaires pour accomplir cette tâche. Elle doit notamment s'assurer :

- **Quant au personnel :**

- que les procédures opératoires concernant l'hygiène et la sécurité du personnel sont mises en œuvre ;
- que chaque opération réalisée au laboratoire est confiée à un exécutant présentant la qualification, la formation et l'expérience appropriées ;
- que le personnel est sensibilisé à la notion d'assurance de qualité et formé à la mise en œuvre des pratiques « qualité ».

- **Quant aux procédures et modes opératoires :**

- de leur validation ;
- de leur mise en œuvre ;
- de l'information du personnel, de toute modification de procédure ; cette modification approuvée par le biologiste ou le responsable du laboratoire doit être écrite, datée et communiquée au personnel ; celui-ci est formé à son application ;
- de leur conservation dans un fichier chronologique.

- **Quant au contrôle de qualité :**

- de la gestion du programme de contrôle de qualité externe et interne du laboratoire ;
- de la bonne utilisation des données fournies par le contrôle de qualité et de la correction des anomalies ;
- de l'information du biologiste ou du responsable du laboratoire, des constatations et des observations relatives au système d'assurance de qualité ;
- de l'application des mesures consécutives à un retrait éventuel de réactifs par la Direction de la Pharmacie et du Médicament ;

- de la maintenance, du bon fonctionnement de l'appareillage ;
 - de la bonne tenue des documents qui concourent à la traçabilité, notamment ceux concernant les réactifs et la période d'utilisation de chaque lot ;
 - d'un système d'assurance de qualité au moins équivalent auprès des laboratoires travaillant en collaboration avec le laboratoire et auxquels sont transmis des échantillons aux fins d'analyses ;
 - de la mise en œuvre d'évaluations internes.
- **Quant au système de support des données :**
- de la mise en œuvre des procédures opératoires concernant la sécurité des données;
 - de la confidentialité et du respect des procédures d'accès ;
 - du respect de la réglementation et de l'information des patients;
 - du respect des procédures de télécommunication et transmissions électroniques ;
 - de la conservation des registres et fichiers des traces du système informatique.

2.1.3.3. Évaluation externe de la qualité.

➤ Contrôle de qualité national.

Il s'agit d'un auto-contrôle qui doit se dérouler dans un climat de confiance réciproque. Les résultats individuels produits lors de ce contrôle sont confidentiels et ne peuvent être communiqués aux autorités sanitaires que dans les conditions prévues par les textes.

La participation au programme national d'évaluation externe de la qualité est obligatoire. Une participation loyale est indispensable pour qu'elle soit utile. Cette participation doit être un reflet exact de la pratique. Une optimisation artificielle des résultats du contrôle est inutile pour le laboratoire et nuisible pour la collectivité.

Une participation rigoureuse, reflétant la pratique du laboratoire, est indispensable pour l'utilité de cette évaluation. Les résultats de celle-ci seront en effet très importants pour l'analyse globale qui sera effectuée au niveau national.

Les résultats individuels et globaux de l'évaluation externe de la qualité sont analysés collectivement par toute l'équipe du laboratoire afin de remédier aux erreurs qui pourraient être objectivées. L'étude critique des anomalies détectées par le contrôle de qualité peut induire la remise en cause de la méthode

utilisée au laboratoire. Il peut aussi être utile d'engager un dialogue avec les responsables du contrôle de qualité pour éclaircir les raisons d'un résultat discordant inexpliqué. Une trace des décisions induites par les résultats de l'évaluation externe de la qualité doit être conservée en même temps que sont archivés les comptes rendus individuels du laboratoire pendant cinq ans.

La rigueur de cette démarche se justifie parce qu'elle aboutit à une bonne information des biologistes sur la qualité de leurs prestations. Ces informations permettent aux biologistes de corriger les anomalies mises en évidence. Lorsque les résultats du contrôle de qualité d'un laboratoire présentent des anomalies répétées ou importantes au regard de leur utilisation médicale, le cas de ce laboratoire est soumis anonymement à la commission chargée du contrôle de qualité qui se prononce sur le caractère de gravité de ces anomalies. Lorsque celles-ci sont jugées graves, le laboratoire est obligatoirement signalé au département de tutelle par le directeur de la pharmacie et du médicament. [1]

➤ **Autres contrôles de qualité.**

Il est recommandé que le laboratoire participe à des contrôles de qualité externes organisés par des sociétés scientifiques, des groupements de biologistes ou tout autre organisme présentant les garanties nécessaires.

2.1.3.4. Évaluation interne de la qualité.

Le contrôle de qualité interne est indispensable pour permettre de déceler les anomalies et les erreurs des mesures pour y remédier immédiatement. Il est organisé par le biologiste qualifié chargé de l'assurance de qualité.

Il comporte toutes les mesures destinées à vérifier les différentes phases de l'activité permettant l'obtention des résultats, et notamment l'analyse d'échantillons de contrôle effectuée dans les mêmes conditions que celles appliquées aux échantillons biologiques.

2.1.4. Documentation du laboratoire.

2.1.4.1. Rapports d'activités du service et publications.

C'est le relevé chronologique des analyses exprimées en unités B (lettre clé des analyses) effectuées par le laboratoire ou transmises

par ce laboratoire à un autre laboratoire. Ce relevé doit être conservé pendant une période de dix ans

2.1.4.2. Résultats nominatifs des analyses.

Les résultats nominatifs des analyses (bulletin d'analyse) effectuées par le laboratoire doivent être conservés pendant une période d'au moins cinq ans.

2.1.4.3. Registres de laboratoire.

Les dossiers et livres de registre doivent être conservés pendant vingt ans.

2.1.4.4. Normes et procédures.

Il sera conservé un exemplaire des procédures et modes opératoires et de leurs modifications comportant la date de leur mise en œuvre, pendant la durée de leur utilisation et au moins trois ans après la fin de leur utilisation. [3]

2.1.4.5. Résultats des contrôles de qualité et corrections.

Les résultats des contrôles de qualité externes doivent être conservés pendant cinq ans. Le compte rendu des mesures prises pour corriger les anomalies observées à la suite du résultat du contrôle national de qualité, doit être conservé pendant cinq ans. Les résultats des contrôles de qualité internes sont à conserver trois années au moins.

Les documents relatifs aux instruments et à leur maintenance ainsi que ceux relatifs aux modifications des programmes informatiques sont à conserver pendant la durée d'utilisation de ce matériel et les trois ans suivants.

2.1.4.6. Documents relatifs aux appareils, aux réactifs, petits matériels et consommables.

Les documents relatifs aux appareils, réactifs, petits matériels et consommables sont à conserver pendant la durée de leur utilisation.

2.1.4.7. Dossiers administratifs.

Les actes administratifs concernant l'établissement qui abrite le laboratoire, ainsi que ceux du laboratoire lui-même, sont à conserver pendant toute la vie de l'établissement.

Les contrats relatifs à l'enlèvement des déchets sont à conserver pendant trois ans au moins ; et tous les autres contrats aussi longtemps que possible. [1]

2.2. Les salmonelloses majeures.

2.2.1. Définition et systématique.

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

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

Enfin, la sous-espèce V a été individualisée en 1982, la sous-espèce VI en 1986. La très grande majorité des salmonella isolées chez l'homme et chez les 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 II, ne sont pas rares chez l'homme. Les salmonella des sous-espèces autres que I, sont surtout isolées d'animaux à sang froid et dans l'environnement et

ne sont qu'exceptionnellement la cause de troubles pathologiques chez l'homme. [4]

2.2.2. Caractères bactériologiques.

2.2.2.1. Morphologie et colorabilité.

Les bactéries du genre *Salmonella* sont des bacilles à Gram négatif. [5]

Pouvant mesurer 2 à 3 μm de long sur 0,6 μm de large pendant leur croissance exponentielle. A l'exception des *Salmonella* appartenant aux sérotypes aviaires, tels *Salmonella gallinarum* et *Salmonella pullorum* et quelques rares mutants immobiles, les *salmonelles* sont généralement mobiles avec une ciliature péritriche. [6] [7] Voir figure n°1.

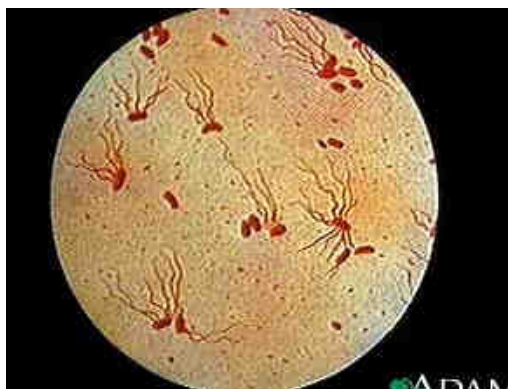


Figure n°1 : Les *Salmonella* vues au microscope électronique.

Source: référence [8] Date de visionnement : Juin 2010.

2.2.2.2. Caractères cultureux et milieux de cultures.

Les milieux sélectifs le plus souvent utilisés pour l'isolement des *Salmonella* sont le milieu *Salmonella-Shigella* (SS), le milieu Mc Conkey, le milieu Hecktoen. Sur le milieu 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 3mm de diamètre. Des colonies naines s'observent rarement, de même que des colonies rugueuses ou des colonies muqueuses ressemblant à des colonies de *Klebsiella*. [9]

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

Présentation des milieux de culture.

- **Gélose *Salmonella-Shigella*** (Gélose SS). [10]

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



Aspect du milieu avant utilisation 	Mode d'ensemencement	Sélectivité / composition	Caractères recherchés	Résultats
Aspect du milieu après utilisation 	<p>Isolement par la méthode des cadrans.</p> <p>Incuber 18 à 24 h à 37°C.</p>	<p>Le milieu contient 3 inhibiteurs :</p> <ul style="list-style-type: none"> - sels biliaires, - vert brillant - forte concentration en citrate de sodium. <p>Ceux-ci empêchent la pousse de toutes bactéries Gram⁺, et rendent difficile la croissance des bactéries Gram⁻ autres que <i>Salmonella</i> et <i>Shigella</i>.</p>	<p>Le milieu contient du lactose pouvant être fermenté.</p> <p>Le milieu contient du thiosulfate pouvant donner du H₂S.</p>	<p>colonies rouges : lactose +</p> <p>colonies incolores : lactose-</p> <p>colonies à centre noir : H₂S +</p>

Figure n°2 : Aspect de la gélose SS après la culture.

Source : référence [10] Date de visionnement : Juillet 2010

- **Gélose Hektoen [10]**

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



<p>Aspect du milieu avant utilisation</p> 	<p>Mode d'ensemencement</p>	<p>Sélectivité / composition</p>	<p>Caractères recherchés</p>	<p>Résultats</p>
<p>Aspect du milieu après utilisation</p> 	<p>L'ensemencement se fait par les techniques habituelles.</p>	<p>Deux indicateurs sont présents dans le milieu :</p> <ul style="list-style-type: none"> - le bleu de bromothymol (indicateur de pH) - la fuschine acide (qui se colore en présence d'aldéhyde . 	<p>trois types de glucides: la salicine (qui est un hétéroside) , le saccharose et le lactose.</p> <p>La production d'H₂S à partir de thiosulfate</p>	<p>Colonies saumon : <i>Escherichia</i>, <i>Levinea</i>, <i>Citrobacter diversus</i>, <i>Klebsiella</i>, <i>Enterobacter</i>, <i>Serratia</i>, <i>Yersinia</i></p> <p>Colonies saumon à centre noir : <i>Citrobacter freundii</i>, <i>Proteus vulgaris</i>,</p> <p>Colonies bleu-vert à centre noir : Suspicion de <i>Salmonella</i>, à différencier de <i>Proteus mirabilis</i></p> <p>Colonies bleu-vert ou vertes : Suspicion de <i>Shigella</i> ou de <i>Salmonella</i></p>

Figure n°3 : Présentation de la gélose Hektoen après la culture.

Source : référence [10] Date de visionnement : Juillet 2010

2.2.2.3. Caractères biochimiques. [4].

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

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

2.2.2.4. Caractères antigéniques.

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

➤ Antigènes de paroi ou antigène O

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

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

- Facteurs O majeurs :

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

- Facteurs O accessoires :

Les facteurs O accessoires sont d'un intérêt diagnostique mineur car ils sont toujours liés à un facteur O caractéristique de groupe. Par exemple, le facteur O12 existe chez toutes les souches des groupes A, B, D, où ils sont liés respectivement à O2, O4, O9. Il est

donc sans intérêt diagnostique de le rechercher. Ces facteurs résultent de la modification du polysaccharide lié à la spécificité du facteur O majeur par une enzyme à déterminisme chromosomique.

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

➤ **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 Félix et Pitt chez des souches de *Salmonella* Typhi, qui avaient pensé que la virulence était conditionnée par cet antigène. L'existence de l'antigène Vi n'est connue que chez trois sérovars de *Salmonella* : Typhi, *Paratyphi C* et *Dublin*.

➤ **Antigènes flagellaires ou Antigènes H.**

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

2.2.3. Diagnostic biologique. [10]

2.2.3.1. Méthode directe.

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

➤ **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.

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

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

75p. 100 pendant le 2^{ème} septénaire

40p. 100 pendant le 3^{ème} septénaire

10p. 100 pendant le 4^{ème} septénaire.

➤ **Coproculture.**

Les selles sont recueillies dans des pots stériles et transmises rapidement au laboratoire pour être examinées. Le maximum de la positivité de la coproculture se situe à la 2^{ème} semaine mais dès la 1^{ère} semaine, cette positivité commence et persiste durant toute la maladie.

➤ **LCR et autres prélèvements.**

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

Tableau I : Caractères des souches de Salmonella Typiques, des Salmonella fermentant le lactose sur les milieux de culture [11].

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

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

➤ **Sérogroupage. [12]**

• **Principe.**

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

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

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

Le sérogroupage est fait :

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

• **Cas spécifique de *Salmonella* Typhi.**

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

Interprétation.

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

La bactérie non chauffée + Vi antisérum : aucune agglutination = *Salmonella species*.

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

La bactérie non chauffée + Vi antisérum : agglutination = *Salmonella Typhi*

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

La bactérie non chauffée + Vi antisérum : agglutination

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

La bactérie chauffée + Vi antisérum : aucune agglutination = *Salmonella Typhi*

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

La bactérie non chauffée + Vi antisérum : agglutination

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

La bactérie chauffée + Vi antisérum : aucune agglutination = autre bactérie (pas de *Salmonella*)

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

2.2.3.2. Méthode indirecte. [12]

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

- Principe.

Il est basé sur la capacité des anticorps sériques (agglutinines) d'agglutiner une suspension de bactéries tuées. Cette suspension de bactéries est préparée de façon à détruire les flagelles donnant une suspension antigénique O ou à les préserver ; ce qui donne une suspension antigénique H. [13]

• Evolution des anticorps

Au cours des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes, les agglutinines O apparaissent vers le 8^{ème} 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^{ème} 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.

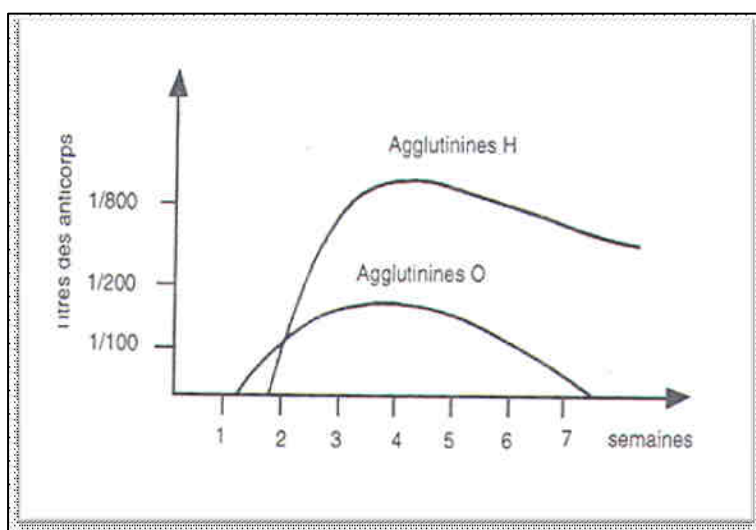


Figure n°4 : Evolution du titre des agglutinines des anticorps au cours des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes.

Source : référence [13].

Date de visionnement : Août 2010

Tableau II : Exemple d'interprétation du sérodiagnostic de Widal et Félix

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

- **Interprétation du tableau II.**

1. Fièvre typhoïde à la période d'état. (Co-agglutination BO due au facteur 12)
2. Fièvre paratyphoïde B à la période d'état.
3. Trois hypothèses sont envisagées :
 - a. Fièvre typhoïde au début vers le 8^e jour, les agglutinines O sont apparus, les agglutinines H ne le sont pas encore.
 - b. Infection due à un sérotype ayant un antigène O commun avec *Salmonella Typhi* mais des antigènes H différents.
 - c. Infection à *Yersinia pseudotuberculosis* type IV.
4. Trois hypothèses sont envisagées:
 - a. Paratyphoïde B au début avec co-agglutination T0
 - b. Salmonellose due à un sérotype ayant un antigène O commun avec *Salmonella Paratyphi B*.
 - c. Infection à *Yersinia pseudotuberculosis* type II.
5. Sujet vacciné au TAB depuis plus de 3 mois : les antigènes O ont disparus, les antigènes H persistent pendant de nombreuses années.

6. Fièvre typhoïde chez un vacciné ayant ingéré une grande quantité de *Salmonella Typhi* addition des cas 1 et 5. Un taux d'anticorps O constitue un argument important en faveur d'une infection évolutive ou récente. Il n'existe pas de relation entre le titre des agglutinines et la gravité de la maladie.

L'interprétation du sérodiagnostic qualitatif n'est pas toujours aussi aisée. Elle doit être faite en fonction des signes cliniques. En présence d'un résultat aberrant, diverses hypothèses doivent être soulevées.

2.2.4. Traitement - Prophylaxie.

2.2.4.1. Traitement. [6] [14]

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 ;
- Être éliminé sous forme active dans les selles par la voie hépatobiliaire et dans les urines pour éviter qu'il subsiste des porteurs de germes
- Avoir une bonne concentration lymphatique mésentérique.

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 multirésistantes mérite une surveillance particulière.

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

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

2.2.4.2. Prophylaxie.

➤ Vaccination par le Typhim-Vi

Le vaccin Typhim-Vi est une solution injectable d'antigène Vi (virulence) préparée à partir de polysaccharide capsulaire de la souche TY2 (ViPSC) de *Salmonella Typhi*. Le vaccin est fabriqué par Pasteur Mérieux distribué sous le nom commercial de Typhim-Vi(MC). Chaque dose unitaire contient 0,5 ug de polysaccharide qui induit une réponse immunitaire humorale et confère une protection contre l'infection. Des essais cas-témoin ont démontré que la réponse sérologique au vaccin était corrélée à l'efficacité de la protection [15]. La dose administrée est la même pour les adultes et les enfants. Le fabricant (Cannaught Laboratories, données inédites) ne recommande pas ce vaccin pour les enfants moins de deux ans.

Il a été démontré qu'une seule dose de vaccin administrée par voie intramusculaire induit une élévation d'au moins quatre fois du titre des 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 5 ans et 93% à 96% chez des sujets de 5 ans à 45 ans (Cannaught Laboratories, données inédites).

Usage recommandé

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

- Les voyageurs qui se rendent dans des régions où il y a un risque reconnu de contacter la fièvre typhoïde. Cela englobe tous les pays en développement où l'on n'est pas certain de la qualité de l'eau potable.
- Les personnes qui ont un contact étroit par exemple domestique avec un porteur connu de *Salmonella typhi*.

- Les techniciens de laboratoire qui manipulent souvent des cultures de *Salmonella typhi*.
- La posologie recommandée pour le vaccin typhim- Vi consiste en une dose unique de 0.5ml injectée par voie intramusculaire. Dans le cas du vaccin Ty21a le programme d'immunisation complet comporte quatre doses, prises à raison d'une capsule tous les deux jours.

Le vaccin Typhim Vi a été homologué pour l'immunisation des personnes ≥ 2 ans. La durée de protection conférée par le vaccin n'est pas bien établie. Le vaccin polysaccharidique maintient une protection immunitaire après 17 mois et 21 mois ; on a noté que les anticorps Vi avaient diminué environ de 35%, 11 mois après la vaccination et d'environ 60% après 27 mois **[15] [16]**.

Une dose additionnelle du vaccin polysaccharidique injectée 34 mois après la dose initiale ramenait le taux d'anticorps à ceux qui avaient été observés après la primo-vaccination. Si l'on prévoit une exposition prolongée au *Salmonella typhi*. Il est recommandé d'administrer des doses de rappel pour maintenir l'immunité. On ne possède aucune donnée sur l'immunogénicité du vaccin Vi polysaccharidique chez les personnes qui avait déjà reçu d'autres vaccins contre la fièvre typhoïde, mais l'on prévoit qu'une dose de Vi polysaccharidique sera tout aussi immunogène chez ces personnes que chez celles qui n'ont jamais été vaccinées.

3. METHODOLOGIE.

3.1. Cadre d'étude.

Notre étude a été réalisée dans le laboratoire du CHU Gabriel TOURE.

3.1.1. Historique.

Le CHU Gabriel TOURE est situé à Bamako, capitale du MALI, à cheval entre les communes II et III (au centre commercial de la ville). IL est bâti sur une superficie de 3,1hectares.

En 1959, l'ancien Dispensaire Central de Bamako a été érigé en hôpital. Il sera baptisé «**Hôpital Gabriel Touré**» en hommage au sacrifice d'un jeune Soudanais stagiaire en 4^{ème} année de médecine de Dakar (SENEGAL). Il était venu faire son stage de vacances au dispensaire central de Bamako. Cela a coïncidé avec une épidémie de peste au Soudan Français. Le jeune étudiant en médecine fut des actions sacerdotales pour sauver des victimes. Il contracta lui-même la peste lors de cette épidémie et mourût en 1934.

3.1.2. Organisation.

L'Hôpital Gabriel TOURE a été érigé en Etablissement Public à caractère Administratif (EPA) en 1992, doté de la personnalité morale et de l'autonomie de gestion. C'est l'un des onze (11) Etablissements Publics à caractère Hospitalier (EPH) institués par la loi n° 94-009 du 22 mars 1994 modifiée par la loi n°02-048 du 12 juillet 2002 portant création du Centre Hospitalier Universitaire (CHU).

3.1.3. Laboratoire.

L'ancienne pharmacie de l'hôpital a été réaménagée en laboratoire de biologie médicale lui-même faisant partie du Département médico-technique.

Il comprend :

- deux grandes salles de travail pour l'hématologie et la biochimie,
- une salle de prélèvement et de parasitologie,
- une salle de stérilisation,
- une salle de garde avec toilette,

- un bureau de chef de service,
- trois salles aménagées récemment pour les activités de bactériologie et équipées en matériels de bactériologie (3 automates d'hémoculture BACTEC® 9050, 2 hôtes, des congélateurs, des réfrigérateurs, des micro-ordinateurs avec une connexion sur Internet.

Les activités sont regroupées par section, chaque section est dirigée par un interne :

- section de biochimie équipée d'un Spectrophotomètre,
- section d'immuno- hématologie équipée d'un Counter ABX micros 60 et d'un CELL-DYN 1700,
- section de parasitologie équipée de Microscopes,
- section de bactériologie pour la recherche,
- section pour les taux de CD4 équipée d'un BD FACS Count™, etc.

Le personnel comprend :

- Un pharmacien biologiste,
- Trois pharmaciens,
- Trois internes en pharmacie et un interne en médecine,
- Un assistant médical,
- Des techniciens supérieurs et techniciens de laboratoire repartis entre les différentes sections du laboratoire,
- Une secrétaire,
- Un personnel de surface.

Les activités de recherche bactériologique sont supervisées par un professeur de bactériologie- virologie. L'équipe technique de bactériologie est appuyée par une technicienne supérieure de l'Institut national de Recherche en Santé Publique (INRSP) et comprend en outre de pharmaciens biologistes, deux techniciens supérieurs et des internes en pharmacie.

3.2. Population d'étude.

Notre échantillonnage a été constitué à partir des prélèvements des patients référés au laboratoire pour des analyses de mise en évidence soit des anticorps dirigés contre les salmonelles majeures dans les sérums (sérodagnostic de Widal et Félix), soit des bactéries elles-mêmes dans les sangs (hémocultures) ou dans les selles (coprocultures) de ceux-ci reçus en consultation dans les différents services cliniques de l'hôpital (hospitalisés ou non) ou venant tout simplement de l'extérieur (autres centres de santé que le CHU Gabriel TOURE).

3.3. Type d'étude.

Il s'agissait d'une étude rétrospective (2009) et prospective (2010) descriptive pour le diagnostic sérologique et bactériologique de l'infection par les salmonelles majeures chez des personnes malades (hospitalisées ou non) reçues au CHU Gabriel TOURE ou provenant de l'extérieur référées au laboratoire dudit centre.

Elle est analytique.

Elle est qualitative et quantitative.

3.4. Critères d'inclusion et de non inclusion.

3.4.1. Critères d'inclusion.

Sont inclus dans notre étude les prélèvements des patients reçus au laboratoire pour un diagnostic de salmonelloses majeures, en interne (hospitalisés ou non) ou en externe, du CHU Gabriel TOURE.

3.4.2. Critères de non inclusion.

N'étaient pas inclus dans notre étude tous prélèvements non conformes (insuffisants, hémolysés, ictériques...) pour le sérodagnostic de Widal et Félix et selles ou sang ayant trop durés à l'air ou souillés (conditionnements inappropriés) pour la coproculture et l'hémoculture.

3.5. Aspects éthiques.

3.5.1. Confidentialité.

Les noms des patients ne figurant pas dans l'étude, l'anonymat a été respecté.

3.5.2. Consentement éclairé.

Un consentement éclairé a été obtenu après explication aux patients des bénéfices et des contraintes liés au diagnostic biologique, dans sa langue usuelle.

3.5.3. Risques liés à l'étude.

Les malades ont été informés des risques qu'ils courent en faisant le diagnostic tels que la douleur aux points de piqûre et les possibles infections du site de prélèvement.

3.5.4. Respect des références bibliographiques.

Les textes des références bibliographiques n'ont pas fait l'objet de modifications. La propriété intellectuelle des auteurs de nos références bibliographiques a été respectée.

3.6. Echantillonnage.

3.6.1. Méthode et techniques d'échantillonnage.

L'échantillonnage utilisé dans cette étude était exhaustif. Il concernait l'ensemble des patients référés au laboratoire pour un diagnostic de salmonelloses majeures dans le cadre d'un bilan systématique.

3.6.2. Taille de l'échantillon.

Durant la période d'étude allant du 1^{er} juin 2009 au 31 mai 2010, l'effectif des personnes dépistées au laboratoire a été de 2072 patients, pour le sérodiagnostic de Widal et Félix, qui ont constitué notre échantillon concernant les données sociodémographiques.

3.6.3. Variables étudiées.

Les variables sélectionnées pour atteindre les objectifs fixés ont été les suivants : Sexe, âge, statut sérologique ou bactériologique, nombre de malades testés par mois.

3.6.4. Collecte des données.

Les renseignements ont été recueillis à partir des registres de données du laboratoire.

3.6.5. Saisie et analyse des données.

Les données ont été saisies, traitées et analysées sur Microsoft Office Excel 2008 pour Windows.

Word 2008 a été utilisé pour le traitement de texte.

Microsoft Excel –Logi-Evaluat-labo.xls a été utilisé pour évaluer le laboratoire. Ce logiciel comportait des questions à réponses ouvertes et réponses fermées. Ainsi un résultat est donné en pourcentage, pour chaque paramètre étudié, après la réponse aux questions.

Pour l'évaluation du laboratoire nous avons choisi une grille d'intervalle pour apprécier les paramètres étudiés :

- <50% c'est insuffisant,
- De 50 à 69% c'est passable,
- De 70 à 79% c'est assez bon,
- De 80 à 100% c'est bon.

3.7. Conditions de sécurité au laboratoire.

- port de gant et blouse,
- lavage des mains après élimination des gants,
- eau de javel pour effluents (sérum – lavage),
- pas de contact des substrats avec la peau,
- nettoyage des paillasses à l'eau de javel puis à l'alcool à 70°,
- utilisation de 2 sortes de poubelles :
 - une pour cartons d'emballage, papiers...
 - une pour déchets contaminés pour incinération,
- élimination des pipettes après une nuit en eau de javel (containers spéciaux),
- lavage des mains avant de quitter le labo,
- toute plaie doit être protégée (pansement),
- **blessures avec sang :**
 - nettoyage à l'eau de javel et au savon,
 - rinçage,
 - désinfection avec l'alcool à 70° pendant 3 minutes ou eau de Javel diluée au 1/10,
 - projection dans les yeux (laver abondamment à l'eau ou au sérum physiologique),

- déclaration des accidents de travail sur le registre et suivi sérologique (faire une sérologie dès l'accident puis contrôler à 3 semaines et à 3 mois),
- la mise à la disposition de médicaments anti- rétroviraux pour le personnel de l'hôpital en cas de risque important doit être réfléchi en fonction des disponibilités.

3.8. Optimisation des conditions opératoires.

- **Avant l'utilisation du kit.**

- laisser équilibrer les réactifs d'un kit pendant 30 minutes à la température ambiante (se conformer aux recommandations du fabricant),
- vérifier que le kit n'a pas atteint la date de péremption,
- ne jamais mélanger les réactifs de lots différents.

- **Pendant l'utilisation du kit.**

- respecter les dilutions et temps d'incubation,
- vérifier le volume de « dispense » et l'utilisation correcte des micropipettes. (Vérifier le calibrage de ces pipettes),
- s'assurer que la verrerie a bien été rincée à l'eau distillée avant utilisation puis séchée.

3.9. Méthodes de laboratoire.

➤ **Procédure de diagnostic biologique des salmonelloses majeures.**

- **Phase pré analytique.**

- Identification du patient
- Vérification de la demande d'examen
- Enregistrement du patient (nom et prénoms, âge, sexe, résidence, profession, ethnie, autres renseignements si besoin)
- Choix des matériels de prélèvement
- Identification des matériels de prélèvement
- Mise en confiance du patient
- Prélèvement proprement dit
- Traitement (centrifugation...), Transport et conservation des échantillons

- **Phase analytique.**

- Choix des tests, contrôles de qualités
- Exploitation des modes opératoires

- **Phase post analytique.**

- vérification des résultats des contrôles et du patient
- Validation technique /analytique des résultats par le technicien
- Validation biologique des résultats par le biologiste
- Exploitation des résultats, enregistrement
- Conservation des prélèvements
- Rendu des résultats aux prescripteurs/clients
- Archivage des résultats
- Gestion des déchets biomédicaux

➤ **Le prélèvement sanguin.**

- **Principes- Indications.**

Ce mode opératoire décrit les différentes étapes à suivre pour réaliser les prélèvements sanguins. Il s'applique à l'ensemble des prélèvements sanguins réalisés sous la responsabilité du laboratoire.

- **Prélèvements.**

Les prélèvements sont réalisés sous la responsabilité du biologiste et sont pratiqués par le personnel autorisé.

- **Matériel et Réactifs.**

- Corps et aiguille de système de prélèvement sous vide.
- tubes de prélèvement sous vide.
- Seringues à usage unique avec aiguille : 5, 10 et 20 ml.
- Tubes pour prélèvement traditionnel : conditionnements standards (5 ou 7ml) et pédiatriques (2ml).
- Garrot.
- Coton hydrophile.
- Alcool à 70° ou Alcool iodé, Polyvidone Iodée (Bétadine® solution)...
- Pansements.
- Boîte récupératrice d'aiguilles, poubelle pour déchets contaminés et poubelle pour déchets non contaminés.

NB : avant d'appeler le patient, il est nécessaire de vérifier la présence de tout le matériel indispensable au prélèvement.

• **Mode opératoire.**

Déroulement du prélèvement sanguin.

Le préleveur, muni du bulletin de demande d'analyse s'assure de l'identité du patient (nom, prénom et date de naissance).

Il s'assure de la conformité des conditions de prélèvement :

- État de jeun.
- Dernière prise de médicaments.
- Autres conditions si nécessaires.

Il s'enquiert de l'existence d'une éventuelle thérapeutique et sollicite, si nécessaire, des informations cliniques complémentaires et note ces informations sur le bulletin de demande d'analyse.

Il sélectionne les tubes à prélèvements (nature, contenance et nombre) en fonction des analyses prescrites (Cf Instructions «Choix des tubes»).

Il identifie les tubes en inscrivant le nom, le prénom, le numéro d'identification et la date.

- Antiseptie de la peau à l'aide d'un coton imprégné de solution antiseptique.
- Pose du garrot et recherche de la veine, à prélever rapidement.
- Utilisation d'aiguille stérile à usage unique obligatoire. Utiliser les tubes à prélèvement en fonction des analyses prescrites (Cf. Instructions « Choix des tubes»).
- Desserrer le garrot avant de retirer l'aiguille.
- Retirer l'aiguille tout en comprimant la veine avec un coton sec.
- Le patient assure la compression (et non pas la friction) pendant 2 à 3 minutes.

NB : En cas de prélèvement sur différents types de tubes, l'ordre de prélèvement suivant doit être respecté (le code couleur correspond aux anti-coagulants décrits dans le document Instructions)

« Choix des tubes »

ROUGE → BLEU → VERT → VIOLET et/ou NOIR → GRIS

➤ **Élimination de l'aiguille.**

Les aiguilles doivent être obligatoirement éliminées dans le récipient prévu à cet effet (boîte de sécurité), immédiatement après le prélèvement et au vu du patient. Le recapuchonnage est interdit.

3.9.1. Méthodes indirectes: Sérodiagnostic de Widal et Félix.

3.9.1.1. Conditions de prélèvement.

- Le prélèvement de sang veineux (en général au pli du coude) a été fait sur tube sec, préférentiellement à jeun.
- Le sang prélevé est laissé jusqu'à formation complète d'un caillot puis centrifugé à 3000 tours/ mn pendant 5mn.
- Après centrifugation, le sérum est extrait et testé par nos deux tests (agglutination sur lame et dilutions en tube).

3.9.1.2. Sérodiagnostic de Widal et Félix.

Il permet de détecter dans le sang la présence d'anticorps dirigés contre les antigènes des Salmonella : les anticorps anti-O et les anticorps anti-H par la méthode d'agglutination sur lame ou de dilution du sérum en tube. [12]

➤ **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 par action de l'alcool donnant une suspension antigénique O et à les préserver (sans chauffage ni action d'alcool) ce qui donne une suspension antigénique H.

Tableau III: Présentation d'un flacon de 50ml de réactifs.

Etiquetage	Code Bio-Rad
Salmonella Typhi antigène O (TO)	63402
Salmonella Typhi antigène H (TH)	63312
Salmonella Paratyphi A antigène O (AO)	63412
Salmonella Paratyphi A antigène H (AH)	63322
Salmonella Paratyphi B antigène O (BO)	63422
Salmonella Paratyphi B antigène H (BH)	63332
Salmonella Paratyphi C antigène O (CO)	63432

- Conservation des réactifs à +2-8°C
- Validité : jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret (y compris après ouverture).

➤ **Protocole**

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 floconneuse facilement dissociable par agitation [13].

➤ **Mode opératoire**

- **Matériels nécessaires :** Eau physiologique, tubes à hémolyse, incubateur ou bain-marie, gants à usage unique, pipettes réglables ou fixes pouvant distribuer de 10 à 1000µl et 1,2 à 10ml.

• **Technique rapide par centrifugation** (selon Bio-Rad)

Faire de façon séparée deux dilutions des sérums à tester :

Dilution au 1/10^e : 200µl de sérum pour 1800µl d'eau physiologique.

Dilution au 1/20^e : 100µl de sérum pour 1900µl d'eau physiologique.

On obtient alors deux premières dilutions : 1/10^e et 1/20^e

- Pour ce qui concerne la dilution au 1/10^e : On répartit dans une série de huit tubes, 100µl de cette dilution, et ajouter 900µl des suspensions antigéniques, la dilution finale est alors 1/100, puis on fait la lecture après centrifugation. Nous n'avons pas validé nos résultats par cette dilution en raison de la non précision du sérotype de Salmonella.

- Pour ce qui concerne la dilution au 1/20^e :

On prélève ensuite 700µl de la dilution réalisée au 1/20^e à laquelle on ajoute la même quantité d'eau physiologique (700µl) ce qui donne une deuxième dilution.

On répartit dans une série de huit tubes, 100µl de cette deuxième dilution, et ajouter 900µl des suspensions antigéniques, la dilution finale est alors 1/400.

On Centrifuge pendant 5 minutes à 3000 tours/mm pour faire sédimenter la suspension bactérienne, effectuer une lecture à la lumière par une légère agitation du tube en remettant le culot en suspension.

Si le résultat est positif, on observe une agglutination floconneuse facilement dissociable pour les antigènes H par contre elle est fine, granulaire et difficilement dissociable pour les antigènes O.

En présence d'une agglutination par exemple avec les suspensions TO et TH au 1/200 alors que tout est négatif recommencer l'opération avec des dilutions au 1/40 ; 1/80 ; 1/160 du sérum à tester ; afin de déterminer son titre ; ne procéder à ce 2^e test que pour les suspensions ayant agglutinées dans l'exemple TO et TH.

Les titres finaux seront 1/400 ; 1/800 ; 1 /1600.



Figure n°5: Agglutination par dilution dans un tube.

Source : référence [17]. Date de visionnement : Août 2010

- **Technique d'agglutination sur lame (Fortress Diagnostics Limited)**

- Elle se fait en déposant sur une lame propre 50 μ l de sérum du patient dilué au 1/10^e auquel on ajoute 25 μ l (une goutte) de suspensions antigéniques O ou H des Salmonelles respectives : Salmonella Typhi ; Salmonella Paratyphi A ; B et C.

On Constitue un mélange homogène par rotation de la lame doucement et continuellement pendant une minute.

- Si le résultat est positif on observe une agglutination en grumeaux du mélange contenant les antigènes
- En absence d'antigène le résultat est négatif et il n'y a pas d'agglutination.



Figure n°6 : Agglutination sur lame.

Source : référence [17]. Date de visionnement : Août 2010

➤ **Interprétation des résultats.**

• **Du point de vue qualitatif.**

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

Le sérodiagnostic de Widal et Félix est un test de présomption au diagnostic des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes car de nombreuses réactions antigéniques croisées sont possibles avec d'autres sérotypes de *Salmonella*, ou avec d'autres entérobactéries tels que *Yersinia pseudotuberculosis*, voire d'autres bacilles à Gram négatif non apparentés : c'est ce qui explique le mécanisme et les causes des faux positifs.

Enfin, le traitement antibiotique précoce diminue considérablement, ou même abroge totalement la réponse anticorps en réduisant la stimulation antigénique, dans ce cas les anticorps anti-O peuvent ne pas apparaître et les anticorps anti-H atteignent un taux faible et parfois, même ni les anticorps anti-O ni les anticorps anti-H n'apparaissent : c'est ce qui explique le mécanisme et les causes des faux négatifs.

En conclusion, le sérodiagnostic de Widal et Félix n'est pas le meilleur moyen de faire le diagnostic biologique de la fièvre typhoïde. [18]

• **Du point de vue quantitatif :**

Il faut noter que la quantité d'agglutinines n'est pas en rapport avec la gravité de la maladie, qu'en présence d'agglutination la réaction est dite positive.

- **Résultats faussement positifs**

La présence d'agglutinines TO seules peut être due à une infection par une *Salmonella* ayant un antigène O commun avec *Salmonella* Typhi, mais des antigènes H différents, il s'agit de plus souvent de *Salmonella enteritidis*. De même la présence d'agglutinines BO seules peut être due à une infection à *Salmonella Typhimurium*, par exemple, certaines souches de *Yersinia pseudotuberculosis*, à cause de communautés antigéniques, peuvent donner une agglutination avec TO (pour le séro groupe IV) ou avec BO (pour le séro groupe II). Des réactions faussement positives peuvent être observées au cours de certaines maladies : Le typhus exanthématique, des dysglobulinémies, des cirrhoses, le paludisme et certaines infections (entérobactéries, *Candida albicans*).

Des Salmonelles donnant lieu à des gastro-entérites peuvent s'accompagner de réactions sérologiques en raison des parentés antigéniques [13] [19].

3.9.2. Méthodes directes : Hémoculture et coproculture.

3.9.2.1. Hémoculture.

➤ **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 prélèvements. 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 cerveau.

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

- Milieux diphasiques
- Hémoline type castaneda.

Trois milieux sont utilisés (gelose sabouraud, gelose Mac Conkey et gelose au sang cuit). [10]

➤ **Transport - Enregistrement – Incubation.**

Les échantillons ou prélèvements 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 à 37°C.

➤ **Présentation du Bactec 9050.**

L'appareil "Bactec 9050 de chez Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Md." et d'autres automates d'hémoculture comme le "BacT- ALERT 3D Combination de chez bio-Mérieux", utilisent des méthodes de détection des flacons positifs basées sur différentes mesures du CO₂. Les microorganismes présents dans les bouteilles Bactec libèrent du CO₂ qui réagit avec un colorant présent dans le capteur de l'appareil. Ceci module la quantité de lumière qui est absorbée par un composant fluorescent du capteur. Les détecteurs photosensibles de l'instrument mesurent l'intensité de la fluorescence, laquelle correspond à la quantité de CO₂ libérée par les microorganismes. La mesure est ensuite interprétée par le système en fonction des paramètres de positivités pré-programmés [20].

Le système "BacT- ALERT 3D Combination" fonctionne grâce à une technologie colorimétrique développée par bioMérieux, la croissance des microorganismes dans chaque flacon est constamment surveillée par un réflectomètre très sensible. Tout changement de statut des flacons est enregistré par un signal sonore et visuel comme pour le Bactec [21].

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

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

Le Bactec 9050 fonctionne par un système d'agitation continue des flacons versus intermittent des Bactec des séries de grande capacité (Bactec 9120 et Bactec 9240) [20].

Il existe 5 types de flacons Bactec :

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

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



Figure n°7 : Flacon BD Bactec TM PEDS PLUS /F

Source : référence [24]

Date de visionnement : Juin 2010



Figure n°8 : BACTEC 9050

Source : référence [24]

Date de visionnement : Juin 2010

Traitement des hémocultures positives et des autres liquides biologiques.

• Protocole de techniques des hémocultures positives.

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

1. la bouteille du Bactec 9050 est retirée de l'appareil. Sa capsule en plastique est désinfectée avec de l'alcool, ensuite une aiguille de subculture est insérée à travers la capsule et immédiatement après nous préparons une coloration de Gram ainsi qu'une subculture de l'échantillon de sang en utilisant les milieux suivants selon le cas :
 - a. Milieu de gélose au sang de cheval ou de mouton ;
 - b. Milieu de gélose Mac Conkey ;
 - c. Milieu de gélose chocolat ;

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

2. Reporter tous les résultats sur la fiche de travail ;
3. Procéder à la lecture de la coloration de Gram :
 - a. Si aucun micro- organisme n'est détecté sur la lame de coloration, remettre la bouteille dans le Bactec 9050. Ceci devrait être fait le plus tôt possible dans les 3 heures qui suivent la sortie du flacon. Dans les 3 heures, le flacon de Bactec doit être subcultivé sur la boîte de gélose au sang, la boîte de gélose Mac Conkey et la boîte de gélose chocolat. Les boîtes et la bouteille sont incubées et observées pendant une durée de 5 jours (à compter de l'incubation de la bouteille). La bouteille est encore subcultivée si au bout de ces 5 jours aucun microorganisme n'a toujours pas été identifié ;
 - b. si des micro-organismes sont détectés, ne plus remettre la bouteille dans le Bactec 9050. Reporter sur la fiche de travail les résultats de la coloration de Gram (par exemple : CGPgr, CGPpr, CGPch, BGP, BGN, CoccoBGN, DCGN, Levures...)
4. Le service de pédiatrie est informé d'un résultat positif de la coloration de Gram ;

5. Si des cocci Gram-positif en paires ou en chaînettes sont observés, placer un disque de bacitracine (A) et un disque d'optochine (P) sur la gélose au sang de la subculture;
6. les boîtes contenant les subcultures sont placées dans l'incubateur à CO₂. Si la coloration de Gram est positive, la bouteille est incubée avec les boîtes ;
7. lorsqu'une croissance est observée, reporter sur la fiche de travail les références des boîtes dans lesquelles des colonies ont été observées. Faire une coloration de Gram sur ces colonies et reporter les résultats sur la fiche de travail. S'il existe plusieurs genres de colonies, l'aspect de chaque colonie bactérienne est aussi reporté ;
8. Si des cocci Gram-positifs sont observés, se référer à l'organigramme de travail comme suit :
 - Enregistrer les résultats des tests des disques d'optochine et de bacitracine ainsi que le test de la catalase ;
 - Si le micro- organisme est catalase- positif et ressemble au *Staphylocoque* (cocci Gram-positif en grappes), faire un test de coagulase. Si le micro- organisme est coagulase- positive, il faudrait l'enregistrer comme étant *Staphylococcus aureus*. Si le micro- organisme est coagulase négatif après 24 heures, il faudrait l'enregistrer comme étant *Staphylococcus* à coagulase négative ;
 - Si le micro- organisme est catalase- négatif, bêta- hémolytique, et bacitracine- positif (inhibé par la bacitracine), enregistrer le micro- organisme comme étant *Streptococcus* Groupe A ;
 - Si le test à la bacitracine ou à la catalase est flou, faire un PYR test. Si le PYR test est positif, enregistrer le micro-organisme comme étant *Streptococcus* groupe A ;
 - Si le micro- organisme est catalase négatif, bêta- hémolytique, et bacitracine négatif, faire les tests d'agglutination des streptocoques des groupes A et B. Enregistrer le micro-organisme comme étant *Streptococcus* bêta- hémolytique de groupe A, de groupe B ou non groupable ;
 - Si le micro- organisme est catalase négative, optochine- positif (inhibé par le disque d'optochine) et diplocoque Gram-positif, l'enregistrer comme étant *Streptococcus pneumoniae*. Si le test d'optochine est négatif ou non concluant, faire un test de «bile solubility». Si ce test de solubilité par la bile est positif,

- enregistrer le micro-organisme comme étant *Streptococcus pneumoniae* ;
- Si le micro- organisme ressemble au *Streptococcus* (catalase négative, cocci Gram-positif en chaînette), mais négatif au test du disque d'optochine et négatif au test de solubilité par la bile, effectuer le PYR test.
 - Si le résultat du PYR test est positif, enregistrer le micro-organisme comme étant *Enterococcus species*. Si le résultat du PYR test est négatif, enregistrer le micro-organisme comme étant *Streptococcus* alpha ou gamma hémolytique selon la réaction d'hémolyse ;
9. Si le micro- organisme est un bacille Gram-positif, aucun test additionnel n'est effectué, enregistrer seulement «Bacille Gram-Positif» ;
10. Si des bactéries Gram-négatif sont observées, la référence est faite à l'organigramme ainsi qu'il suit :
- Si le micro- organisme pousse sur la gélose au sang et la gélose Mac Conkey faire un test d'oxydase et inoculer une galerie API 20E. Les *Enterobacteriaceae* (tels que *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*) sont oxydase- négatifs ; les *Vibrio* et les *Pseudomonas* sont oxydase positive. Si les micro-organismes isolés sont identifiés comme étant *Salmonella*, *Shigella* ou *Vibrio*, confirmer le résultat par un test de sérotypage. Enregistrer le résultat de ces différents tests ;
 - Si le micro-organisme ne pousse que sur la gélose au sang de cheval ou de mouton et sur la gélose chocolat mais ne pousse pas sur la gélose Mac Conkey et est diplocoque Gram-négatif, *Neisseria meningitidis* pourrait être suspecté. Il faudra faire un test d'oxydase. Si l'identification préliminaire indique *Neisseria meningitidis*, le confirmer par un test de sérotypage ;
 - Si le micro- organisme ne pousse que sur la gélose au sang de cheval ou de mouton et sur la gélose chocolat mais pas sur la gélose Mac Conkey et se présente comme de petits bacilles Gram-négatif, nous pouvons suspecter *Haemophilus influenzae*. Faire un test d'oxydase et un test des facteurs X et V. Si l'identification indique *Haemophilus influenzae*, le confirmer par un test de sérotypage ;
11. Procéder à un antibiogramme par la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon Kirby- Bauer ;

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

➤ **Techniques utilisées pour l'identification des bactéries.**

• **Coloration de Gram.**

Principe.

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

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

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

Matériels et réactifs utilisés.

1. Microscope binoculaire avec objectifs 10 et 100
2. Huile à immersion
3. Coffret de colorants de Gram (BIOMERIEUX®) contenant :
 - Violet de gentiane ou cristal violet
 - Solution de lugol
 - Solution de décolorant alcool acétone
 - Safranine ou fuschine basique
4. Lames porte-objet
5. Portoir de lame
6. Crayon de papier
7. Papier buvard
8. Flacon d'eau distillée
9. Bac de coloration.

Procédure de la coloration.

1. Utiliser une lame propre sur laquelle sont écrits le nom du patient et l'identification du spécimen avec un crayon de papier. Ne pas utiliser de stylo à bille ;
2. Etaler l'échantillon en un frottis mince sur la lame de verre afin de permettre au frottis de sécher à l'air libre.

Ne pas surtout chauffer la lame pour faire sécher rapidement le frottis ;

3. Lorsque la lame est complètement séchée, la tenir contre l'incinérateur jusqu'à ce qu'elle soit tiède sans être brûlante au toucher ;
4. Recouvrir le frottis de lame avec le Violet de gentiane pendant 30 à 40 secondes ;
5. Verser le surplus de la solution de Violet de gentiane et rincer la lame avec un jet d'eau faible et ensuite égoutter l'excès d'eau. UTILISER un faible jet d'eau pour laver la lame, si non le spécimen se détache de la lame ;
6. Recouvrir le frottis avec la solution Iode- iodure (Solution de Lugol) pendant 30 à 40 secondes ;
7. Verser la solution de Lugol de la lame et la rincer avec un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau ;
8. Goutte à goutte la solution de décolorant alcool- acétone est versée sur la lame de manière à recouvrir entièrement le frottis ;
9. Immédiatement après, rincer la lame avec un faible jet d'eau. L'excès d'eau est égoutté ;

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

10. Recouvrir le frottis avec la solution de safranine (ou la fuschine basique) pendant 60 secondes (2 fois plus longtemps que les autres étapes) ;
11. Verser la safranine qui une minute plus tard est rincée en tenant la lame sous un faible jet d'eau, l'excès d'eau est égoutté. Prudemment, sécher la lame avec du papier buvard. Ne pas surtout 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 chaînettes et en grappes). La reconnaissance de ces caractéristiques peut aider à l'interprétation de la coloration de Gram.

Par exemple.

Cocci Gram-positif en grappes = *Staphylococcus*

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

Cocci Gram-positif en chaînettes = *Streptococcus*.

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

Cocci Gram-positif en paires = *Streptococcus pneumoniae* ou *Entérocooccus*

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

Bacilles Gram- positif : égale plusieurs micro-organismes

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

Cocci Gram-négatif en paires = *Neisseria*

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

Bacilles Gram-négatif = Plusieurs micro-organismes

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

➤ **Tests biochimiques et métaboliques.**

• **Oxydase.**

Principe.

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

Matériels et réactifs utilisés.

1. Papier buvard
2. Anse
3. Réactif d'oxydase : Phénylène- diamine

Procédure.

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

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

Interprétation.

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

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

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

• Facteurs X et V de Croissance des *Haemophilus*.

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

Matériels et réactifs utilisés.

1. Gélose trypticase soja (TSA) sans sang
2. Disques de facteurs V, X et X+V
3. Pinces pour disques d'antibiotique

Procédure.

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

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

- Placer immédiatement des disques X, V et XV sur la gélose. Les disques doivent être bien séparés;
- La boîte de gélose est incubée dans l'incubateur à CO₂ pendant une nuit.
- Enregistrer la croissance ou l'absence de croissance autour de chaque disque.

Interprétation.

- Si Croissance il y a autour du disque XV mais pas autour des disques X ou V et s'il n'y a pas d'hémolyse sur la gélose au sang = *Haemophilus influenzae*.
- Ensuite procéder aux tests d'agglutination pour déterminer s'il s'agit de *Haemophilus influenzae* type b.

Tout autre modèle de croissance = *Haemophilus species*.

- **Galeries classiques des *Enterobacteriaceae*.**

1. Test à l'ONPG.

Principe.

Bien que certaines bactéries possèdent une enzyme intracellulaire (E) capable de scinder la molécule de lactose en galactose et glucose (sucre fermenté par toutes les entérobactéries), comme par exemple la bêta galactosidase (en abrégé β gal) ; elles ne fermentent pas ou fermentent tardivement le lactose.

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

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

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

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

Technique.

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

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

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

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

2. Fermentation des hydrates de carbone.

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

Technique.

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

Lecture.

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

Les lectures sont poursuivies au maximum pendant 7 jours.

3. Recherche de l'urease.

Principe.

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

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



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

4. Recherche de l'indole.

Principe.

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

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

Technique.

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

Agiter et laisser reposer ;

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

5. Recherche du thiosulfate – réductase (production d'H₂S).

Principe.

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

Technique.

La production d'H₂S est recherchée de façon systématique sur le milieu de Hajna-Kligler dont on ensemence le culot par piqûre et la surface inclinée par stries, serrées et parallèles (noircissement plus ou moins prononcé de la pente et principalement du culot). La sensibilité de ce milieu est telle qu'il permet de détecter des traces d'H₂S.

6. Réaction de Voges- Proskauer.

Principe.

Les bactéries dites Voges – Proskauer positives (VP⁺) possèdent une voie métabolique particulière dans la fermentation des hexoses. A partir de l'acide pyruvique $\text{CH}_3\text{CO} - \text{COOH}$, produit d'oxydation du glucose, elles peuvent former de l'acétyle méthyle carbinol (= acetoïne) : $\text{CH}_3\text{CO} - \text{CHOH} - \text{CH}_3$ et du butane diol 2-3 : $\text{CH}_3 - \text{CHOH} - \text{CHOH} - \text{CH}_3$.

La présence de ces deux composés est décelée par la réaction de VP : en milieu fortement alcalin, ils sont oxydés en diacétyl : $\text{CH}_3\text{CO} - \text{COCH}_3$, qui réagit avec le groupement guanidine des peptones pour produire un complexe de couleur rose rouge cerise ; l'alpha – naphthol accélère cette réaction colorée.

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

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

Technique rapide.

- dans un tube de 22 x 220 mm, verser 1ml de milieu de Clark – Lubs,
- ensemercer avec une goutte d'une suspension bactérienne dense d'eau physiologique ou distillée,
- incuber pendant 18 24 heures à 37° OU 30° ou 22°C,
- après ce délai, ajouter 0.5 ml d'une solution alcoolique d'alpha naphthol (6g d'alpha naphthol dans une quantité suffisante d'alcool à 90° pour 100ml) et 0.5 ml de NaOH 4N
- chauffer avec précaution sur la flamme d'un bec Bunsen jusqu'à commencement d'ébullition,
- agiter pendant 30 secondes sur un agitateur vibreur type vortex. Une coloration rouge cerise franche indique une réaction de VP positive. Elle est stable pendant une heure (milieu CL)

7. Milieu synthétique au citrate de Simmons.

Principe.

Le milieu au citrate de Simmons est un milieu minéral synthétique tamponné avec comme source d'azote un sel d'ammonium et comme source unique de carbone et d'énergie du citrate, dont l'utilisation en aérobiose par certaines bactéries se traduit par leur croissance et l'alcalisation du milieu. Les entérobactéries, qui exigent des facteurs de croissance (auxotrophes, par exemple : *Salmonella Typhi* et les *Shigella*), ne peuvent pas pousser sur ce milieu.

Technique.

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

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

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

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

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

8. Recherche des décarboxylases et dihydrolase (LDC, ODC, ADH).

Principe.

Formant l'amine correspondante avec dégagement de CO₂.

Les décarboxylases présentant un intérêt taxonomique sont :

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

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

Il existe deux types de méthode pour leur recherche :

Alcalinisation de milieux glucosés par l'amine formée ;

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

Technique.

A partir d'une culture sur milieu gélosé nutritif, préparer une suspension bactérienne dense (environ 10⁹ bactéries/ml). Ensemencer les tubes 18 x 145mm en recouvrir la surface avec environ 1 à 2ml de l'huile de vaseline ; Dans la pratique, on peut ensemencer un tube témoin.

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

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

Lecture.

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

Coloration jaune : absence de décarboxylase

Coloration violet améthyste : présence d'une décarboxylase.

Pour l'ADH, se tenir compte que d'un virage violet franc (interférence de plusieurs enzymes) [18].

9. Milieu urée -indole.

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

➤ **Galerie moderne API 20E.**

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

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

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

Principe.

La méthode de diffusion des disques selon Kirby- Bauer est basée sur l'observation qu'il y a une corrélation entre la concentration minimale inhibitrice (CMI) et le diamètre de la zone d'inhibition de croissance bactérienne autour d'un disque d'antibiotique. La taille de la zone d'inhibition de croissance est déterminée par la sensibilité du micro-organisme à l'antibiotique, la concentration du

disque d'antibiotique, le taux de diffusion de l'antibiotique du disque et le taux de croissance du micro-organisme. En standardisant les conditions du test (exemple : préparation d'un seul antibiotique contenu dans le disque, milieu de culture spécial, atmosphère et durée d'incubation) et avec une concentration du micro-organisme du test, la zone d'inhibition mesurée sera corrélée avec la sensibilité du micro-organisme à l'antibiotique (exemple : plus la zone est grande, plus l'organisme est sensible).

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

Matériels et réactifs utilisés.

1. Gélose de Mueller- Hinton additionnée de 5% de sang de cheval (MHA- B)
2. Milieu de culture pour *Haemophilus* (HTM)
3. Solution saline stérile à 0,85 ‰
4. Standard 0,5 de Mc Farland
5. Disques antibiotiques pour test de sensibilité
6. Ecouvillons en coton stériles
7. Pipettes à sérum
8. Pincettes à disques et/ ou applicateur de disque

Conditions de stockage nécessaires.

- 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 ;
- solution saline stérile : A conserver au réfrigérateur ;
- 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 ;
- disques d'antibiotiques : Congeler les disques à -20°C ou à une température plus basse pour de longue conservation ;
- 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.

- 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 ;

- La gélose HTM (gélose spéciale) est utilisée pour les tests *Haemophilus*. La gélose MHA-B (Mueller Hinton au sang) est utilisée pour tous les autres tests ;
- 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.

NB : Ne pas utiliser de disques périmés.

- 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 ;
- Plonger un écouvillon stérile dans la suspension ajustée. Il est tourné plusieurs fois sur la paroi intérieure du tube au- dessous du niveau du liquide pour enlever l'excès de l'inoculum. Inoculer la surface entière de la boîte de gélose en faisant tourner la boîte d'approximativement d'un angle de 60 ° et ensemençer de nouveau. Faire tourner la boîte et l'ensemencement est répété jusqu'à trois fois pour s'assurer d'une distribution régulière de l'inoculum. A l'étape finale, le bord de la gélose est tamponné ;
- Inoculer une boîte pour *Haemophilus influenzae* ; pour *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ; deux boîtes de gélose sont inoculées pour les autres bacilles Gram négatifs;

- Laisser l'excès d'humidité s'absorber par la gélose pendant 5 à 10 minutes avant d'appliquer les disques d'antibiotiques. Placer les disques d'antibiotique sur la boîte en utilisant des pinces stériles. Le disque est pressé sur la surface de la gélose avec des pinces stériles pour s'assurer du contact complet avec la surface de la gélose. Ne plus enlever le disque une fois qu'il est arrivé au contact avec la surface de la gélose parce que l'antibiotique diffuse dans la gélose presque immédiatement.

Utiliser souvent des applicateurs de disques d'antibiotiques ;

- les disques d'antibiotiques suivants seront testés:
 - a. pour *Streptococcus pneumoniae*: Oxacilline 1 µg (pour le test de Pénicilline 10 UI), Céftriaxone 30 µg, Erythromycine 15 µg, Chloramphénicol 30 µg ;
 - b. pour *Staphylococcus aureus*: Pénicilline 10 UI, Oxacilline 1 µg, Céftriaxone 30µg ;
 - c. pour *Haemophilus influenzae*: Ampicilline 10 µg, Céftriaxone 30 µg, Chloramphénicol 30 µg ;
 - d. pour les autres bacilles Gram négatif

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

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

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

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

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

Interprétation.

1. tous les tests de sensibilité sont lus après 20 à 24 heures d'incubation. Si les examens sont lus plutôt ou après 24 heures, les résultats pourraient ne pas être précis ;
2. Mesurer les diamètres de la zone d'inhibition complète du disque, au millimètre près, en utilisant une règle posée sur la

face postérieure de la boîte. Les résultats d'Oxacilline de *Staphylococcus* sont interprétés en tenant la boîte face à la lumière afin que toute croissance puisse être mise en évidence. Toute croissance discernable dans la zone d'inhibition est indicatrice de la résistance à la Vancomycine ou à l'Oxacilline. Fréquemment ces colonies seront très petites ; alors il faudrait examiner les boîtes avec soins.

3. La limite est l'aire dans laquelle une croissance évidente est visible à l'œil nu, excepté la trace de la ligne de croissance à la lisière de la zone d'inhibition.
 - a. la croissance de larges colonies à l'intérieur d'une zone d'inhibition claire devrait indiquer un mélange de croissance. Si tel est le cas alors la sensibilité est mixée, reprendre le test. Si les colonies persistent dans la zone, il faut les considérer comme significatives ;
 - b. avec le Cotrimoxazole, les micro-organismes se développent au travers de plusieurs générations avant d'être inhibés. Nous ne tiendrons pas compte de la faible croissance, nous devons lire seulement les limites de la croissance en abondance ;
 - c. Se référer à la « carte de référence » pour l'interprétation des tests ;
 - d. les tests du disque de Pénicilline pour *Streptococcus pneumoniae* ne sont pas exacts. C'est la raison pour laquelle le disque d'Oxacilline 1 µg est utilisé. Ne pas reporter les résultats comme Oxacilline mais plutôt les reporter comme Pénicilline.

Compte-rendu.

1. reporter les résultats dès que l'identification du micro-organisme est complète ;
2. si le profil de sensibilité est atypique pour le micro- organisme identifié, l'identification et le test de sensibilité devraient être repris. Si les résultats restent atypiques, ils pourraient être discutés avec le superviseur du laboratoire ou le directeur avant de les reporter ;
3. quelques résultats avec les tests des disques de diffusion pourraient être irréalisables. Les micro-organismes fastidieux ou lents en croissance ne pourraient pas être testés par la méthode. En plus, des combinaisons de micro- organismes et d'antibiotiques ne peuvent pas être testés de façon fiable avec la méthode de diffusion des disques. Les guides suivants seraient utilisés pour ces micro- organisme:

- a. Reporter comme résistants tous les tests de *Salmonella* et *Shigella* avec des Aminoglycosides et les Céphalosporines de première et seconde générations;
- b. Si le *Staphylococcus* est résistant à l'Oxacilline, reporter Pénicilline et Céftriaxone comme résistants sans tenir compte de ce que le test du disque indique.

➤ **Conservation des cultures pures [11].**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Chaque souche porte une étiquette d'identification sur laquelle figurent : E B T / D ; N° B-P ; N° D et G I ; I P /E₂.

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

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

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

I P /E₂ : initiale du patient /Etude 2

➤ **Éléments de l'assurance de qualité.**

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

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

a. Le suivi des appareils

- i. Le relevé des températures quotidiennes : On procède à un relevé quotidien des températures pour les appareils suivants :
 - Congélateur de conservation des souches, température = - 65 à - 90°C.
 - Congélateur de conservation des disques d'antibiotiques et des facteurs d'identification, température = - 20 à - 30°C.
 - Réfrigérateurs de conservation des réactifs et des milieux de cultures, température = 2,8 à 8°C.
 - Automates d'hémoculture Bactec 9050.
- ii. Le suivi du niveau d'eau de l'incubateur : De l'eau distillée est utilisée en vue du ravitaillement en eau de l'incubateur.
- iii. Le nettoyage des filtres : Les filtres situés sur les côtés latéraux des Bactec sont nettoyés régulièrement.
- iv. Le contrôle de la turbidité de l'étalon de solution utilisé sur l'appareil Mc Ferland

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

- i. Les réactifs et les milieux de culture sont contrôlés en utilisant les souches de référence suivantes :
 - *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 ;
 - *Haemophilus para-influenzae* ATCC 7901 ;
 - *Haemophilus influenzae type b* ATCC 49247 ;
 - *Streptococcus* groupe B ATCC 12386 ;
 - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ;
 - *Streptococcus* groupe A ATCC 19615 ;
 - *Escherichia coli* ATCC 25922
- ii. Les milieux et les réactifs utilisés sont :
 - Les milieux de culture : gélose au sang de mouton et ou gélose au sang de cheval, gélose Mac Conkey, gélose Müller Hinton, gélose chocolat, gélose trypticase soja.
 - Les réactifs permettant la réalisation des techniques suivantes : Coloration de Gram, test de catalase, test de coagulase, test d'oxydase.
 - Les réactifs permettant la révélation de la galerie API 20 E,

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

3.9.2.2. Coproculture.

➤ Selles pour Coproculture.

• Prélèvement – Transport

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

• Technique de l'examen bactériologique des selles :

- Examen direct.

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

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

• Milieux de culture et Ensemencement.

On utilise des milieux sélectifs pour *Salmonella* comme le milieu de Rapapport. Ainsi, les cultures sont faites sur milieux d'enrichissement (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 la positivité de la coproculture se situe à la 2^{ème} semaine mais dès la 1^{ère} semaine, cette positivité commence et persiste durant toute la maladie.

- **Milieu Rappaport [10]**

Milieu sélectif d'enrichissement pour la recherche des Salmonelles



Aspect du milieu avant utilisation	Aspect du milieu après utilisation	Mode d'ensemencement	Sélectivité / composition
		<p>Ensemencer largement.</p> <p>Incuber 24 h à t°C optimale.</p>	<p>Vert malachite, MgCl₂ et pH acide => rendent le milieu très sélectif permettant un enrichissement en <i>Salmonella</i> à l'exception de <i>Salmonella</i> Typhi et <i>Salmonella</i> paratyphi A-B et C.</p>

Figure n°9 : Milieu sélectif d'enrichissement pour la recherche des Salmonelles.

Source : référence [10] Date de visionnement : Juillet 2010.

- Milieu Mac ConKey

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



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

Figure n°10 : 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 : référence [10] Date de visionnement : Juillet 2010.

Gélose SS [10]

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

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



Aspect du milieu avant et après utilisation	Mode d'ensemencement	Sélectivité / composition	Caractères recherchés	Résultats
<p>Aspect du milieu après utilisation</p>  <p>Aspect du milieu avant utilisation</p> 	<p>Isolement par la méthode des cadrans.</p> <p>Incuber 18 à 24 h à 37°C.</p>	<p>Le milieu contient 3 inhibiteurs :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Sels biliaires, -Vert brillant -forte concentration de citrate de sodium. <p>Ceux-ci empêchent la pousse de toutes bactéries Gram⁺, et rendent difficile la croissance des bactéries Gram⁻ autres que <i>Salmonella</i> et <i>Shigella</i>.</p>	<p>Le milieu contient du lactose pouvant être fermenté.</p> <p>Le milieu contient du thiosulfate pouvant donner du H₂S.</p>	<p>colonies rouges :</p> <p>lactose + colonies incolores :</p> <p>lactose, - colonies à centre noir : H₂S +</p>

Figure n°11 : Gélose *Salmonella-Shigella* milieu sélectif permettant l'isolement d'entérobactéries pathogènes.

Source : référence [10] Date de visionnement : Juillet 2010.

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

4. RESULTAT.

4.1. Résultat d'évaluation du laboratoire.

Cette évaluation a concerné le laboratoire dans sa totalité mais aussi les sections de sérologie (sérodiagnostic de Widal et Félix) et de bactériologie (coproculture et hémoculture).

Les résultats se présentent comme suit :

Tableau IV : Évaluation des conditions du bâtiment, fluides et généralités

Désignation	Pourcentage
Bâtiments, fluides et généralités	93%
Conditions du bâtiment	100%
Approvisionnement en fluides	100%
% de pièces techniques utilisées	100%
Nombre de pièces techniques (niveau dépendant)	100%
Possibilité de communication	100%
Couverture des maladies infectieuses	56%

Les conditions générales du bâtiment sont à 100 % avec une couverture des maladies infectieuses à 56%.

Tableau V : Évaluation de la biosécurité et de l'hygiène du laboratoire

Désignation	Pourcentage
Biosécurité et hygiène	90%
Utilisation de moyens de protections	60%
Procédures en biosécurité	100%
Formations en biosécurité	100%
Conditions de biosécurité	100%
Sécurité des équipements	67%
Élimination des déchets	100%
Documentation en biosécurité	100%

La biosécurité et l'hygiène sont assurées à 90% pour le laboratoire. Parmi les paramètres étudiés, les mesures de protection du personnel et la sécurité avec l'équipement sont assurées respectivement à 60% et 67%. En dehors de ceux-ci, les autres paramètres de biosécurité sont assurés à un taux satisfaisant (100%).

Tableau VI : Évaluation des prélèvements et de l'hygiène.

Désignation	Pourcentage
Prélèvements et hygiène	95%
Qualité des prélèvements reçus	90%
Procédures de prélèvement	100%
Qualité du formulaire de demande d'examen	90%
Esprit critique vis-à-vis des prélèvements	100%
Qualité des registres	78%
Examen macroscopique	100%
Devenir des spécimens	100%
Qualité de la traçabilité des spécimens	100%

Dans l'ensemble l'évaluation des prélèvements et l'hygiène sont à 95% avec l'esprit critique vis-à-vis des prélèvements appréciés à 100% avec une qualité de la traçabilité des spécimens à 100%

Tableau VII : Quantité minimum des équipements présents dans le laboratoire de sérologie (GBEA MALI)

Désignation	Quantité disponible
Bain marie	1
Balance de précision	0
Centrifugeuse	2
Congélateur -20°C	1
Congélateur-70°C	2
Connexion internet/an	1
Chronomètre	3
Etuve	2
Four	0
Générateur de secours	1
Equipement ELISA	1
Incubateur de grosse taille	1
Incubateur de petite taille	2
Machine à laver	1
Microscope binoculaire	2
Ordinateur+imprimante	3
Spectrophotomètre	2
Réfrigérateur 6°C	4
Moyenne	73%

La quantité minimum des équipements présents dans le laboratoire de sérologie est de 73%.

Tableau VIII : Évaluation des réactifs et approvisionnement

Désignation	Pourcentage
Réactifs et approvisionnement	68%
Préparation de réactifs faits maison	0%
Qualité de la gestion des réactifs	80%
Disponibilité de fonds pour les réactifs	40%
Utilisation de réactifs périmés	100%
Disponibilité du premier test	96%
Disponibilité de réactifs pour autres sérologies	90%

L'évaluation des réactifs et l'approvisionnement du laboratoire sont assurés à hauteur de 68% dans l'ensemble. La disponibilité de fonds pour l'achat des réactifs sont assurés à 40%.

Tableau IX : Évaluation de la qualité totale

Désignation	Pourcentage
Qualité totale	85%
Disponibilité de procédures d'analyse	100%
Présence de contrôle de qualité interne	100%
Participation à un contrôle de qualité externe	100%
Présence de fiches de relevés de températures	100%
Qualité de la maintenance préventive	60%
Réparation et réglage des instruments	33%
Disponibilité de documentation et de pièces détachées	100%

L'évaluation de la qualité totale est de 85% avec une disponibilité de procédures d'analyse, la présence de contrôle de qualité interne et la participation à un contrôle de qualité externe à 100%. Parmi les paramètres étudiés la réparation et réglage des instruments et la qualité de la maintenance préventive sont respectivement de 33% et 60%.

Tableau X : Récapitulatif de tous les paramètres étudiés avec les appréciations

PARAMETRES	TAUX	APPRÉCIATIONS
Bâtiment, fluides et généralités	93%	Bon
Biosécurité et hygiène	90%	Bon
Prélèvement et hygiène	95%	Bon
Équipements	73%	Assez bon
Réactifs et approvisionnement	68%	Bon
Qualité totale	85%	Bon
MOYENNE GÉNÉRALE	84%	Bon

Ce tableau nous donne une idée générale sur l'assurance qualité au laboratoire du CHU Gabriel TOURÉ en fonction des paramètres évalués dont la moyenne est de 84% dans le diagnostic des Salmonelloses majeures.

Source : logi-Evaluat-labo.xls

4.2. Nombre de tests effectués au laboratoire.

Notre étude a porté sur les résultats de 2072 échantillons de sérums analysés et répartis comme suit : 324 échantillons de sérums étaient positifs et 1707 échantillons de sérums négatifs.

Les résultats de la sérologie de Widal et Félix effectuée dans le cadre de notre étude sont consignés dans les tableaux et figures suivants :

Tableau XI: Répartition des patients en fonction de l'âge.

Ages	Effectifs	%
0-9 ans	185	8,93
10-19 ans	196	9,46
20-29 ans	378	18,24
30-39 ans	268	12,93
40 ans et plus	335	16,17
Indéterminée	710	34,27
Total	2072	100

La fréquence de demandes d'examen de sérodiagnostic de Widal et Félix était plus élevée chez les sujets de 20 à 29 ans soit **18,24%**.

Les patients dont l'âge n'était pas indiqué s'élevaient à **34,27%**.



Figure n°12: Répartition des patients en fonction du sexe

Les femmes étaient les plus représentées au cours de notre étude, soit une fréquence de **47,59%**.

On estimait à **7,48%** les patients chez qui n'était pas précisé le sexe.

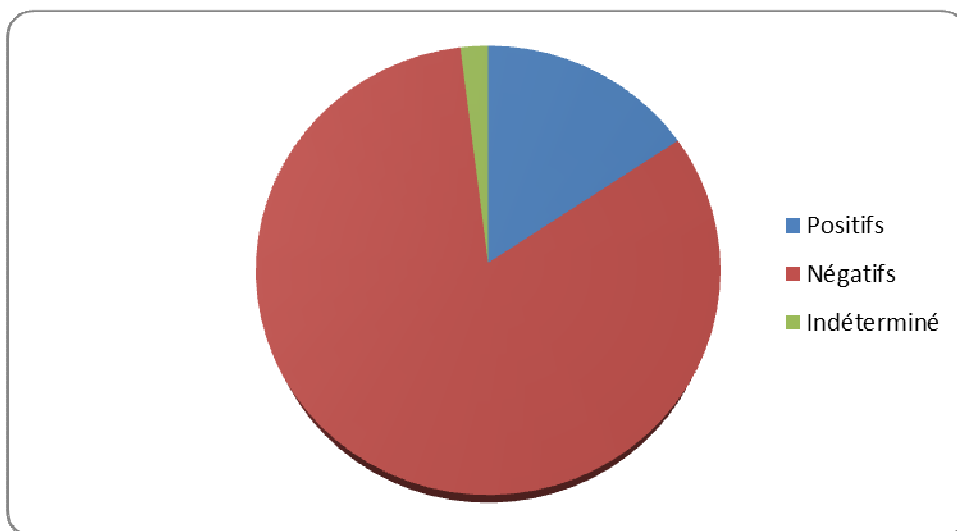


Figure n°13: Répartition des patients selon le résultat.

Les patients avec des résultats négatifs étaient de **82,38%**.

Les patients sans résultat étaient de **1,98%**.

Tableau XII : Fréquence des demandes d'examen de Sérodiagnostic de Widal et Félix pendant la période d'étude.

Mois	Nombre d'examen	%
Juin 2009	131	6,32
Juillet 2009	160	7,72
Août 2009	155	7,48
Septembre 2009	151	7,29
Octobre 2009	198	9,55
Novembre 2009	181	8,74
Décembre 2009	214	10,33
Janvier 2010	218	10,52
Février 2010	187	9,03
Mars 2010	166	8,01
Avril 2010	157	7,58
Mai 2010	154	7,43
Total	2072	100

Environ **10,52 %** des demandes d'examen de Sérodiagnostic de Widal et Félix ont été enregistrées pendant le mois de Janvier.

Tableau XIII : Répartition des résultats en fonction des tranches d'âge.

Tranches d'âge	Positifs	%	Négatifs	%	Indéterminés	%
0-9 ans	17	5,25	166	9,72	2	4,88
10-19 ans	17	5,25	172	10,08	7	17,07
20-29 ans	60	18,52	318	18,63	0	0,00
30-39 ans	34	10,49	231	13,53	3	7,32
40 ans et plus	63	19,44	263	15,41	9	21,95
Indéterminées	133	41,05	557	32,63	20	48,78
Total	324	100	1707	100	41	100

La tranche d'âge 40 ans et plus représentait **19,44%** des résultats positifs.

Environ **41,05%** des patients avec des résultats positifs ne comprenaient pas d'âge.

Tableau XIV : Répartition des résultats en fonction du sexe.

Sexe	Positifs	%	Négatifs	%	Indéterminés	%
Masculin	122	37,65	799	46,81	10	24,39
Féminin	174	53,70	799	46,81	13	31,71
Indéterminé	28	8,65	109	6,38	18	43,90
Total	324	100	1707	100	41	100

Le sexe féminin représentait **53,70%** des résultats positifs.

Les résultats positifs qui ne comprenaient pas de sexe étaient de **8,65%**.

5. COMMENTAIRES ET DISCUSSION.

La présente étude qui a porté sur la contribution à l'assurance qualité dans le diagnostic des salmonelloses majeures au laboratoire du CHU Gabriel TOURÉ a concerné 2072 prélèvements reçus de juin 2009 à mai 2010 pour le sérodiagnostic de Widal et Félix et l'évaluation du laboratoire dans sa totalité mais aussi et surtout les pratiques d'examen d'hémocultures, de coprocultures et sérologie de Widal et Félix. Compte tenu des objectifs, nous nous sommes limités aux registres de sérodiagnostic de Widal et Félix pour les données socio-démographiques. L'objectif de cette étude descriptive a été atteint, car la séroprévalence, le profil socio-démographique des patients concernés ont été déterminés et les problèmes affectant les activités de diagnostic de salmonelloses majeures ont été identifiés au cours de la période indiquée, ceci à travers le respect rigoureux de la méthodologie adoptée. Cette étude sur l'assurance qualité dans le diagnostic des salmonelloses majeures a été faite sur la base d'un traitement manuel, de saisies sur Word, de données enregistrées dans le logiciel Excel et les variables comme le sexe, l'âge et l'année ont été croisés avec le statut sérologique des patients. On a aussi noté les paramètres non précisés à l'enregistrement pour chaque patient.

Les résultats de cette étude qui a porté sur 2072 prélèvements reçus durant la période indiquée permettent d'avoir une image relativement claire du sérodiagnostic de Widal et Félix au laboratoire du CHU Gabriel TOURÉ. Notre étude ne saura être extrapolée à la population générale de Bamako pour un certain nombre de raisons qui sont :

1. La taille de l'échantillon n'est pas représentative de l'ensemble du District de Bamako ;
2. Le laboratoire du CHU Gabriel TOURÉ n'est pas le seul centre de diagnostic du District de Bamako ;
3. Le Laboratoire reçoit des malades hospitalisés, des malades venant des autres structures de santé de la ville ainsi que des malades venant d'autres localités que Bamako.

L'étude sur La contribution à l'assurance qualité dans le diagnostic des salmonelloses majeures est une action continue.

Cette étude permet d'avoir une description plus précise et détaillée de la situation des fièvres typhoïde et paratyphoïde et de la qualité

de l'enregistrement (paramètre important de l'assurance qualité) dans les formations sanitaires. Sur un échantillon total de 2072 patients, il a été enregistré 324 cas de positivité au sérodiagnostic de Widal et Félix, soit un taux de 15.64 % et 41 patients sans résultat, soit 1.98 %.

5.1. Du point de vue de la méthode.

La démarche qualité dans notre laboratoire a permis la mise en œuvre d'un ensemble de dispositions préétablies et systématiques destinées à donner confiance en l'obtention de la qualité et qui tournent autour des points suivants :

- Assurance de la Qualité (**AQ**) : Est l'ensemble des mesures prises dans le laboratoire qui garantissent que les résultats finaux rendus par le laboratoire sont aussi exacts que possible. Ceci a nécessité un contrôle des prélèvements, une mise en place des MON (Modes Opératoires Normalisés) une révision des procédés de transcription, l'utilisation des tests choisis comme étant les plus fiables et la vérification des comptes rendus des résultats du jour au jour;
- Contrôle de Qualité (**CQ**) : Comprenait les mesures qui étaient prises lors de la réalisation de chaque analyse afin de vérifier qu'elle se déroule correctement. Ceci comprenait la vérification des conditions de température correctes, de l'existence de témoin de contrôle, etc. Ce CQ indiquait si l'analyse en cours est valable et donne des résultats acceptables. Le contrôle de qualité n'indique pas cependant si les résultats sont exacts, ni s'ils ont été correctement enregistrés ;
- Évaluation de la Qualité (**EQ**) : Est le moyen de déterminer la qualité des résultats.
Ceci a consisté à envoyer des échantillons dans d'autre laboratoire pour une évaluation externe de la performance du laboratoire, L'évaluation de la qualité est mise en œuvre en vue de déterminer l'efficacité du programme d'assurance de la qualité.

5.1.1. Contraintes techniques.

Au cours de la réalisation de ce travail, nous avons été confrontés à certaines difficultés dominées surtout par la rupture de stock de réactif, ceci a contribué à limiter notre échantillonnage à 2072 patients et la non disponibilité de réactifs de contrôle utilisés comme témoin.

Nous n'avons pas pu différencier les vrais positifs des autres résultats positifs dus aux réactions croisées énumérées ci-dessus.

5.2. Les données sociodémographiques.

5.2.1. Age.

La tranche d'âge la plus prédominante était celle de 20 à 29 ans avec 18.24%. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'à cette tranche d'âge les manipulations manuelles sont plus fréquentes et préjudiciables à l'hygiène alimentaire, les fièvres typhoïde et paratyphoïde se retrouvant parmi les maladies des mains sales. Nos résultats sont similaires à ceux de Diarra C. qui a obtenu 27.96 % pour la même tranche d'âge [22] et de Sacko F. qui, lui, a eu une prédominance de la tranche d'âge de 21 à 30 ans. [23]

5.2.2. Sexe.

Le sexe féminin a été le plus retrouvé dans notre étude avec 47.59 %. Ceci s'expliquerait par le fait qu'il aurait eu plus de sexe féminin ayant consulté pendant la période de notre étude. Nos résultats s'approchent de ceux de Sacko F. [23] qui a eu 49,5% et supérieurs aux 42.38 % obtenus par Diarra C. [22]

5.3. Du point de vue des résultats.

5.3.1. Résultat de l'évaluation du laboratoire.

Les conditions générales du bâtiment sont à 100 %, la biosécurité et l'hygiène sont assurées à 90%, l'évaluation des réactifs et l'approvisionnement du laboratoire sont assurés à hauteur de 68% dans l'ensemble et l'évaluation de la qualité totale est de 85% avec une disponibilité de procédures d'analyse, la présence de contrôle de qualité interne et la participation à un contrôle de qualité externe à 100%. Parmi les paramètres étudiés la réparation et réglage des instruments et la qualité de la maintenance préventive sont respectivement de 33% et 60%. Tous ces résultats prouvent que le laboratoire de l'hôpital Gabriel TOURE se trouve à un niveau de qualité acceptable, ceci aborde dans le même sens que les travaux de Sangaré S.A. [24]

5.3.2. Résultat du sérodiagnostic.

La positivité totale s'estime à 15.64 %, ce qui est inférieur à celle obtenue par Diarra C. [22], 36.44 % en deux mois (Août et Septembre : hivernage au Mali). Cette discordance s'explique par le fait qu'à cette période l'on est plus vulnérable (exposition à la pluie, paludisme, consommation d'aliments crus...).

5.3.3. Résultat du sérodiagnostic par rapport au sexe.

Dans notre étude, le nombre de féminins positifs, 53.70 % est supérieur à celui de masculins, 37.65 %. Cette prédominance féminine a été rapportée par Sacko F. [23], qui trouvait 50.27 %.

5.3.4. Résultat du sérodiagnostic par rapport à l'âge.

Nous avons enregistré plus de positivité dans la tranche d'âge 40 ans et plus avec 19.44 %. Ceci pourrait être dû à la vulnérabilité du sujet âgé. Nos résultats sont différents de ceux de Sacko F. [23], chez qui on retrouve une prédominance de la tranche d'âge 20 – 29 ans.

5.3.5. Enregistrement des résultats de laboratoire.

Parlant d'Assurance de Qualité, nous avons voulu nous accentuer sur les cas de non-respect des règles d'enregistrement, ainsi il a été observé : 34.27 % de patients sans âges, 7.48 % de sans sexes, 1.98 % de sans résultats. Ceci est dû à la négligence du personnel (secrétaires et techniciens, infirmiers) par rapport à l'enregistrement qui constitue la base de toutes les données publiées. Nos résultats sont différents de ceux de Sangaré S.A. [24] qui trouvaient que l'enregistrement était de très bonne qualité.

Les Difficultés Rencontrées.

• Difficultés liées au prélèvement

- Les bulletins non-conformes n'authentifient pas la provenance de ces derniers et indirectement les qualificatifs du prescripteur

• Difficultés liées au local et à la gestion des déchets biomédicaux

- Manque de locaux pour les activités
- Paillasse non-conformes (anciennes paillasse de rangements de médicaments).
- Insuffisances dans la gestion des déchets.
- Manque de local approprié pour le stockage des consommables et réactifs.
- Manque d'équipement pour le stockage des sérums positifs

• Difficultés liées au personnel

- Manque de motivation du personnel
- Charge énorme de travail.
- Niveau bas de formation du personnel technique
- Manque de personnel surtout de biologiste

- **Difficultés liées à la technique**

- Mauvais circuit d'acquisition des équipements qui sont réalisés sans associer les techniciens de la biologie.
- Mauvais circuit d'acquisition des consommables et réactifs qui sont réalisés sans associer les techniciens de la biologie.
- Ruptures en consommables et réactifs de laboratoire.
- Mauvaise gestion des consommables et réactifs au niveau des dépositaires et sur les sites d'utilisation.

- **Difficultés liées au rendu des résultats**

- Non retrait des résultats par les patients et les prescripteurs

6. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.

La présente étude, portant sur la contribution à l'assurance qualité dans le diagnostic des salmonelloses majeures a été mise en œuvre par une combinaison de méthodes chez les patients orientés au laboratoire du Centre Hospitalier Universitaire Gabriel TOURÉ.

Les méthodes que nous avons utilisées au cours de notre étude sont : les méthodes d'agglutination et de dilution.

- L'assurance qualité au laboratoire du CHU Gabriel TOURÉ est assurée à 84% dans le diagnostic salmonelloses majeures.

La séropositivité globale, au test de Widal et Félix, de notre étude était de 15.64 %.

Les patients sans résultats étaient de 1.98 %.

Le sérodiagnostic reste une activité essentielle dans le processus de prise en charge; ceci impose une résolution permanente des problèmes (technique et organisationnel) qui entravent son bon déroulement et sa qualité au laboratoire du CHU Gabriel TOURÉ.

Cependant beaucoup reste faire pour assurer la qualité totale dans le diagnostic des salmonelloses majeures.

Ce faisant, nous recommandons :

Aux personnels du laboratoire du CHU Gabriel TOURÉ

-Assurer une démarche qualité dans leurs activités de tous les jours ;

- Mise en application du Guide de Bonne Exécution des Analyses (GBEA) dans tous les laboratoires.

Aux autorités de tutelle du CHU Gabriel TOURÉ

- Assurer la formation continue du personnel du laboratoire.

- Équiper un laboratoire de niveau hospitalo- universitaire et répondant aux normes.

- Mettre en place un système d'assurance qualité comprenant un cadre stratégique et les textes d'applications des normes d'accréditations.

Élaborer un plan de formation des techniciens à la maintenance des équipements.

7. BIBLIOGRAPHIE.

1. **Guide de Bonne Exécution des Analyses** de biologie médicale (décision 09-472/MS-SG du 02 Avril 2009 relatif à la bonne exécution des analyses biomédicales du Ministère de la Rép santé Bamako. MALI).
2. **Guide de Bonne Exécution des Analyses** de biologie médicale (Arrêté du 2 Novembre 1994 relatif à la bonne exécution des analyses biomédicales du Ministère des Affaires Sociales, de la Santé et de la Ville - France).
3. **World Health Organization** on behalf of the U.S. Centers for Disease Control and Prevention ; the World Health Organization; the Clinical and Laboratory Standards Institute®.2009 Laboratory Quality Management System - Training toolkit.
4. **LECLERC. H.** Microbiologie générale. 1983. 2^e Edition : 199-202.
5. **PERELMAN. C.D. et col.** . Infections à *Salmonella*-Salmonelloses. 1977. Pédiatrie pratique. Maloine s.a Editeur. Paris-France: 1103-11.
6. **CAVALLO. J.D., MEYRAN. M.** 1992. Les Salmonelloses et leur pathologie : base bactériologique du traitement. Med mal inf. 22: 331-9
7. **EDWARD. W. H.** Salmonella Species « including typhoid fever » In: 1985. principles and practices of infectious diseases 2^e ed. 53: 17-20
8. **Updated by: MICHAEL. C., MILONE., M.D., Ph.D.,** Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania MThe causative agent of typhoid fever is the bacterium *Salmonella Typhi*. (Image courtesy of the Centers for Disease Control and Prevention.) Medical Center, Philadelphia, PA.
9. **LE MINOR. L.** Les salmonelles. In: **Leminor L.** Bactériologie médicale. 1992. Flammarion. Paris-France: 259-74
10. **www.milieuxdeculture.com/** ©copyright Pr guillaume 2004.

11. **GLEDEL. J.** Institut Pasteur de LILLE. Cours de microbiologie des viandes et des produits alimentaires du 14 au 25 Septembre 1987. Laboratoire central d'Hygiène Alimentaire
12. **CAQUET. R.** Guide pratique des examens de laboratoire. 1994. 6^e Edition. Paris
13. **AZELE. F.** Bactériologie médicale. 1979. 10^e éd. Editions C et R: 10-26.
14. **MARCOU., MEURISSE. J. J.** .1992. Salmonelloses : aspects thérapeutiques. Med Mal Inf. 22: 340-7.
15. **ACHARYA. I. L., LOWE. C. U., THAPA. R. et coll.** 1987. Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella Typhi*. N Engl J Med. 317: 1101-04
16. **KEITEL. W. A., BOND. N. L., ZAHRADNIK J. M. B. et coll.** 1994. Clinical and serological responses following primary and booster immunization with *Salmonella Typhi* Vi capsular polysaccharide vaccines. Vaccine. 12: 155-59.
17. **FRAVALLO. P., LE FELLIC. M., QUEGUINER. S., SALVAT. G.** 2002. 2^{ème} colloque international Francophone de bactériologie. Vét. 5-6 Septembre 2002. Ploufragan France.
18. **LEMINOR. L., RICHARD. C.** Institut Pasteur. Méthode de laboratoire pour l'identification des Entérobactéries.
19. **FAUCHERE. J. L., AVRIL. J. L.** Bactériologie générale et médicale. 2002. Ellipses édition. Marketing S.A. 15: 247-48.
20. **BECTON. , DICKINSON AND COMPANY.** Septembre 2004. **BACTEC 9050 Manuel d'utilisation.** Numéro du document MA-0103. Révision : E Réf 445845.
21. **BERCHE P., GAILLARD J. L., SIMONET M.** Les bactéries des infections humaines. 1988. Flammarion. Paris-France: 77-92 et 572-592.
22. **DIARRA C.** 2008, Etude Comparative du Sérodiagnostic de Widal et Félix en Agglutination sur lame et le test de dilutions du sérum en tube au laboratoire d'analyses médicales du Gabriel TOURE, Thèse Pharm., N° 08P86, Bamako, Mali.

23. **SACKO F.** 2004, Evaluation d'un test rapide (sérodiagnostic qualitatif) dans le diagnostic de la fièvre typhoïde dans les centres de santé périphériques du District de BAMAKO. Thèse Med., N° 04M64, Bamako, Mali.
24. **SANGARE. S.A.** 2006, Démarche qualité au laboratoire de bactériologie CVD de l'hôpital Gabriel TOURE Février à Mars 2006. Thèse Pharm., N°75, Bamako, Mali.
25. **LABORATOIRE ABBOTT DIVISION DIAGNOSTIC 12**, rue de la Couture SILIC 203 F-94518 RUNGIS Cedex.
26. **ORGENICS** France S.A. 19, rue Lambrechts 92400 Courbevoie, France. 2006.
27. **DIABATE C. F.** 2006, Evaluer le role de salmonella typhi et paratyphi a, b, c, dans les infections bacteriennes invasives en milieu pediatrique à partir des liquides biologiques examines au laboratoire de l'hopital GABRIEL TOURE. Thèse Pharm., Bamako, Mali.
28. **SAMAKE M.**, 2003, Pratique de l'hémoculture au laboratoire d'analyses médicales de l'Hôpital Gabriel Touré, Aspects méthodologiques. Thèse Pharm., Bamako, Mali.
29. **SAMAKE T.**, 2003, Pratique de l'examen cyto bactériologique du liquide céphalorachidien au laboratoire d'analyses médicales de l'Hôpital Gabriel Touré, Aspects méthodologiques. Thèse Pharm., Bamako, Mali.
30. http://fr.wikipedia.org/wiki/Assurance_qualite
31. www.unilabs.fr/Infos-Patients/La-Qualite/
32. <http://www.pasteur.mg/IMG/pdf/demqual.pdf>
33. http://www.sante.gouv.fr/htm/info_pro/gbea/an_assurance.htm#haut
34. <http://www.labodvb.com/ManuelQualite.pdf>
35. http://www.sante.gov.ma/Departements/INH/ProjetL212/Atelier/Assurance_securite/Secu_au_lab_Hancali.pdf
36. www.lbj.fr MANUEL QUALITE
b. FICHE SIGNALETIQUE

c. Nom: TRAORÉ

d. Prénom: Allaye

e. Email : traorallaye@yahoo.fr

f. Tél : (00223) 66 64 72 24/ (00223) 76 63 81 40.

g. Titre de la thèse: Contribution à l'assurance qualité dans le diagnostic des salmonelloses majeures au laboratoire d'analyses biomédicales du CHU Gabriel TOURÉ.

h. Année : 2011 - 2012

i. Ville de soutenance : Bamako

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

k. Secteur d'intérêt: Bactériologie, Médecine.

1. RESUME.

- m. Notre travail a consisté à faire une description du cadre de l'étude et des différentes opérations réalisées pour procéder à une comparaison aux normes de qualité exigées et décrites par le Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale
- n. Notre objectif était de décrire quelques méthodes utilisées au laboratoire du CHU Gabriel TOURÉ, d'évaluer le laboratoire et d'analyser certaines caractéristiques socio-démographiques de la maladie sur un total de 2072 échantillons examinés au cours de la période 2009 à 2010.
- o. Il s'agit d'une étude rétrospective pendant la première année, 2009 et prospective pendant la seconde, 2010. Cette étude portait sur des malades, hospitalisés ou non, référés au laboratoire pour un diagnostic de salmonelloses majeures.
- p. Notre méthodologie comportait trois techniques constituées de sérodiagnostic de Widal et Félix, coproculture et hémoculture.
- q. Au terme de cette étude nous avons trouvé 324 cas de positivité au sérodiagnostic de Widal et Félix sur population de 2072 patients, soit 15,64%. L'évaluation de la qualité générale avec le logiciel « logi-Evaluat-labo.xls » pour les paramètres étudiés s'estimait à 84%.
- r. Cette étude sur le diagnostic des infections à salmonelles majeures dans une structure hospitalière comme le CHU Gabriel TOURÉ permettra de rehausser sans doute la qualité de celui-ci dans les Laboratoires.
- s. Cependant beaucoup reste à faire en matière d'assurance qualité.
- t. **Mots clés :** Assurance de qualité, salmonelloses majeures, diagnostic sérologique, diagnostic bactériologique.

FACTS.

Name: TRAORE

First name: Allaye

Email: traorallaye@yahoo.fr

Phone: (00223) 66 64 72 24 / (00223) 76 63 81 40.

Title of thesis: Contribution to the quality assurance in the diagnosis of the major salmonelloses at the biomedical analysis laboratory of the CHU Gabriel TOURÉ.

Year: 2011 – 2012

City of defens: Bamako

Place of deposit: Library of the Medical Faculty of Pharmacy and Odonto-stomatology.

Area of interest: Bacteriology, Medicine

ABSTRACT.

Our work consisted in making a description of the framework of the study and various operations carried out to proceed to a comparison to the standards of quality required and described by the Guide of Good Execution of the medical biology analysis.

Our objective was to describe some methods used at the laboratory of the CHU Gabriel TOURE, to evaluate the laboratory and to analyze certain socio-demographic characteristics of the disease on a total of 2072 samples examined during the period 2009 to 2010.

It is about a retrospective study during the first year, 2009 and prospective during the second, 2010. This study related to patients, hospitalized or not, referred to the laboratory for a diagnosis of salmonelloses major.

At the end of this study we found 324 cases of positivity to the serodiagnostic of Widal and Felix on population of 2072 patients is 15, 64%. The evaluation of general quality with the software "logi-Evaluat-labo.xls" for the studied parameters was estimated at 84 %.

This study on the diagnosis of the infections with major salmonellas in a hospital structure as the CHU Gabriel TOURE will make it possible to undoubtedly raise the quality of this one in the Laboratories.

However much remains to be made as regards quality assurance.

Key words: Quality assurance, salmonelloses major, diagnosis serologic, bacteriological diagnosis.

8. ANNEXES.

8.1. Annexe 1.

CHU GABRIEL TOURÉ

MODE OPÉRATOIRE NORMALISÉ

TITRE : Prélèvements Sanguins

Rédigé le : Par : TRAORE Allaye Visa :
Vérifié le : Par : COULIBALY Aminata Visa :
Approuvé le : Par : Dr Souleymane DIALO Visa :
Modifié le : Par : Visa :
Vérifié le : Par : Visa :
Approuvé le : Par : Visa :
Diffusé le : Par : Visa :
Objet de la modification : Archivé le : Par

**Document provisoire
opérationnel**

Document

Destinataires

Le biologiste Responsable	Responsable assurance qualité	Techniciens biologistes	Étudiants FFI
------------------------------	-------------------------------------	----------------------------	------------------

Exemplaires :

- **Classeur Assurance Qualité**
- **Classeur Laboratoire de sérologie,
Biochimie, Hématologie, Parasitologie**

Documents Qualité liés

MAQ : MQ

P : Procédure d'hygiène et sécurité

MO : Mode opératoire des prélèvements sanguins

E : Registre central

1. Buts

Décrire le mode opératoire de la réalisation des prélèvements sanguins.

2. Domaines et personnels concernés

Secteur pré-analytique. Les médecins, les biologistes, les pharmaciens, les infirmiers et les techniciens de laboratoire.

3. Abréviations/Définitions

4. Références

GBEA.

5. Contenu

MODE OPÉRATOIRE DES PRÉLÈVEMENTS SANGUINS

1. Principes- Indications

Ce mode opératoire décrit les différentes étapes à suivre pour réaliser les prélèvements sanguins. Il s'applique à l'ensemble des prélèvements sanguins réalisés sous la responsabilité du laboratoire.

2. Prélèvements

Les prélèvements sont réalisés sous la responsabilité du biologiste et sont pratiqués par le personnel autorisé.

3. Matériel et Réactifs

- Corps et aiguille de système de prélèvement sous vide.
- tubes de prélèvement sous vide.
- Seringues à usage unique avec aiguille : 5, 10 et 20 ml.
- Tubes pour prélèvement traditionnel : conditionnements standards (5 ou 7ml) et pédiatriques (2ml).
- Garrot.
- Coton hydrophile.
- Alcool à 70° ou Alcool iodé, Bétadine® ...
- Pansements.
- Boîte récupératrice d'aiguilles, poubelle pour déchets contaminés et poubelle pour déchets non contaminés.

NB : avant d'appeler le patient, il est nécessaire de vérifier la présence de tout le matériel indispensable au prélèvement.

4. Mode opératoire

Déroulement du prélèvement sanguin.

Le préleveur, muni du bulletin de demande d'analyse s'assure de l'identité du patient (nom, prénom et date de naissance).

Il s'assure de la conformité des conditions de prélèvement :

- État de jeun.
- Dernière prise de médicaments.
- Autres conditions si nécessaires.

Il s'enquiert de l'existence d'une éventuelle thérapeutique et sollicite, si nécessaire, des informations cliniques complémentaires et note ces informations sur le bulletin de demande d'analyse.

Il sélectionne les tubes à prélèvements (nature, contenance et nombre) en fonction des analyses prescrites (Cf Instructions « Choix des tubes »).

Il identifie les tubes en inscrivant le nom, le prénom, le numéro d'identification et la date.

- Antiseptie de la peau à l'aide d'un coton imprégné de solution antiseptique.
- Pose du garrot et recherche de la veine, à prélever rapidement.
- Utilisation d'aiguille stérile à usage unique obligatoire. Utiliser les tubes à prélèvement en fonction des analyses prescrites (Cf Instructions « Choix des tubes »).
- Desserrer le garrot avant de retirer l'aiguille.
- Retirer l'aiguille tout en comprimant la veine avec un coton sec.
- Le patient assure la compression (et non pas la friction) pendant 2 à 3 minutes.

NB : En cas de prélèvement sur différents types de tubes, l'ordre de prélèvement suivant doit être respecté (le code couleur correspond aux anti-coagulants décrits dans le document Instructions

« Choix des tubes »

ROUGE → BLEU → VERT → VIOLET et/ou NOIR → GRIS

Élimination de l'aiguille :

Les aiguilles doivent être obligatoirement éliminées dans le récipient prévu à cet effet (boîte de sécurité), immédiatement après le prélèvement et au vu du patient. Le recapuchonnage est interdit.

5. Hygiène et Sécurité

Le respect des mesures usuelles de précaution est obligatoire pour la manipulation des échantillons biologiques et des réactifs. Les déchets biologiques sont détruits selon la législation en vigueur.

8.2. Annexe 2.

Tableau XV: Durée et température de conservation après analyse de certains échantillons biologiques en fonction des examens demandés

EXAMENS BIOLOGIQUES ET ECHANTILLON	TEMPERATURE DE CONSERVATION	DUREE
Marqueurs tumoraux	- 18°C	1 an
Sérologie bactérienne	- 18°C	1 an
Sérologie virale	- 18°C	1 an
Sérologie parasitaire	- 18°C	1 an
Biologie moléculaire :	- 80°C	1 an
Mycobactéries	- 80°C	1 an
Virus de l'hépatite B	- 80°C	1 an
Virus de l'hépatite C	- 30°C	1 an
Chlamydia	- 80°C	1 an
Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)		
Diagnostic prénatal :		
Dosage des marqueurs sériques de la trisomie 21 fœtale dans le sang maternel.	- 18°C	1 an
Diagnostic des Embryofœtopathies infectieuses.	- 80°C	3 ans
Souches bactériennes	- 80°C	3 ans

8.3. Annexe 3. Définition des termes

Laboratoire de biologie médicale

C'est le site où sont effectués les actes d'analyses de biologie médicale par des personnels qualifiés, dans des locaux adaptés et avec un matériel approprié.

Analyses de biologie médicale

Les analyses de biologie médicale sont les examens biologiques qui concourent au diagnostic, au traitement ou à la prévention des maladies humaines ou qui font apparaître toute autre modification de l'état physiologique, à l'exclusion des actes d'anatomie et de cytologie pathologiques.

Ressources humaines

Ensemble des personnes occupant une fonction au sein du laboratoire. Le personnel doit avoir une qualification conforme aux textes réglementaires. Ce personnel a le devoir de se tenir constamment informé de l'évolution de la biologie médicale en participant aussi régulièrement que possible aux conférences, congrès, séminaires, ateliers organisés par les universités, les sociétés savantes et les associations professionnelles. Il doit participer aux programmes de formation continue destinés aux personnels sanitaires.

Les directeurs et responsables de laboratoires ont le devoir d'assurer la formation permanente de leur personnel dans le domaine de la biologie médicale. Tout le personnel exerçant dans un laboratoire d'analyses de biologie médicale public ou privé est soumis aux règles du secret professionnel et doit respecter les dispositions de ce guide.

-Biologiste

Toute personne titulaire des diplômes ou titres nécessaires, requis par la législation en vigueur, pour exercer la spécialité ou pour assurer la direction d'un laboratoire réalisant des analyses de biologie médicale.

Les dispositions de ce guide concernent également toutes les personnes médecin, pharmacien ou vétérinaire, qui participent à la production des actes de biologie médicale dans le respect de la réglementation en vigueur.

-Technicien

Toute personne titulaire d'un diplôme ou d'une qualification reconnue réglementairement pour assurer, sous la responsabilité du biologiste, l'exécution des analyses de biologie médicale. Sont considérés comme techniciens : les assistants médicaux, les techniciens supérieurs de laboratoire et les techniciens de laboratoire.

-Secrétaire

Toute personne contribuant à l'accueil des patients, à la mise en forme des documents utilisés ou établis par le laboratoire et à la remise des résultats.

- Personnel de surface

Toute personne qui, dans le laboratoire, assure, sous le contrôle des techniciens, la préparation et l'entretien des matériels nécessitant une attention particulière dans leur maniement et l'entretien des locaux.

Assurance de qualité

- **Qualité** : la qualité est l'aptitude d'un produit, d'un procédé ou d'un service rendu à satisfaire les besoins exprimés et implicites de l'utilisateur. Dans le domaine de la biologie médicale, c'est l'adéquation entre les moyens mis en œuvre et les informations attendues par le médecin prescripteur, ainsi que la réponse aux attentes du patient.

- **Maîtrise de la qualité** : ensemble des actions préétablies et systématiques nécessaires pour qu'un produit ou un service satisfasse aux exigences de qualité. Dans le domaine de la biologie médicale, l'assurance de qualité permet de maîtriser l'organisation des tâches conduisant à la qualité et couvre notamment les étapes pré-analytiques, analytiques et post-analytiques.

- **Contrôle de qualité externe ou CQE** : également connu sous le nom d'évaluation externe de qualité. Il correspond au contrôle, par un organisme extérieur, de la qualité des résultats fournis par un laboratoire. Ce contrôle rétrospectif permet une confrontation inter laboratoires en vue d'améliorer la qualité du travail de l'ensemble des participants. L'organisme extérieur adresse les mêmes échantillons aux différents laboratoires, collecte les résultats

obtenus, en fait l'étude et les transmet avec commentaires aux laboratoires participants.

- **Contrôle de qualité interne ou CQI** : ensemble des procédures mises en œuvre dans un laboratoire en vue de garantir la qualité des résultats des analyses au fur et à mesure de leur exécution.

Résultats ou comptes rendus d'analyses

Documents écrits, validés et signés par le biologiste ou le responsable du laboratoire comportant les résultats d'analyses qualitatifs et/ou quantitatifs accompagnés de commentaires aussi souvent que cela est nécessaire ou est prévu par la réglementation.

Confidentialité

Toutes les informations relatives aux patients sont confidentielles et doivent être protégées par le secret professionnel. Les résultats des analyses de biologie médicale ne peuvent être communiqués qu'au patient lui-même, à une tierce personne dûment mandatée par le patient, au praticien prescripteur et à tout autre praticien désigné par le patient sauf dérogations ou règles spécifiques prévues par la loi et les règlements en vigueur.

Echantillons et prélèvements

- **Prélèvement** : acte permettant l'obtention d'un échantillon biologique.
- **Echantillon biologique** : échantillon obtenu par recueil ou acte de prélèvement et sur lequel vont être effectuées des analyses de biologie médicale.
- **Echantillon de calibrage** : échantillon de composition définie qualitativement et quantitativement, adapté à la méthode utilisée, pour un ou plusieurs constituants, souvent par rapport à des étalons de référence et destiné au calibrage des analyses dans certaines disciplines biologiques.
- **Echantillon de contrôle** : échantillon adapté à la méthode utilisée et destiné à apprécier l'exactitude et la précision des résultats.
-

Evaluation

Etude des qualités d'un procédé, d'une technique ou d'un instrument permettant d'en préciser les caractéristiques et l'adaptation au but recherché.

Procédures

Opérations à effectuer, précautions à prendre et mesures à appliquer figurant sur des documents propres à chaque laboratoire. Ces procédures peuvent comporter des modes opératoires détaillés ou Modes Opératoires Normalisés (MON).

Qualification

Opération destinée à démontrer qu'un système analytique ou un instrument fonctionne correctement et donne les résultats attendus. Pour le personnel, la qualification correspond à la formation acquise et requise par la réglementation en vigueur. Elle est entretenue par la formation continue interne ou externe à laquelle le personnel du laboratoire est tenu de participer.

Système analytique

Ensemble des moyens analytiques constitués d'une méthode, d'un appareil, d'un (ou plusieurs) logiciel(s), d'un (ou plusieurs) réactif(s), d'un (ou plusieurs) échantillon(s) de calibrage, d'un (ou plusieurs) échantillon(s) de contrôle, qui permet de déterminer la nature d'un constituant ou sa concentration selon un mode opératoire défini.

Transférabilité

Qualité d'un procédé analytique permettant à celui-ci d'être utilisé dans un grand nombre de laboratoires ;

Qualité d'un résultat analytique permettant de comparer celui-ci avec ceux obtenus dans d'autres laboratoires.

Valeurs de référence

Résultats obtenus pour un constituant donné dans une population de référence dont les individus sont exempts de pathologie ou de traitement susceptibles de modifier leurs valeurs.

Les valeurs de référence peuvent varier notamment en fonction de l'origine géographique, du sexe et de l'âge des individus. Elles sont

exprimées généralement en tenant compte des limites inférieures et supérieures déterminées par étude statistique. Elles peuvent être établies par le biologiste, en fonction des techniques analytiques qu'il utilise, ou éventuellement vérifiées lorsqu'il emploie les données des publications scientifiques.

L'expression «valeur de référence» est préférable à celles de «valeur usuelle» ou de «valeur normale».

Validation

Opération permettant d'assurer qu'un résultat a été obtenu dans des conditions techniques satisfaisantes et que celui-ci est compatible avec le dossier biologique du patient. Cette validation est à la fois analytique et biologique.

- **La validation analytique** comporte la vérification de la conformité des conditions d'exécution aux procédures et tient compte notamment des résultats obtenus avec les échantillons de contrôle.

- **La validation biologique** est le contrôle de la vraisemblance et de la cohérence de l'ensemble des résultats des analyses d'un même dossier, et leur confrontation avec les résultats antérieurs.

Elle peut nécessiter la connaissance de l'état clinique du patient et les traitements mis en œuvre.

Elle est assurée par un biologiste ou le responsable du laboratoire.

Traçabilité

Mécanisme permettant de conserver les traces des analyses de biologie médicale, des contrôles effectués et les mesures correctives.

8.4. Annexe 4. Chronogramme des activités

Tableau XVI : Chronogramme des activités pour l'élaboration de la thèse.

	2009	2010	2011	2012
	J F M A M <u>J</u> J A S O N D			
Temps				
Activités	ASOND			
Paillasse	A _____	D		
Bibliographies		J _ F	M _ J	
Protocole		F _ M		
Analyse des données			M _____	J
Rédaction de la thèse			J _____	A
Lecture de la thèse			O __	D
Correction de la thèse			D _	J
Soutenue et archivée			J	

J: Janvier, F: Février, M: Mars, A: Avril, *M*: Mai, J: Juin, *J*: Juillet, A: Août, S: Septembre, O: Octobre, N: Novembre, D: Décembre.

SERMENT DE GALIEN



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

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer dans l'intérêt de la Santé Publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

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

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

Je le jure !