

**République du Mali**

*Un peuple-Un but-Une fois*

**Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako**



**Faculté de Pharmacie**

**Année universitaire 2017-2018**

**Thèse N°.....**

**Surveillance de la résistance aux antimicrobiens des souches de *Salmonella* isolées au Laboratoire Rodolphe Mérieux de 2015 à 2017 à Bamako au Mali.**

Thèse présentée à la faculté de Pharmacie  
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)

**par**

**Mr Aly MALLE**

soutenue publiquement le .....

**Jury**

Président : Pr Flabou BOUGOUDOGO

Membres : Pr Soukalo DAO

Dr Lassina Gadi TIMBINE

Dr Nouhoum SANGARE

Co-directeur : Dr Ibréhima GUINDO

Directeur : Pr Souleymane DIALLO II

**Thèse de Pharmacie**

1  
**Aly MALLE**

**Surveillance de la résistance aux antimicrobiens**  
**des souches de *Salmonella* isolées au**  
**Laboratoire Rodolphe Mérieux de 2015 à 2017**  
**à Bamako au Mali.**

**LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE  
ANNEE UNIVERSITAIRE 2017-2018**

**ADMINISTRATION**

DOYEN : **M. Boubacar TRAORE** –PROFESSEUR

VICE-DOYEN : **M. Ababacar I. MAIGA**- PROFESSEUR

SECRETAIRE PRINCIPAL : **M. Seydou COULIBALY** – ADMINISTRATEUR CIVIL

AGENT COMPTABLE : **M. Famalé DIONSAN** – INSPECTEUR DES FINANCES

**LES PROFESSEURS HONORAIRES**

|                     |          |                            |
|---------------------|----------|----------------------------|
| M. Mamadou          | KOUMARE  | Pharmacognosie             |
| M. Boulkassoum      | H AidARA | Législation                |
| M. Boubacar Sidiki  | CISSE    | Toxicologie                |
| M. Daouda           | DIALLO   | Chimie générale & minérale |
| M. Gaoussou         | KANOUTE  | Chimie Analytique          |
| M. Moussa           | HARAMA   | Chimie organique           |
| M. Abdourahamane S. | MAIGA    | Parasitologie              |
| M. Bréhima          | KOUMARE  | Bactériologie-virologie    |
| M. Kaourou          | DOUCOURE | Physiologie                |
| M. Elimane          | MARIKO   | Pharmacologie              |

|            |        |       |                   |
|------------|--------|-------|-------------------|
| M. Alou    | Amadou | KEITA | Galénique         |
| M. Mamadou |        | KONE  | Physiologie       |
| M. Mamadou |        | CISSE | Biologie Végétale |

## SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

### 1. Professeurs/Directeur de recherche

|              |  |        |                         |
|--------------|--|--------|-------------------------|
| M. Bakary M. |  | CISSE  | Biochimie               |
| M. Abdoulaye |  | DABO   | Biologie/parasitologie  |
| M. Alassane  |  | DICKO  | Santé publique          |
| M. Mounirou  |  | BABY   | Hématologie             |
| M. Amagana   |  | DOLO   | Parasitologie-Mycologie |
| M. Ousmane   |  | KOITA  | Biologie-Moléculaire    |
| M. Boubacar  |  | TRAORE | Parasitologie-Mycologie |

### 2. Maître de conférences/Maitres de recherche

|               |  |            |                                    |
|---------------|--|------------|------------------------------------|
| M. Flabou     |  | BOUGOUDOGO | Bactériologie-Virologie            |
| M. Mahamadou  |  | DIAKITE    | Immunologie-Génétique              |
| M. Souleymane |  | DIALLO     | Bactériologie-Virologie            |
| M. Bourèma    |  | KOURIBA    | Immunologie Chef de DER            |
| M. Abdoulaye  |  | DJIMDE     | Parasitologie-Mycologie            |
| M. Ousmane    |  | TOURE      | Santé publique/Santé environnement |

M. Akory Ag IKNANE Santé publique/Nutrition

### 3. Maître assistant/Chargé de recherche

Mme. Fanta SANGHO Santé publique/Santé Communautaire

M. Aldjouma GUINDO Hématologie

M. Charles ARAMA Immunologie

M. Seidina A S DIAKITE Immunologie

M. Ibrahima GUINDO Bactériologie-Virologie

M. Kassoum KAYENTAO Santé publique/Biostatistique

M. Issaka SAGARA Santé publique/Biostatistique

M. Mahamadou S SISSOKO Santé publique/Biostatistique

### 4. Assistants/Attaché de recherche

M. Issa DIARRA Immunologie

M. Klétigui C DEMBELE Biochimie clinique

M. Samba A SANGARE Bactériologie-Virologie

M. Seydou S COULIBALY Biochimie Clinique

Mme Djénéba COULIBALY Nutrition/Diététique

M. Djibril M COULIBALY Biochimie Clinique

M. Modibo DIARRA Nutrition

|                 |          |                                    |
|-----------------|----------|------------------------------------|
| Mme. Djénéba K  | DABITAO  | Biologie Moléculaire               |
| M. Souleymane   | DAMA     | Parasitologie Entomologie médicale |
| M. Laurent      | DEMBELE  | Biotechnologie Microbienne         |
| Mme. Fatou      | DIAWARA  | Epidémiologie                      |
| Mme. Merepen A  | GUINDO   | Immunologie                        |
| M. Oumar        | GUINDO   | Epidémiologie                      |
| M. Falaye       | KEITA    | Santé publique/Santé environnement |
| Mme. N'Deye L N | KOITE    | Nutrition                          |
| M. Birama A     | LY       | Santé publique                     |
| M. Yacouba      | MAIGA    | Biostatistique                     |
| M. Amadou B     | NANGALY  | Parasitologie-Mycologie            |
| M. Dinkorma     | OULOGUEM | Biologie Cellulaire                |
| M. Oumar        | SANGHO   | Epidémiologie                      |
| M. Djakaridia   | TRAORE   | Hématologie                        |

## **DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

### **1. Professeur/Directeur de recherche**

|           |         |                            |
|-----------|---------|----------------------------|
| M. Drissa | DIALLO  | Pharmacognosie             |
| M. Saibou | MAIGA   | Législation                |
| Mme Rokia | SANOOGO | Pharmacognosie Chef de DER |

## 2. Maître assistant/Chargé de recherche

|                        |                   |                                   |
|------------------------|-------------------|-----------------------------------|
| M. Yaya                | COULIBALY         | Législation                       |
| M. Loséni<br>M. Moussa | BENGALY<br>SANOGO | Pharmacie Hospitalière<br>Gestion |
| Mme. Adiaratou         | TOGOLA            | Pharmacognosie                    |

## 3. Assistant/Attaché de recherche

|                   |           |                         |
|-------------------|-----------|-------------------------|
| M. Bakary Moussa  | CISSE     | Galénique               |
| M. Bourama        | TRAORE    | Législation             |
| M. Hamma Boubacar | MAIGA     | Galénique               |
| M. Adama          | DENOU     | Pharmacognosie          |
| M. Mahamane       | H AidARA  | Pharmacognosie          |
| M. Issa           | COULIBALY | Gestion                 |
| M. Antoine        | DARA      | Sciences Pharmaceutique |
| M. Balla Fatogoma | COULIBALY | Pharmacie Hospitalière  |
| M. Karim          | TRAORE    | Sciences pharmaceutique |
| M. Seydou L       | COULIBALY | Gestion Pharmaceutique  |
| M. Daouda L       | DEMBELE   | Pharmacognosie          |
| M. Sékou          | DOUMBIA   | Pharmacognosie          |
| Mme. Assitan      | KALOGA    | Législation             |

|                    |        |                        |
|--------------------|--------|------------------------|
| M. Ahmed           | MAIGA  | Législation            |
| Mme. Aïchata Ben A | MARIKO | Galénique              |
| M. Aboubacar       | SANGHO | Législation            |
| M. Sylvestre       | TRAORE | Gestion Pharmaceutique |
| Mme. Aminata T     | TRAORE | Pharmacie Hospitalière |
| M. Mohamed dit S   | TRAORE | Pharmacie Hospitalière |

## **DER: SCIENCES DU MEDICAMENT**

### **1. Professeurs/Directeur de recherche**

|                   |         |                    |
|-------------------|---------|--------------------|
| M. Ousmane        | DOUMBIA | Pharmacie chimique |
| M. Benoît Yaranga | KOUMARE | Chimie analytique  |
| M. Ababacar I.    | MAIGA   | Toxicologie        |

### **2. Maître de conférences/Maitre de recherche**

|          |     |                        |
|----------|-----|------------------------|
| M. Sékou | BAH | Pharmacologie Chef DER |
|----------|-----|------------------------|

### **3. Maître assistant/Chargé de recherche**

|                |        |                    |
|----------------|--------|--------------------|
| M. Tidiane     | DIALLO | Toxicologie        |
| M. Dominique P | ARAMA  | Pharmacie Chimique |

### **4. Assistant/Attaché de recherche**

|              |         |                      |
|--------------|---------|----------------------|
| M. Mody      | CISSE   | Chimie thérapeutique |
| M. Ousmane   | DEMBELE | Chimie thérapeutique |
| M. Mahamadou | TANDIA  | Chimie analytique    |



|                      |           |                   |
|----------------------|-----------|-------------------|
| M. Madani            | MARIKO    | Chimie analytique |
| M. Blaise            | DACKOUO   | Chimie analytique |
| M. Mahamadou         | BALLO     | Pharmacologie     |
| Mme. Dalaye B        | COULIBALY | Chimie analytique |
| Mme. Fatoumata       | DAOU      | Pharmacologie     |
| M. Aboudarhamne      | DARA      | Toxicologie       |
| M. Aiguerou A        | GUINDO    | Pharmacologie     |
| M. Mohamed El Bechir | NACO      | Chimie analytique |
| M. Dougoutigui       | TANGARA   | Chimie analytique |
| M. Hamadoun A        | TOURE     | Bromatologie      |

## **DER : SCIENCES FONDAMENTALES**

### **1. Professeur/Directeur de recherche**

|              |        |                      |
|--------------|--------|----------------------|
| M. Mouctar   | DIALLO | Biologie Chef DER    |
| M. Mahamadou | TRAORE | Génétique            |
| M. Cheick F  | TRAORE | Biologie/Entomologie |

### **2. Maître de conférences/Maitre de recherche**

|            |         |                  |
|------------|---------|------------------|
| M. Lassana | DOUMBIA | Chimie appliquée |
|------------|---------|------------------|

### **3. Assistant/Attaché de recherche**

|           |      |                  |
|-----------|------|------------------|
| M. Moussa | KONE | Chimie organique |
|-----------|------|------------------|

|              |         |                      |
|--------------|---------|----------------------|
| M. Seydou S  | DIAKITE | Chimie organique     |
| M. Modibo    | DIALLO  | Génétique            |
| M. Abdoulaye | KANTE   | Anatomie             |
| M. Boureïma  | KELLY   | Physiologie médicale |
| M. Massiriba | KONE    | Biologie Entomologie |

#### **CHARGES DE COURS (VACATAIRES)**

|                 |           |                              |
|-----------------|-----------|------------------------------|
| M. Bouba        | DIARRA    | Bactériologie                |
| M. Boubacar     | KANTE     | Galénique                    |
| M. Yaya         | KANE      | Galénique                    |
| M. Massambou    | SACKO     | SCMP/SIMR                    |
| M. Atimé        | DJIMDE    | Bromatologie                 |
| M. Boubacar     | ZIBEIROU  | Physique                     |
| M. Cheick Oumar | BAGAYOKO  | Informatique                 |
| M. Babou        | BAH       | Anatomie                     |
| M. Adourahamane | COULIBALY | Anthropologie médicale       |
| M. Souleymane   | COULIBALY | Physiologie                  |
| M. Mamadou L    | DIARRA    | Biologie générale, Botanique |
| M. Modibo       | DIARRA    | Nutrition                    |
| M. Moussa I     | DIARRA    | Biophysique                  |

|                |         |                        |
|----------------|---------|------------------------|
| M. Babacar     | DIOP    | Chimie                 |
| M. Aboubakary  | MAIGA   | Chimie organique       |
| M. Modibo      | SANGARE | Anglais                |
| M. Sidi Boula  | SISSOKO | Histologie/Embryologie |
| Mme. Fatoumata | SOKONA  | Hygiène du milieu      |
| Mme. Fana      | TANGARA | Maths                  |
| M. Abdel Kader | TRAORE  | Pathologies médicales  |

## **DEDICACE**

**Je dédie cette thèse....**

**A ALLAH“ Soubhanal ahou wa ta alla”**, le tout puissant, le clément et le miséricordieux,

Qu m’a donné la vie et m’a accordé la chance de faire cette thèse.

**Au Prophète Mohamed**

Que les bénédictions et la paix de Dieu soient sur Toi. Nous te témoignons notre respect et notre gratitude pour tout ce que tu as fait pour le bien de l’humanité.

**A mon père, Amadou MALLE**

Tu es pour moi un exemple, pour ta loyauté, ton rigueur, ta servitude, et ton humilité. Que de sacrifice n’as-tu pas consenti pour faire de tes enfants, des modèles. Merci **Papa**, pour tout, je t’en serai toujours reconnaissant et défendrai avec honneur les valeurs que tu as épousées.

**A ma mère, Sonlo Dite Kadiatou BITCHIBALY**

Mamans, les mots me manquent pour exprimer ma gratitude. Tout ce que j’emploierai, sera faible mais sache que pour nous, tu as toujours agit en une mère exemplaire et tu nous as prodigué le respect, l’amour et la bonté. Ce travail est le fruit, le labeur de l’assistance et d’énormes sacrifices consentis pour tes enfants. Maman, qu’ALLAH puisse t’apporter santé, bonheur, et longévité.

## **Remerciements**

### **A mes frères et sœurs :**

Votre soutien moral, physique et fraternel a contribué à la réalisation de ce travail. Qu'il soit pour vous une source de motivation et de réussite. Qu'ALLAH puisse renforcer les liens sacrés qui nous unissent, ce travail est le résultat de votre précieux soutien. Il est un devoir pour nous dans l'honneur, la dignité, et le respect d'être à la hauteur de nos admirables parents.

### **A mon oncle et ma tante (la famille BITCHIBALY),**

Que ce travail soit le gage de mon amour et de mon affection indéfectible, qu'il puisse vous encourager à vous entraider les uns les autres pour consolider l'unité familiale.

A tous ceux qui de près ou de loin m'ont soutenu dans la réalisation de ce travail et dont j'ai oublié ici de mentionner le nom. Le stress qui accompagne ces moments peut me faire oublier de vous citer, mais sachez tous que vous avez marqué mon existence. Ce travail est aussi le vôtre.

**A Cousin Emmanuel**, tu m'as apporté tout au long de mes études universitaires, par de petites actions que je n'oublierai jamais, un soutien illimité. Par ce travail, reçois toute mon affection.

### **A mon bailleur du Point G, Dramane COULIBALY**

Votre soutien ainsi que vos encouragements et conseils m'ont toujours accompagné. Puisse le Seigneur faire que je vous sois éternellement reconnaissant.

### **Aux personnels et stagiaires du CICM et de l'hôpital Sominé DOLO de Mopti.**

Je vous suis très reconnaissant pour les connaissances que patiemment et avec dévouement vous m'avez transmises.

### **A la pharmacie Souleymane KONE**

Acceptez avec plaisir mes remerciements les plus sincères pour tout ce que j'ai appris avec vous, et aussi pour vos encouragements interminables. Mes très sincères remerciements et reconnaissances. Merci pour la formation à vos côtés.

**A mes maitres :** Merci pour vos précieux conseils et encouragements.

**A mes camarades, compagnons, amis(es) et promotionnaires** : Néma, A KONE, M Diakité, B Touré, A Cissé, D Gana, A P Somboro, K Keita, M N Diarra, D Konaté, Z Diombéra, F Daffé, A Dembélé, Y Traoré, Kamaté, B Diallo, Iya, M D Konaté, Demba, Sanogo, K Coulibaly, Kadi S, H Kanté, N'Diaye K, O Guindo, Mariam T, Sekou D, Sogoré, S Diassana, Y Togo, GROUPE ZAM-ZAM.

Que Dieu vous paie le soutien constant durant ma formation.

**A la 9<sup>ème</sup> promotion du numerus clausus, PROMOTION N'GOLO DIARRA,**

**A tous les étudiants de la FMOS et de la FAPH**

Merci pour tous ces moments formidables passés ensemble, que DIEU fasse de nous des bons pharmaciens et médecins pour la nation.

**MENTION SPECIALE**

**A Dr Ibréhima Guindo**

Les mots me manquent pour vous remercier, vous êtes quelqu'un d'exceptionnel. Plus qu'un encadreur vous avez été un ami pour nous. Les deux années passées ensemble ont été très riche, très productives et ponctué de rebondissements. Merci de votre aide, de vos conseils et encouragements. Puisse Dieu vous donner une vie longue et comblée.

**A Moussa MALLE**

Homme de grande rigueur, tu as été plus qu'un frère pour moi. Ce travail est le fruit de tous les efforts que tu as consenti pour le bon déroulement de mes études. Trouve dans ce travail, l'expression de ma profonde gratitude.

**A Korotoumou MALLE et Amy MALLE**

Par vos présences assidues à mes côtés, vous m'avez entouré, chérie, conseillé, aidé à surmonter de nombreuses difficultés. Bref, vous avez su combler toutes mes attentes. Amour profond à vous mes sœurs.

**Major Siaka KONE**

Les mots me manquent pour vous témoigner mon affection et admiration. Que l'entente règne entre nous pour toujours. Je vous souhaite tout le bonheur du monde, que Dieu vous aide à réaliser vos vœux.

**Thèse de Pharmacie**

## **HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY**

**A notre Maître et Président du jury**

**Professeur Flabou BOUGOUDOGO**

- **Pharmacien microbiologiste,**
- **Maitre de Conférences Agrégé en Bactériologie et Virologie à la Faculté de Pharmacie,**
- **Directeur de l'Institut National de Recherche en Santé publique (2005-2012)**
- **Chevalier de l'Ordre du Mérite de la Santé.**

Cher Maître, vous nous faites un grand honneur en assumant la présidence de notre jury de thèse. Permettez-nous de vous en remercier en toute sincérité et en toute gratitude.

## **A Notre Maître et Juge**

### **Professeur Soukalo DAO**

- **Professeur titulaire de Maladies Infectieuses et Tropicales;**
- **Chef de DER en médecine à la FMOS;**
- **Responsable de l'enseignement des Maladies Infectieuses à la FMOS;**
- **Investigateur clinique au Centre de Recherche et de Formation sur le VIH et la Tuberculose : SEREFO/FMOS/NIAD**
- **Président de la Société Malienne des Pathologies Infectieuses et Tropicales (SOMAPIT).**

Cher maître, nous vous sommes très reconnaissants d'avoir accepté de juger ce travail. Votre disponibilité et votre accueil nous ont permis d'apprécier vos qualités scientifiques et humaines. Cher maître, votre rigueur scientifique et l'amour pour l'excellence dans le travail font de vous un maître respecté.

Veillez agréer le témoignage de notre profond respect et de notre sincère admiration.



## **A Notre Maître et juge**

### **Docteur Lassina Gadi TIMBINE**

- **Docteur en pharmacie**
- **Biologiste chercheur**
- **Directeur du laboratoire Rodolphe Mérieux du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux.**

Cher maitre, vous avez été d'un apport indispensable à ce travail par non seulement vos qualités scientifiques mais aussi par votre soutien et encouragement infailible. Recevez ici cher maitre nos sincères remerciements et profondes grâtes envers votre personne.

## **A Notre Maître et Juge**

**Dr Nouhoum SANGARE**

- **Pharmacien biologiste;**
- **Responsable de l'unité Biochimie, Hématologie, Sérologie au Laboratoire Rodolphe Mérieux du Centre d'infectiologie Charles Mérieux (CICM), Bamako (2015-2018) ;**
- **Biologiste médical à l'unité laboratoire du Centre de Santé de Référence de la commune III.**

Cher maître, en acceptant d'apprécier ce travail, vous contribuez à son indispensable amélioration. Votre grande disponibilité et votre rigueur ont été un soutien de taille pour mener à bien ce travail. Nous vous en serrons éternellement reconnaissant.

## **A Notre Maître et co-directeur**

### **Docteur Ibréhima GUINDO**

- **Pharmacien biologiste;**
- **Chef du service bactériologie-virologie de l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP);**
- **Maitre-assistant de Bactériologie et Virologie à la Faculté de Pharmacie.**

Cher Maître, vous avez accepté de codiriger ce travail malgré vos multiples occupations. Homme de grande simplicité, nous sommes flattés d'avoir appris à vos côtés. Votre courage, votre ponctualité, votre rigueur scientifique, votre disponibilité, votre compréhension, votre sens de l'humour, votre sens élevé pour le respect de la dignité humaine sont entre autres des qualités enviées de tous. Vous resterez pour nous un exemple à suivre. Les mots nous manquent pour vous remercier. Cher Maître recevez-ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

**A notre Maître et Directeur de thèse**

**Professeur Souleymane DIALLO**

- **Pharmacien biologiste,**
- **Colonel Major à la retraite (Service de Santé des Armées),**
- **Professeur de Bactériologie et Virologie,**
- **Directeur Général du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux, Mali (2012-2017).**

Cher Maître, c'est un privilège et un grand honneur que vous nous avez fait en nous confiant ce travail. Au-delà de vos qualités de pédagogue reconnues par tous, nous avons découvert en vous un homme plein de générosité et de simplicité. Nous avons beaucoup appris à vos côtés particulièrement la rigueur scientifique, l'esprit d'équipe et l'éthique. Nous nous engageons à rester fidèle à vos enseignements tout au long de notre vie. Veuillez trouver en ces quelques mots l'expression de notre profonde gratitude.

## LISTE DES ABREVIATIONS

AKN = Amikacine  
AMC = Amoxicilline + Acide clavulanique  
AMOX = Amoxicilline  
API = Analytical profile index  
API 20E = Analytical profile index 20 pour entérobactéries  
ATB = Antibiotique  
ATCC = American Type Culture Collection  
BGN = Bactéries à Gram négatifs  
BLSE = Bêta-lactamase à spectre étendu  
C = cytosine  
C-1 = Ceftazidime-1  
C1G = céphalosporines de première génération  
C2G = céphalosporines de deuxième génération  
C3G = céphalosporines de troisième génération  
CAZ = Ceftazidime (30 µg)  
CNR-ESS = Centre National de Reference des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella*  
CEF/CTX = Cefoxitine  
CEFT = Ceftriaxone  
CEP = Céfépime  
CFT = Céfalotine  
CICM = Centre d'Infectiologie Charles Mérieux  
CIP = Ciprofloxacine  
CTX = Céfotaxime  
CXN = Cefalexine  
DNA = Desoxyribonucleic acid ou desoxyribose nucleic acid  
FOS = Fosfomycine  
G = Guanine  
GEN = Gentamicine  
IMI = Imipénème  
LCR = Liquide céphalo-rachidien  
LRM = Laboratoire Rodolphe Mérieux  
MDR = Multi Drug Resistant  
MDRTF = Multi Drug Resistant Typhoid Fever  
NAL = Acide nalidixique  
NOR = Norfloxacine  
PCR = Polymerase chain reaction  
PEF = Péfloxacine  
PLP = Protéines de liaison aux pénicillines  
PUR = Pipéracilline / Uréidopénicilline

*S. enterica* spp. arizonae = *Salmonella enterica* subspecies arizonae

*S. enterica* spp. enterica = *Salmonella enterica* subspecies enterica

*S. group* = *Salmonella group*

*S. Paratyphi A* = *Salmonella Paratyphi A*

*S. Paratyphi B* = *Salmonella Paratyphi B*

*S. Paratyphi C* = *Salmonella Paratyphi C*

*S. spp* = *Salmonella* (hors Typhi et Paratyphi)

*S. Typhi* = *Salmonella Typhi*

TIC = Ticarcilline

TIM/TCC = Ticarcilline + Acide clavulanique

TOB = Tobramycine

TSU = Co-trimoxazole (triméthoprim, sulfaméthoxazole)

TZP = Pipéracilline + Tazobactam

## LISTE DES TABLEAUX

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau I</b> : Entérobactéries colonisant habituellement l'homme et responsables d'infections .....                         | 36 |
| <b>Tableau II</b> : Caractères antigéniques des principales souches <i>S. enterica</i> .....                                    | 55 |
| <b>Tableau III</b> : Principaux caractères biochimiques des souches <i>S. enterica</i> et <i>S. bongori</i> . .....             | 57 |
| <b>Tableau IV</b> : Fréquence d'isolement en fonction des principaux genres. ....   | 79 |
| <b>Tableau V</b> : Fréquence d'isolement des bactéries à Gram à négatifs en fonction des différents types de prélèvements. .... | 80 |
| <b>Tableau VI</b> : Fréquence des salmonelles isolées en fonction des espèces. ....   | 81 |
| <b>Tableau VII</b> : Fréquence d'isolement des <i>Salmonella</i> en fonction du type d'échantillon. ....                        | 81 |
| <b>Tableau VIII</b> : Fréquence selon les espèces isolées et la nature des prélèvements. ....                                   | 83 |
| <b>Tableau IX</b> : Fréquence selon le sexe et les espèces isolées. ....  | 84 |
| <b>Tableau X</b> : Profil de résistance aux bêta-lactamines. ....   | 84 |
| <b>Tableau XI</b> : Profil de résistance aux quinolones. ....   | 85 |
| <b>Tableau XII</b> : Profil de résistance aux aminosides. ....  | 85 |
| <b>Tableau XIII</b> : Profil de résistance aux autres familles d'antibiotiques. ....  | 85 |

## LISTE DES FIGURES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1</b> : Structure bactérienne de la <i>Salmonella</i> (17). .....   | 53 |
| <b>Figure 2</b> : <i>Salmonella</i> vues au microscope électronique (à gauche) et optique (à droite) (20,21). ..... | 54 |
| <b>Figure 3</b> : Colonies de <i>Salmonella</i> après 24 h d'incubation sur le milieu SS (28).....                  | 59 |
| <b>Figure 4</b> : Les colonies de <i>Salmonella</i> sur gélose Hektoen après 24 h d'incubation (29). 60             |    |
| <b>Figure 5</b> : Fréquence d'isolement des bactéries à Gram négatifs durant la période d'étude. ....               | 78 |
| <b>Figure 6</b> : Fréquence des infections à Salmonelles par rapport au sexe. ....                                  | 82 |
| <b>Figure 7</b> : Fréquence d'isolement de <i>Salmonella</i> en fonction de la période. ....                        | 83 |



## SOMMAIRE

|  |    |
|--|----|
| <b>ADMINISTRATION</b> .....  | 3  |
| 1 Introduction .....   | 29 |
| 2 Objectifs .....  | 33 |
| 2.1 Objectif général .....   | 33 |
| 2.2 Objectifs spécifiques.....   | 33 |
| 3 Généralités .....  | 35 |
| 3.1 ENTEROBACTERIACEAE .....   | 35 |
| 3.1.1 Définition et classification .....   | 35 |
| 3.1.2 Habitat .....  | 37 |
| 3.1.3 Caractères cultureux .....   | 37 |
| 3.1.4 Caractères antigéniques .....  | 38 |
| 3.1.5 Pouvoir pathogène naturel .....  | 39 |
| 3.1.6 Sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques.....   | 40 |
| 3.1.6.1 Sensibilité aux bêta-lactamines.....   | 40 |
| 3.1.6.2 Sensibilité aux aminosides.....  | 45 |
| 3.1.6.3 Sensibilité aux quinolones .....   | 45 |
| 3.1.6.4 Sensibilité aux autres antibiotiques et antibactériens actifs sur les bacilles à Gram négatifs ..... | 46 |
| 3.1.7 Conservation des souches .....   | 46 |
| 3.1.7.1 Principes généraux.....  | 47 |
| 3.1.7.2 Moyens de conservation .....   | 47 |
| 3.2 Genre <i>Salmonella</i> .....  | 49 |
| 3.2.1 Historique .....   | 49 |
| 3.2.2 Taxonomie et nomenclature .....  | 50 |
| 3.2.3 Pouvoir pathogène et habitat .....   | 51 |
| 3.2.4 Caractères bactériologiques .....  | 52 |
| 3.2.4.1 Structures .....   | 52 |
| 3.2.4.2 Morphologie et colorabilité .....  | 53 |
| 3.2.4.3 Caractères antigéniques .....  | 54 |
| 3.2.4.4 Caractères biochimiques.....   | 56 |
| 3.2.4.5 Caractères cultureux .....   | 58 |
| 3.2.5 Diagnostic biologique.....   | 60 |
| 3.2.5.1 Diagnostic direct.....   | 60 |
| 3.2.5.2 Diagnostic indirect.....   | 61 |
| 3.2.6 Traitement.....  | 63 |
| 3.2.6.1 Traitement curatif .....   | 63 |
| 3.2.6.2 Traitement des porteurs .....  | 63 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 3.2.6.3 | Traitement préventif .....  | 64 |
| 3.2.7   | Autres salmonelloses .....  | 64 |
| 4       | Méthodologie.....   | 67 |
| 4.1     | Cadre de l'étude.....   | 67 |
| 4.2     | Type d'étude .....  | 68 |
| 4.3     | Période d'étude.....  | 68 |
| 4.4     | Population d'étude.....   | 68 |
| 4.5     | Echantillonnage .....   | 68 |
| 4.5.1   | Critère d'inclusion .....   | 68 |
| 4.5.2   | Critère de non-inclusion .....  | 68 |
| 4.6     | Collecte de données.....  | 68 |
| 4.7     | Variables.....  | 69 |
| 4.8     | Méthodes .....  | 69 |
| 4.8.1   | Matériels et réactifs .....   | 69 |
| 4.8.2   | Prélèvement .....   | 70 |
| 4.8.2.1 | Cas des hémocultures .....  | 70 |
| 4.8.2.2 | Cas des liquides pleural .....  | 70 |
| 4.8.2.3 | Cas des pus .....   | 71 |
| 4.8.2.4 | Cas des selles .....  | 71 |
| 4.8.2.5 | Cas des urines .....  | 71 |
| 4.8.3   | Acheminement des échantillons .....   | 71 |
| 4.8.4   | Examen direct.....  | 71 |
| 4.8.5   | Culture .....   | 72 |
| 4.8.6   | Identification.....   | 72 |
| 4.8.7   | Antibiogramme .....   | 72 |
| 4.8.7.1 | Contexte.....   | 72 |
| 4.8.7.2 | Technique .....   | 73 |
| 4.8.8   | Souchothèque.....   | 75 |
| 4.8.9   | Contrôle de qualité.....  | 75 |
| 4.9     | Analyse des données.....  | 75 |
| 5       | Aspects éthiques .....  | 75 |
| 6       | Diagramme de GANTT .....  | 76 |
| 7       | Résultats .....   | 78 |
| 7.1     | Résultats globaux.....  | 78 |
| 7.2     | Résultats descriptifs.....  | 81 |
| 7.3     | Profils de résistance aux principales familles d'antibiotiques testés. .... | 84 |
| 7.4     | Souches multi résistantes.....  | 86 |
| 8       | Discussions .....   | 89 |

|     |                       |     |
|-----|-----------------------|-----|
| 9   | Conclusion.....       | 94  |
| 9.1 | Recommandations ..... | 94  |
|     | ANNEXES .....         | 105 |

# 1. INTRODUCTION

## 1 Introduction

La découverte des antibiotiques a constitué un progrès médical extraordinaire, qui a permis d'améliorer le pronostic des infections. Cependant, une résistance à ces produits s'est rapidement développée et a évolué jusqu'à constituer un problème de santé important à l'échelle mondiale (1).

Elle constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale, la sécurité alimentaire et le développement.

Elle peut toucher toute personne, à n'importe quel âge et dans n'importe quel pays.

C'est un phénomène naturel mais le mauvais usage de ces médicaments chez l'homme et l'animal accélère le processus. Un nombre croissant d'infections, comme la pneumonie, la tuberculose ou la gonorrhée, la salmonellose, deviennent plus difficiles à traiter les antibiotiques utilisés pour les soigner perdant leur efficacité. La résistance aux antibiotiques entraîne une prolongation des hospitalisations, une augmentation des dépenses médicales et une hausse de la mortalité (2).

Sur le plan international, on s'inquiète de plus en plus de la résistance aux antimicrobiens (RAM ou AMR en terminologie anglo-saxonne), qui est actuellement estimée à plus de 700 000 décès par an dans le monde. Si aucune mesure appropriée n'est prise pour arrêter ses progrès, AMR coûtera environ 10 millions de vies et environ 100 milliards de dollars américains par an d'ici 2050. Malgré la menace présentée par l'AMR, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et le récent rapport O'Neill décrivent des lacunes importantes dans la surveillance, les méthodologies standard et le partage de données. Le rapport 2014 de l'OMS a identifié l'Afrique et l'Asie du Sud-Est comme les régions sans système de surveillance de la résistance aux antimicrobiens établis. Ce manque de données de qualité est problématique, conduisant souvent à des directives de traitement qui ne sont pas adaptées à la situation locale (3).

Les données récentes de la bibliographie abondent de descriptions de bactéries multi-résistantes voire toto-résistantes aux antibiotiques dont le nombre ne cesse de croître aussi bien dans les pays industrialisés que dans les pays en développement. La situation est alarmante dans les pays à ressources limitées où les maladies infectieuses, la pauvreté et la malnutrition sont endémiques. L'émergence des résistances aux antibiotiques est un processus complexe impliquant souvent les facteurs de l'hôte, des facteurs environnementaux et du pathogène. De plus, les lacunes dans le domaine de la santé notamment en termes de ressources humaines et/ou de capacité diagnostique conjuguées à un accès non réglementé aux antibiotiques contribuent au développement de la résistance bactérienne. Dans ce contexte d'escalade de la résistance aux antibiotiques, il ne faut pas oublier le problème qu'engendre également leur utilisation dans la filière animale.

Malgré l'importance du problème et de ses conséquences sanitaires et économiques, rares sont les pays d'Afrique de l'ouest qui disposent de programme national de surveillance et de lutte contre la résistance comme le recommande l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (4).

Les salmonelloses sont les principales causes des toxi-infections alimentaires collectives chez l'homme. On estime à 93,8 millions cas de gastro-entérites (5e- 95e percentile, 61,8-131,6 millions) dues aux *Salmonella*. On dénombre 155.000 décès, parmi eux 80,3 millions sont d'origine alimentaire (Shannon *et al.*, 2010). En pathologie humaine, les *Salmonella* sont divisées en sérotypes typhiques (*S. Typhi* et *S. Paratyphi*) et Sérotypes Non Typhiques. Contrairement au pays développés, en Afrique subsaharienne, les *Salmonella* non Typhoïques (NTS) sont identifiées comme les principales bactéries isolées dans le sang chez les adultes et les enfants et sont associées à 20 à 25% de décès (5).

On estime qu'un total de 400 000 cas surviennent chaque année en Afrique, soit une incidence de 50 pour 100 000 personnes par an. L'absence de diagnostic efficace conduit souvent à un traitement et une prise en charge inappropriés de ces infections. De plus, l'émergence et la propagation de souches de *S. Typhi* ayant une résistance multiple à presque tous les médicaments couramment disponibles dans la plupart des pays en développement ont constitué un défi majeur pour les systèmes de soins de santé, réduisant les options thérapeutiques, augmentant les risques de complications et la mort (6).

Les salmonelles font partie des micro-organismes dans lesquels des sérotypes résistants sont apparus, ce qui a des répercussions sur la chaîne alimentaire (7).

Des souches de *S. Typhi* portant la résistance au chloramphénicol, à l'ampicilline et au triméthoprime, appelées multirésistantes (MDR), ont été signalées dans de nombreux pays en développement notamment dans les pays d'Asie et d'Afrique (8).

La ciprofloxacine est devenue la première drogue dans les années 1980 à traiter les infections à *S. typhi* lorsque la plupart des médicaments conventionnels disponibles sont devenus inefficaces. Cependant, l'émergence de résistance à la ciprofloxacine dans le sud des pays asiatiques ont maintenant rendu les betalactamines à large spectre comme traitement de première intention.

Le chloramphénicol était le médicament de choix pour le traitement de la fièvre typhoïde jusqu'à la fin des années 1970. La première épidémie avec une mortalité élevée causée par un chloramphénicol résistant, la souche est apparue au Mexique en 1972 (CDC, 1972). À la même période, une deuxième éclosion s'est produite en Inde et plus tard, ces souches se sont propagées à d'autres pays d'Asie du Sud.

Actuellement, les céphalosporines de troisième génération sont le pilier pour traiter la fièvre entérique. Cependant, l'isolement de *S. Typhi* résistant au ceftriaxone au Bangladesh) et les rapports de souches cliniques avec un minimum plus élevé concentration inhibitrice (MIC) de l'Inde sont alarmants.

Néanmoins, l'utilisation imprudente de la ciprofloxacine a entraîné le développement de la résistance face à *S. Typhi* relançant ainsi l'utilisation de chloramphénicol pour le traitement des infections par ces bactéries (8).

La sensibilité réduite aux fluoroquinolones est également répandue, et sporadique. Des cas de résistance aux céphalosporines de troisième génération ou à l'azithromycine ont été signalés. La première émergence à grande échelle et la propagation d'un nouveau clone *S. Typhi* résistant à trois médicaments de première intention (chloramphénicol, l'ampicilline et le triméthoprim-sulfaméthoxazole) ainsi que les fluoroquinolones et les céphalosporines de troisième génération à Sindh, au Pakistan, classés résistants (XDR) ont été rapportés. Plus de 300 cas de typhoïde XDR sont apparus à Sindh, au Pakistan, depuis novembre 2016. De plus, un seul cas de typhoïde XDR associée au voyage a été récemment identifié au Royaume-Uni (9).

La fièvre typhoïde est encore moins bien comprise en Afrique et en Asie; en grande partie en raison de mauvaises ressources pour les laboratoires de diagnostic et les infrastructures insuffisantes pour soutenir des études épidémiologiques et cliniques. Les résultats d'une étude réalisée à Bamako en 2007 dans les différents CHU et l'INRSP ont montré que l'âge moyen était de 0,21 avec une prédominance dans la tranche d'âge de 21-40 ans. Ces affections étaient liées aux conditions de vie précaire et à l'insalubrité. Les sérotypes identifiés ont été : *Salmonella Typhi* (41,9%), *Salmonella Paratyphi B* (12,9%), *Salmonella Paratyphi A* (12,2%), *Salmonella Paratyphi C* (10,3%), TO+BO+ (5,4%) (10).

De juillet 2002 à juin 2014, 687 isolats de *Salmonella* non typhiques (NTS) d'une étude au Mali ont été obtenus ; un seul sérovar auprès de 667 enfants et 2 sérotypes de *Salmonella* auprès de 20 autres. Quatre sérotypes représentaient 87% des 687 isolats y compris *Salmonella Enteritidis* (35,5%), *Salmonella Typhimurium* (32,2%), et *Salmonella Dublin* (13,0%). La létalité de *Salmonella Enteritidis* (27,8%) était plus élevée que celle des autres sérotypes ( $p = 0,0009$ ). La maladie a montré un pic saisonnier après la saison des pluies et dans la saison fraîche et sèche. Depuis 2010, les cas d'infection à *Salmonella Enteritidis* ont augmenté et celles dues à *Salmonella Typhimurium* sont moindres (11). Au Mali peu de littératures abondent sur les recherches et les données sur les phénomènes de résistances aux antibiotiques de *Salmonella*.

C'est dans ce présent contexte que nous avons été amenés à entreprendre ce présent travail sur la surveillance de la résistance de *Salmonella* aux antibiotiques dans notre centre (CICM).

## **2. OBJECTIFS**



## **2 Objectifs**

### **2.1 Objectif général**

Evaluer la sensibilité et la résistance des souches de *Salmonella* isolées au Laboratoire Rodolphe Mérieux pendant la période d'étude (2015-2017).

### **2.2 Objectifs spécifiques**

- Déterminer la fréquence d'isolement des *Salmonella* au LRM pendant la période d'étude.
- Identifier les espèces de *Salmonella* responsables.
- Déterminer les types d'échantillons dans lesquels elles ont été isolées.
- Etudier le profil de sensibilité et de résistance des souches de *Salmonella* aux antibiotiques.

## **3. GENERALITES**

### 3 Généralités

#### 3.1 ENTEROBACTERIACEAE

##### 3.1.1 Définition et classification

La famille des Enterobacteriaceae est constituée de genres bactériens qui sont rassemblés en raison de caractères bactériologiques communs.

- Ce sont des bacilles à Gram négatif dont les dimensions varient de 1 à 6µm de long et 0,3 à 1µm de large.
- Mobiles par une ciliature péritriche ou immobiles
- Se développant en aéro-anaérobiose et sur gélose nutritive ordinaire.
- Acidifiant le glucose par voie fermentative (à la différence des *Pseudomonas*) avec souvent production de gaz.
- Ne possédant pas d'oxydase (à la différence de *Vibrio* et *Pasteurella*).
- Réduisant les nitrates en nitrites.

Les Enterobacteriaceae ont un G+C% du DNA compris entre 38 et 60 mol % (12).

La famille des Enterobacteriaceae regroupe différents genres :

- **Certains genres sont anciennement décrits et les plus souvent rencontrés en pathologie ; ce sont :**

*Escherichia, Shigella.*

*Salmonella, Arizona, Citrobacter.*

*Proteus, Providencia, Morganella.*

*Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Hafnia*

*Yersinia, Edwardsiella.*

- **D'autres genres, plus récemment décrits, sont parfois trouvés dans l'environnement et sont rarement isolés chez l'homme ; ce sont : *Buttiauxella,***

*Cedecea, Ewingella, Kluyvera, Koserella, Leclercia, Leminorella, Moellerella, Obesumbacterium, Rahnella, Tatumella, Trabulsiella, Xenorhabdus, Yokenella* (13).

**Tableau I** : Entérobactéries colonisant habituellement l’homme et responsables d’infections (14).

|  |  |   |
|--|--|---|
| <i>Citrobacter freundii</i> ;                | <i>Hafnia alvei</i>                                  | <i>Serratia marcescens</i>                |
| <i>Citrobacter (diversus) koseri</i>         | <i>Klebsiella pneumoniae</i>                         | <i>Serratia liquefaciens</i>              |
| <i>Citrobacter amalonaticus</i>              | <i>Klebsiella oxytoca</i>                            | <i>Shigella dysenteriae</i><br>(groupe A) |
| <i>Edwardsiella tarda</i>                    | <i>Klebsiella ozaenae</i>                            | <i>Shigella flexneri</i><br>(groupe B)    |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>                | <i>Morganella morganii</i><br><i>subsp. morganii</i> | <i>Shigella boydii</i><br>(groupe C)      |
| <i>Enterobacter cloacae</i>                  | <i>Proteus mirabilis</i>                             | <i>Shigella sonnei</i><br>(groupe D)      |
| Groupe <i>Enterobacter agglomerans</i>       | <i>Proteus vulgaris</i>                              | <i>Yersinia pestis</i>                    |
| <i>Enterobacter gergoviae</i>                | <i>Proteus penneri</i>                               | <i>Yersinia enterocolitica</i>            |
| <i>Enterobacter sakazakii</i>                | <i>Providencia rettgeri</i>                          | € <i>subsp. enterocolitica</i>            |
| <i>Enterobacter amnigenus</i>                | <i>Providencia stuartii</i>                          | <i>Yersinia intermedia</i>                |
| <i>Enterobacter (cancerogenous) taylorae</i> | <i>Salmonella</i> , tous les sérotypes               | <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>        |
| <i>Escherichia coli</i>                      |  |   |

### 3.1.2 Habitat

Le nom d'Entérobactérie a été donné parce que ces bactéries sont en général des hôtes normaux ou pathologiques du tube digestif de l'homme et des animaux.

La présence des entérobactéries dans le milieu extérieur résulte pour certaines espèces bactériennes de souillures fécales (importance en hygiène alimentaire) et pour d'autres de la pollution d'origine saprophyte.

On les rencontre donc abondamment dans le tube digestif, dans les cadavres d'animaux, les fumiers et les eaux d'égout. Elles peuvent aussi être trouvées dans le sol et beaucoup moins abondamment dans les poussières ou dans l'air, et par contamination, dans les eaux d'alimentation.

On peut aussi en retrouver à la surface des téguments et des muqueuses (15).

### 3.1.3 Caractères cultureux

Les entérobactéries se développent bien dans un bouillon que sur une gélose ordinaire incubée 18 heures à 37°C.

- Les formes S (smooth) sont l'aspect habituel au sortir de l'organisme.

Les colonies sont lisses, bombées, brillantes et humides, elles ont 2 à 4mm de diamètre.

Le bouillon est trouble de façon homogène.

- les formes R (rough) s'observent surtout avec des souches ayant subi plusieurs repiquages.

Les colonies sont rugueuses, sèches, à contours irréguliers et de teinte mate.

En bouillon, les formes R donnent un aspect grumeleux.

- **les colonies muqueuses** sont habituelles avec les *Klebsiella*. Leur diamètre peut dépasser 10mm ; elles ont une tendance à la confluence. On peut les rencontrer aussi avec d'autres espèces notamment *Salmonella* Paratyphi B.

- **les colonies naines** s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques. Elles ne sont pas exceptionnelles chez les *Escherichia coli* isolés d'infections urinaires (12).

### 3.1.4 Caractères antigéniques

**L'identification des Enterobacteriaceae** se fait par l'étude des caractères biochimiques. La détermination du sérotype ne peut être entreprise que pour des souches dont l'identification est certaine. Toute autre façon de faire ne peut qu'entraîner des erreurs du fait d'agglutinations croisées non spécifiques.

#### - les antigènes O

Ce sont des antigènes de paroi constitués de lipopolysaccharides (LPS) qui sont thermostables et résistent à l'alcool ou à l'acide.

Les réactions d'agglutination se produisent lentement, sont constituées d'agglutinats granulaires, difficilement dissociables par agitation.

La spécificité O est perdue par les souches R qui sont auto-agglutinables en eau distillée.

#### - Les antigènes H

Ce sont des antigènes flagellaires qui ne sont donc présents que chez les souches mobiles. Constitués d'une protéine, la flagelline, ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool.

Les réactions d'agglutinations se produisent rapidement, sont constituées d'agglutinats floconneux, facilement dissociables par agitation.

#### - Les antigènes K

Ces antigènes capsulaires sont généralement constitués d'une couche externe polysaccharidique. Parmi les antigènes K, se trouvent les antigènes L, A, B des *E. coli* et l'antigène Vi de certaines *Salmonella* ou *Citrobacter*. Ces antigènes peuvent rendre la souche qui les possède inagglutinable par les antisérums O. Ils sont détruits par une ébullition de deux heures.

Les antigènes d'adhérences ou adhésines, de nature protéique, en relation avec la présence de pili sont classés parmi les antigènes **K** (K88, K99)

#### - Antigène kunin

Cet antigène commun aux Enterobacteriaceae n'est pratiquement retrouvé que dans cette famille et a un intérêt taxonomique (12).

### 3.1.5 Pouvoir pathogène naturel

Sur le plan de la pathologie humaine il convient de distinguer, comme avec les autres espèces bactériennes :

Les **bactéries pathogènes spécifiques** (BPS) que l'on ne retrouve pas à l'état commensal (en dehors des porteurs sains) et dont la **présence dans les milieux extérieurs** n'est qu'un **phénomène transitoire**.

Les maladies qu'elles engendrent sont dues à un **défaut d'hygiène** et la **contamination** se produit soit par contact direct, soit par l'intermédiaire d'un vecteur (alimentaire ou animal). Citons les *Salmonella*, les *Shigella*, et les *Yersinia*.

Les **bactéries pathogènes opportunistes** (BPO).

Ces BPO peuvent provenir de la **flore digestive commensale** normalement résidente.

Les infections qu'elles peuvent engendrer ont pour origine :

Soit un point de **départ endogène**, ce qui s'explique par leur commensalité,

Soit un point de **départ exogène**. Il convient alors de distinguer deux aspects :

- l'un est rencontré dans l'**hospitalisme infectieux** où un défaut d'asepsie permettra la transmission à partir d'un milieu contaminé ou d'un malade, par instrumentation ou par voie manu portée ;

- l'autre s'explique par le fait que ces bactéries de la flore digestive peuvent se retrouver, par élimination, dans la nature à l'état transitoire. Si elles n'engendrent généralement pas d'infections elles sont cependant le signe d'une contamination fécale, voire d'un défaut d'hygiène. Ce problème est d'une importance toute particulière puisque c'est principalement de la recherche d'espèces commensales telles que *Escherichia coli*, entérocoques et *Clostridium perfringens* et de leur absence que dépend la qualité sanitaire d'une eau ou d'un produit alimentaire (15).

Les entérobactéries peuvent représenter 80% des isolats cliniquement significatifs des bacilles Gram négatifs et 50% des bactéries cliniquement significatives dans les laboratoires de microbiologie clinique. Ils représentent près de 50% des cas de septicémie, plus de 70% des infections urinaires et un pourcentage significatif d'infections intestinales (16).

### 3.1.6 Sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques

La sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques est variable en fonction de l'espèce (résistance naturelle) et de la souche (résistance acquise).

La résistance peut toucher toutes les familles d'antibiotiques habituellement actives sur les entérobactéries. Elle résulte de quatre mécanismes : imperméabilité, efflux, modification de la cible de l'antibiotique ( PLP), production d'enzymes (17).

#### 3.1.6.1 Sensibilité aux bêta-lactamines

##### - Résistance naturelle ou phénotypes « sauvages »

Les entérobactéries produisent naturellement diverses bêta-lactamases ce qui permet de les classer en quatre groupes phénotypiques de résistance.

##### **Groupe 0 : phénotype « sensible » d'espèces dépourvues de gène de bêta-lactamase.**

*Salmonella spp.* et *P. mirabilis* sont dépourvus de bêta-lactamase à l'état « sauvages » et sont naturellement sensibles aux aminopénicillines, carboxy-pénicillines, uréïdopénicillines, à l'aztréonam, aux cephalosporines et aux carbapénèmes.

##### **Groupe 1 : phénotype « sensible » d'espèces produisant naturellement une céphalosporinase de classe C**

Comme les espèces précédentes. *E. coli* et *Shigella spp.* sont naturellement sensibles aux aminopénicillines, carboxypénicillines, uréïdopénicillines, à l'aztréonam, aux céphalosporines et aux carbapénèmes. Cependant, elles produisent à très bas niveau une céphalosporinase chromosomique non inductible de type AmpC (groupe fonctionnel 1) qui peut entraîner, chez certaines souches, une réduction de sensibilité aux aminopénicillines, à leurs associations au clavulanate et/ou aux C1G.

La fréquence du phénotype « sauvage » chez *E. coli* est en moyenne de 50% en milieu hospitalier.

##### **Groupe 2 : phénotype « pénicillinase de bas niveau »**



*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter amalonaticus* et *Escherichia hermanni* produisent naturellement et de façon constitutive des enzymes chromosomiques de classe A sensibles aux inhibiteurs :

- SHV-1 (groupe fonctionnel 2b) ou LEN-1 (groupe 2a) pour *K. pneumoniae*,
- Les enzymes de type OXY (groupe 2be) pour *K. oxytoca*,
- Les enzymes CKO pour *C. koseri*,
- L'enzyme CdiA (groupe 2b) pour *C. amalonaticus*,
- L'enzyme HER-1 (groupe 2b) pour *E. hermanni*

Elles confèrent une résistance patente aux aminopénicillines et aux carboxypénicillines et souvent inapparente aux uréidopénicillines. Ce phénotype de résistance, appelé « pénicillinase de bas niveau », se caractérise par la persistance d'un diamètre d'inhibition autour des disques d'aminopénicillines (contrairement au phénotype « pénicillinase de haut niveau ou pénicillinase acquise » caractérisé par l'absence de diamètre d'inhibition autour de ces disques). Les associations pénicilline- inhibiteur sont actives.

Règles de lecture interprétative : La résistance aux pénicillines et tout particulièrement aux uréidopénicillines, peut être de bas niveau. Tous les résultats « sensibles » doivent être interprétés « intermédiaires » pour ces molécules chez les espèces appartenant au groupe 2.

### **Groupe 3 : phénotype « céphalosporinase de bas niveau »**

Les entérobactéries appartenant à ce groupe réunissent des espèces productrices de céphalosporinases de classe C (AmpC, groupe fonctionnel 1) chromosomiques et inductibles par les bêta-lactamines (molécules fortement inductrices : céfoxitine, imipénème, clavulanate). Ces céphalosporinases sont très répandues chez les entérobactéries isolées en bactériologie clinique : *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* (et les autres espèces de ce genre), *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri* et *Pantoea agglomerans*.

Le phénotype « sauvage » de ces espèces, souvent appelé « céphalosporinase de bas niveau » comprend une résistance aux aminopénicillines, à leurs associations aux bêta-lactamines inhibitrices et aux C1G. Le comportement vis-à-vis des C2G et des

céphamycines permet de répartir les espèces en 3 sous-groupes : (i) les espèces sensibles au céfuroxime (C2G) et à la céfoxitine (céphamycine) : *H. alvei*, *P. rettgeri*, *P. stuartii*, *P. agglomerans* ; (ii) les espèces plus résistantes à la céfoxitine qu'au céfuroxime : *E. cloacae*, *E. aerogenes* et *C. freundii* ; (iii) les espèces plus résistantes au céfuroxime qu'à la céfoxitine : *S. marcescens* et *M. morganii*.

La fréquence du phénotype « sauvage » est variable selon l'espèce et la situation épidémiologique du moment où du lieu considéré. Le phénotype sauvage est cependant plus fréquent chez les espèces *H. alvei*, *P. rettgeri*, *Providencia* spp. et *M. morganii* (65 à 85%) que chez *C. freundii*, *E. cloacae* et *E. aerogenes* (38 à 65%).

Les espèces *Proteus vulgaris* et *Proteus penneri* appartenaient initialement à ce groupe. Pour des raisons phénotypiques et moléculaires, il est plus cohérent de les inclure dans un nouveau groupe 5 correspondant au phénotype « céfuroximase ».

#### **Groupe 4 : *Yersinia enterocolitica* et *Serratia fonticola***

*Y. enterocolitica* et *S. fonticola* produisent naturellement une céphalosporinase inductible de classe C (groupe fonctionnel 1) et une enzyme de classe A. Chez *Y. enterocolitica*, cette dernière est une pénicillinase constitutive de classe A produite à bas niveau (groupe fonctionnel 2b). Chez *S. fonticola*, l'enzyme de classe A est une bêta-lactamase inductible de la classe 2be (SFO-1 et apparentées).

*Y. enterocolitica* est résistante aux aminopénicillines, à leur association avec le clavulanate, aux carboxypénicillines et aux C1G. La résistance aux uréidopénicillines n'apparaît pas *in vitro*. Le phénotype de résistance de *S. fonticola* est similaire. Cependant, le céfuroxime n'est pas actif et la résistance à l'association aminopénicilline-bêta-lactamine inhibitrice, qui devrait normalement être induite par l'enzyme AmpC, ne s'exprime pas ou à très bas niveau *in vitro*

#### **Groupe 5 : phénotype « céfuroximase »**

*P. vulgaris* et *P. penneri* produisent naturellement une céphalosporinase de classe A inductible par les bêta-lactamines souvent appelée céfuroximase (groupe fonctionnel 2e). Le phénotype se caractérise par une résistance aux aminopénicillines, aux C1G, aux C2G (céfuroxime, céfamandole) à l'exception des céphamycines (céfoxitine) et une sensibilité aux associations pénicillines-bêta-lactamines inhibitrices.

#### **Groupe 6 : phénotype « Bêta-lactamase à spectre étendu chromosomique »**

Les entérobactéries *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera cryocrescens*, *Kluyvera georgiana*, *Rahnella aquatilis*, *Citrobacter sedlakii* et *Erwinia persicina* produisent naturellement des bêta-lactamases à spectre étendu de classe A (groupe 2be). Ces **BLSE** souvent exprimées à bas niveau confèrent une diminution de sensibilité ou une résistance aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines, aux C1G et aux C2G, à l'exception de céphamycines. La résistance aux uréïdopénicillines et aux C3G est souvent inapparente. Aucune règle de lecture interprétative n'a été proposée à ce jour pour ces espèces. L'activité des enzymes produites suggère une interprétation des résultats « sensibles » en « intermédiaire » pour les pénicillines, de même pour les C3G si le test de synergie est positif (17).

- **Résistance acquise ou phénotypes « résistants »**

A la résistance naturelle aux bêta-lactamines peuvent s'ajouter un ou plusieurs mécanismes de résistance acquise. La résistance acquise par production de bêta-lactamase est le mécanisme prépondérant. Cependant, la fréquence des autres mécanismes de résistance, souvent exprimés à bas niveau, pourrait être sous-estimée faute d'études épidémiologiques.

**Phénotype « pénicillinase de haut niveau » ou « pénicillinase acquise »**

**Phénotype**

Le phénotype « pénicillinase de haut niveau » est d'expression variable selon la nature du promoteur du gène de structure, du nombre de copies du gène et de l'espèce bactérienne hôte. L'expression est souvent faible chez *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *M. morganii* et *Providencia*. Le phénotype de résistance se présente donc sous différentes formes qui évoluent entre deux extrêmes :

Une activité pénicillinase faible responsable d'une résistance limitée aux aminopénicillines (le diamètre d'inhibition est généralement absent contrairement à ce qui est observé dans la résistance naturelle des espèces du groupe 2) et aux carboxypénicillines. La sensibilité aux uréïdopénicillines et C1G apparaît peu ou pas affectée.

Une activité pénicillinase forte responsable d'une résistance aux aminopénicillines, à leur association aux inhibiteurs, aux carboxypénicillines, aux uréïdopénicillines et aux C1G. Une diminution de la sensibilité est communément observée pour les associations

ticarcilline-clavulanate et pipéracilline-tazobactam. La résistance peut s'étendre aux C2G, principalement chez *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. et *C. freundii*.

Règles d'interprétation : En raison des enzymes impliquées dans ce phénotype, il est recommandé d'interpréter les résultats « sensibles » en « intermédiaires » pour toutes les pénicillines si la production d'une pénicillinase est suspectée.

### **Phénotype « pénicillinase résistante aux inhibiteurs »**

#### **Phénotype**

Le phénotype « pénicillinase résistante aux inhibiteurs » a été initialement décrit chez *E. coli* en 1991. Il comporte une résistance aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et à moindre niveau aux uréidopénicillines, comme dans le phénotype précédent. Cependant il s'en distingue par une résistance aux associations des aminopénicillines et des carboxypénicillines avec les bêta-lactamines inhibitrices alors que les C1G conservent généralement leur efficacité.

### **Phénotype « beta-lactamase à spectre étendu »**

Le phénotype « beta-lactamase à spectre étendu » (BLSE) comprend une résistance aux pénicillines et aux céphalosporines, à l'exception des céphamycines. Cependant, la résistance aux C3G, C4G et à l'aztréonam est plus ou moins marquée selon les enzymes et les souches.

### **Phénotype « hyperOXY »**

#### **Phénotype**

Des souches de *K. oxytoca* sont résistantes à haut niveau à l'ensemble des pénicillines, aux C1G, aux C2G, à l'exception des céphamycines, et à bas ou haut niveau à l'aztréonam. Le test de synergie avec le clavulanate est positif avec le céfotaxime, rarement positif avec les C4G et la ceftazidime. Le niveau de résistance, toujours plus élevé pour l'aztréonam que pour les C3G et les C4G, permet de différencier le phénotype « hyperoxy » du phénotype « BLSE ».

### **Phénotype « céphalosporinase de haut niveau »**

Le phénotype « céphalosporinase de haut niveau » correspond à une résistance plus ou moins marquée aux pénicillines, aux C1G, aux C2G, à l'aztréonam et à au moins une C3G. Le test de synergie est négatif entre les C3G, les C4G ou l'aztréonam et les bêta-lactamines inhibitrices. Les céphamycines ne sont pas actives, exception faite vis-à-vis de l'espèce *H. alvei* et les C4G restent le plus souvent efficaces. La résistance aux C3G peut être totalement ou partiellement restaurée en présence de cloxacilline (100mg/L).

### 3.1.6.2 Sensibilité aux aminosides

Les différents genres composant la famille des entérobactéries sont **naturellement sensibles aux aminosides** à l'exception de *Providencia* et un grand nombre de *Serratia marcescens*.

**L'inactivation enzymatique** des aminosides est le mécanisme de la résistance acquise le plus fréquent. Les enzymes sont codés par des gènes plasmidiques qui peuvent atteindre tout ou partie des aminosides.

Le second mécanisme de la résistance acquise aux aminosides par imperméabilité cellulaire est moins souvent observé chez les entérobactéries. L'imperméabilité cellulaire entraîne le plus souvent une résistance croisée aux différents aminosides.

Le troisième aspect de la résistance acquise est l'altération de la cible ribosomale par mutation chromosomique qui est encore plus rare chez les entérobactéries (17).

### 3.1.6.3 Sensibilité aux quinolones

Les Entérobactéries sont **sensibles aux quinolones classiques** (acide nalidixique, acide pipemidique etc.) et aux **fluoroquinolones** (péfloxacine, ofloxacine etc.).

Néanmoins, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont plus ou moins bonnes selon l'espèce d'entérobactéries et les différentes quinolones.

La résistance acquise aux quinolones, dont le support génétique est exclusivement chromosomique (mutations), est due à deux mécanismes qui peuvent être associés : altération de la cible et/ou diminution de la perméabilité.

Il est important de constater que, dans la plupart des cas, la résistance à l'acide nalidixique s'accompagne d'une résistance aux autres quinolones.

#### **3.1.6.4 Sensibilité aux autres antibiotiques et antibactériens actifs sur les bacilles à Gram négatifs**

Les Entérobactéries habituellement résistantes aux macrolides, lincosamides et synergistines sont habituellement sensibles aux phénicoles, tétracyclines, sulfamides, triméthoprimé, nitrofuranes, fosfomycine et polymyxine (colistine). Mais cependant la plupart des espèces de *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* et *Serratia* sont résistantes aux tétracyclines, nitrofuranes et polymyxines. Enfin la rifampicine n'est active que sur certaines espèces d'entérobactéries. En plus de la résistance naturelle, les entérobactéries peuvent devenir résistantes (résistance acquise) à un ou plusieurs de ces antibiotiques ou antibactériens par mutations chromosomiques ou acquisition de plasmides de résistance (15).

Enfin un critère de gravité particulier est représenté par le fait que ces souches d'entérobactéries présentent souvent des résistances multiples aux antibiotiques. Un nombre croissant de souches, en particulier dans le genre *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* et *Providencia*, quelques souches de *Proteus* indole-positif et des souches d'*Escherichia coli* cephalotine résistance, possèdent des bêta-lactamases qui augmentent le phénomène de résistance à de nombreux antibiotiques du groupe des bêta-lactamases. L'émergence et l'augmentation potentielle de souches d'entérobactéries productrices de BLSE (bêta-lactamases à spectre élargi) en particulier chez *K. pneumoniae* constituent un phénomène inquiétant. La détection de ces souches n'est pas seulement importante pour le patient mais également dans le cadre de la surveillance des infections nosocomiales (18).

#### **3.1.7 Conservation des souches**

Tout bactériologiste est confronté à la conservation des souches bactériennes. Les motifs de conservation sont variés, parmi lesquels :

- Envoi de souches pour études plus approfondies (sérotypage, lysotypage, étude de virulence...) par un laboratoire de référence ;
- Etudes ultérieures de similitudes pour des souches isolées chez un même malade ou chez des malades différents (enquêtes épidémiologiques, mises en évidence d'infections nosocomiales...)

- Souches de référence utiles pour l'identification de souches inconnues, les études taxonomiques, l'enseignement ou la validation de techniques (antibiogramme, dosage de vitamines...). Ces souches proviennent généralement de centres spécialisés (collections) ;
- Souches à usage industriel : production de vaccins, d'antibiotiques, d'enzymes, de dérivés laitiers et agro-alimentaire (fermentations) ;
- Souches mutantes ayant des propriétés particulières.

### 3.1.7.1 Principes généraux

Si le but est de maintenir le plus longtemps possible sans repiquage, la vitalité d'une population bactérienne, il est également souhaitable que le phénotype et le génotype de la souche soient conservés.

Il convient dans tous les cas d'éviter :

- Tout stress pouvant entraîner la mort ou la dégénérescence des bactéries. Une température de conservation constante et la plus basse possible est donc recommandée, de même que le maintien à l'obscurité.
- L'apparition de mutants : des repiquages répétés, particulièrement en milieu liquide, sont déconseillés et tout repiquage se fera par prélèvement de colonies ;
- La perte de virulence : repiquages limités entre deux passages sur animal et dans certains cas, conservation des organes, voire de l'animal entier inoculé, par congélation.

La conservation de bactéries nécessite de les placer en état de vie ralentie ou momentanément suspendue (spores), donc dans des conditions peu favorables à leur multiplication. Les états secs ou congelés seront privilégiés et dans le cas de repiquages sur milieux de cultures, ceux-ci seront pauvres, exempts de sucres fermentescibles, à l'abri de l'action de l'oxygène de l'air (tube hermétique ou culture recouverte d'huile minérale).

D'une façon générale, la culture bactérienne sera en tout début de phase stationnaire afin de privilégier la conservation de cellules bactériennes matures, plus résistantes aux agressions liées aux diverses méthodes de conservation.

### 3.1.7.2 Moyens de conservation

- **Conservation de courte durée (quelques jours à quelques semaines)**

**Au laboratoire**, c'est dans ce délai qu'une conservation sur milieux de culture est envisageable sans être trop fastidieuse. L'intervalle entre deux repiquages sera fonction de la bactérie (variable selon le genre, l'espèce, voire au sein d'une même espèce), du milieu employé et des conditions ambiantes. Quelques règles générales : le milieu de culture choisi est incubé (18 à 24 heures à la température optimale de la souche), puis conservé à la température du laboratoire ou du réfrigérateur à 4°C. Les cultures seront conservées à l'obscurité, tubes hermétiquement bouchés, pour éviter la dessiccation et limiter l'action de l'oxygène de l'air. Dans ce dernier but, la culture incubée peut être recouverte d'huile minérale stérile ou scellée sous vide (bactéries anaérobies). Pour des bactéries peu fragiles (entérobactéries, staphylocoques, corynébactéries, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*...), il n'y a pas de problème particuliers de conservation pendant quelques semaines à 22°C.

**Pour expédition**, il existe dans le commerce des milieux de transports très utiles pour l'expédition de souches bactériennes y compris des bactéries très délicates mais dont il convient de s'assurer de la capacité à maintenir en survie la bactérie considérée. Pour des bactéries de culture difficile et nécessitant une atmosphère particulière (anaérobiose ou microaérophilie), on préférera l'expédition de la culture bactérienne dans des géloses profondes ou dans des sachets préservant cette atmosphère.

– **Conservation de moyenne durée (quelques mois)**

Les repiquages deviennent alors fastidieux et sont sources de mutations possibles. La multiplication cellulaire implique un métabolisme bactérien actif, ce qui augmente les risques de mutations ou d'altérations des caractéristiques (ferments). Les bactéries devront donc présenter un maximum de stabilité. On pourra cependant pour ce délai de conservation des milieux spéciaux adaptés ou la congélation à -80°C.

– **Conservation de longue durée (plusieurs années)**

Pour cette durée de conservation un maximum de garanties quant à la viabilité des échantillons sera recherché. Pour certaines bactéries, une simple dessiccation pourra suffire à maintenir un état de survie très long, mais pour la plus grande majorité des autres des méthodes plus sophistiquées comme la lyophilisation ou la congélation en azote liquide seront mises en œuvre (19).



## 3.2 Genre *Salmonella*

### 3.2.1 Historique

La fièvre typhoïde, la plus grave des salmonelloses humaines, a constitué un modèle dans l'étude des maladies infectieuses. Elle fut individualisée avant l'ère bactériologique sur la base des signes cliniques et des lésions ulcéreuses de l'intestin (Petit et Serres 1813, Bretonneau). Pettenkoffer (1868) mit en évidence le rôle de l'eau de boisson dans sa dissémination. En 1880, Eberth observa le bacille de la typhoïde dans des coupes de rate et de ganglion lymphatique, mais c'est Gaffky qui en obtint la culture en 1884. Depuis, de nombreuses bactéries biochimiquement comparables au bacille d'Eberth, mais associées à des diarrhées fébriles ont été inventoriées. En 1896, Widal ayant eu l'idée d'agglutiner des souches de bacille typhique avec le sérum de malades atteints de typhoïde, découvre la diversité antigénique de ces bacilles. L'étude séparée des antigènes somatiques O, flagellaires H, et de surface Vi date des travaux de Weil, Felix, et Mitzemacher en 1918.

L'inventaire de la diversité antigénique de ces bactéries, maintenant regroupées dans le genre *Salmonella*, a été l'œuvre successivement de White (1926), Kauffmann, puis Le Minor. La découverte des « ilots de pathogénicité » à l'ère de la génomique éclaire d'un jour nouveau l'évolution des bactéries pathogènes et fait des *Salmonella* un modèle d'étude (20).

Les premières souches multi résistantes sont apparues en Asie du Sud-Est à la fin des années 1980 et se sont depuis répandues dans toute la région. Parmi les pays asiatiques où le MDRTF a été signalé figurent la Chine (1985), le Pakistan (1987), l'Inde (1988), la Malaisie (1991), Singapour (1994), Bangladesh (1994), Vietnam (1995), Japon (1999), Thaïlande (2001), Corée du Sud (2003), Népal (2005) et Indonésie (2009); les autres pays incluent le Koweït (1996) et la Jordanie (2008). Une étude multicentrique récente menée dans cinq pays asiatiques (Chine, Inde, Indonésie, Pakistan et Vietnam) endémiques pour la fièvre typhoïde signalé la prévalence de souches de *S. Typhi* multi-résistantes allant de 7% à 65%. Les pays africains qui ont signalé le MDRTF Afrique du Sud (1992), Kenya (2000), Nigeria (2005) et Egypte (2006). Même développé des pays tels que le Royaume-Uni (1990), Amérique (1997) et Italie (2000) ont signalé MDRTF; la plupart des cas ont été trouvés parmi les voyageurs qui étaient revenus de régions où MDR souches de *S. Typhi* avaient causé des épidémies ou avaient devenir endémique (21).

### 3.2.2 Taxonomie et nomenclature

Le sérotype de *Salmonella* est une méthode de sous-typage basée sur la caractérisation immunologique de trois structures de surface: l'antigène O, qui est la partie la plus externe de la couche LPS qui recouvre la cellule bactérienne; H, qui est la partie de filament du flagelle bactérien; et l'antigène Vi, qui est un polysaccharide capsulaire présent dans des sérotypes spécifiques. Le sérotypage de *Salmonella* est généralement utilisé pour faciliter la surveillance de la santé publique pour l'infection à *Salmonella* et pour aider à la reconnaissance des épidémies (22).

Les hybridations ADN-ADN ont démontré que toutes les souches de salmonelles appartenaient à deux espèces, *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori* (ex-sous-espèce V). L'espèce *S. enterica* est divisée en six sous-espèces : *S. enterica* subsp. *enterica* (sous-espèce I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV), et *Salmonella enterica* subsp. *indica* (VI). Chacune de ces sous-espèces se divise en sérotypes (ou sérovars) définis par les antigènes O (LPS), H (flagelle) et Vi (capsule) (23).

Il est important de noter que le terme "sérovar" peut avoir deux significations dans le contexte de *Salmonella* avec "Serovar" signifie à la fois la formule antigénique (discutée ci-dessous) des différentes sous-espèces et le nom du sérovar qui est utilisé dans la pratique d'attribution de noms formels aux isolats de *S. enterica* subsp. *enterica* (sous-espèce I). Pour *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, historiquement les noms des sérovars ont été choisis en raison de maladies associées à l'infection, de la zone géographique de leur isolement ou d'habitats typiques. Actuellement, cependant, les noms de sérovars sont attribués uniquement en fonction des noms de lieux géographiques liés à la zone où le sérovar a été isolé pour la première fois. Dans les autres sous-espèces de *Salmonella enterica* et dans les sérotypes de *S. bongori*, les formules antigéniques sont attribuées selon le schéma de Kauffmann-White-Le Minor. Pour la première mention dans une publication, le nom complet "*Salmonella enterica*" est utilisé. Après *Salmonella enterica*, la sous-espèce est nommée (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*). Ceci est suivi par le mot "serovar" ou la version abrégée "ser." avec le nom du sérovar.

Le nom du sérovar est donné en lettres de l'alphabet romain non capitalisé avec la première lettre capitalisée. Par conséquent, le nom complet serait, par exemple, *Salmonella enterica* subsp. /ssp. *enterica* ser. Typhi. Les mentions suivantes du nom peuvent être condensées avec "*Salmonella*" suivi juste du nom du sérovar, par exemple,

*Salmonella* Typhi ou *S. Typhi*. Les sérotypes de *S. enterica* subspecies *enterica* sont normalement nommés d'après l'endroit où ils ont été identifiés pour la première fois. Pour les cinq autres sérotypes de la sous-espèce *Salmonella enterica* sont désignés selon les formules antigéniques, le nom de la sous-espèce est indiqué en caractères latins (non italiques) et les formules antigéniques sont listées comme suit: antigènes O (somatiques): Vi (si présent): antigènes H (flagellaire) (phase 1): antigènes H (phase 2, si présents). Un colon est utilisé pour séparer chaque antigène, par exemple, *Salmonella* subsp. II 58: 1, z13, z28: z6. Pour les sérovars de *S. bongori* (anciennement classé sous le sous-genre V), V est toujours utilisé pour être compatible avec le schéma utilisé pour *Salmonella enterica*, par exemple, S. V 48: z35: -.

Lors de sa première publication en 1934, le schéma Kauffmann-White comprenait 44 sérovars. Après la retraite de Kauffmann en 1964, 958 sérovars ont été répertoriés. Lorsque Le Minor a pris sa retraite, la liste contenait 2267 sérovars et, après la retraite de Popoff, il y avait 2555 sérovars. Pour reconnaître le travail effectué par Le Minor, les dirigeants du comité chargé du projet, Grimont et Weill, proposa de changer le nom du schéma Kauffmann-White en celui de White-Kauffmann-Le Minor. Le système actuel de classification est fondé sur les déterminants antigéniques de divers sérotypes de *Salmonella* et le système utilisé aujourd'hui a été construit au cours de 80 années de recherche sur les interactions d'anticorps avec les antigènes de surface de la bactérie *Salmonella*. Les formules antigéniques de tous les sérotypes connus de *Salmonella* sont enregistrées dans le schéma de Kauffmann-White-Le Minor. Le Centre collaborateur de référence et de recherche sur les salmonelles de l'Organisation mondiale de la santé est situé à l'Institut Pasteur de Paris qui met à jour le schéma. Des sérotypes nouvellement identifiés sont publiés dans la revue *Research in Microbiology* par ceux qui contrôlent le schéma. Dans la dernière mise à jour publiée en 2014 (mise à jour de 2010), il y avait 2659 sérovars dans le genre *Salmonella* (2639 dans *Salmonella enterica* et 20 dans *Salmonella bongori*) (24).

### 3.2.3 Pouvoir pathogène et habitat

Du point de vue médical, il convient de distinguer deux grands groupes à l'intérieur du genre *Salmonella* :

- Les salmonelloses majeures, agents de fièvres typhoïdes et paratyphoïdes – *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B*, *S. Paratyphi C*. Ces sérovars sont responsables de septicémies à point de départ lymphatique par envahissement des

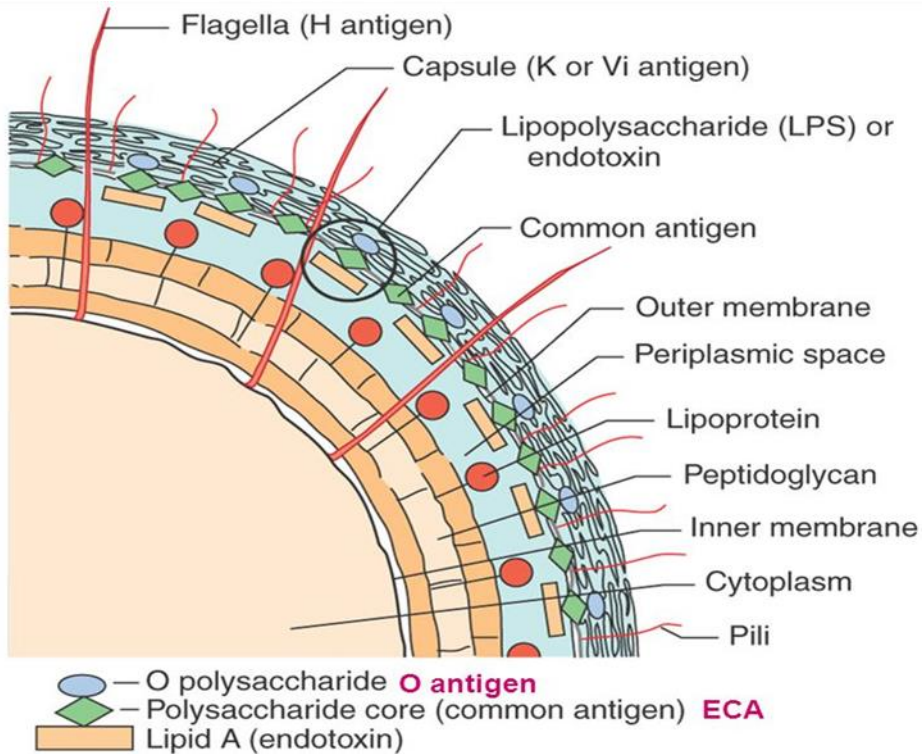
ganglions mésentériques. Le diagnostic repose à la fois sur l'isolement du germe dans les prélèvements de selles et les hémocultures (en fonctions des septénaires) et sur le sérodiagnostic de Widal et Felix ;

- Les autres sérovars mineurs habituellement responsables de toxi-infections alimentaires qui se manifestent par des gastroentérites avec diarrhées et vomissements survenant dans les 8 à 10 heures suivant l'ingestion de l'aliment contaminant et dont l'évolution est en règle spontanément favorable en quelques jours. Les entérites à salmonelles s'observent surtout chez les nourrissons parfois au cours d'épidémies au sein des collectivités. Ces sérovars mineurs peuvent cependant être responsables de rares infections extra-digestives (infections ostéo-articulaires, septicémies voire méningites) de type opportunistes sur certains terrains favorisant (drépanocytose, immunodépression, période néonatale) (25).

### **3.2.4 Caractères bactériologiques**

Les salmonelles sont des bacilles à Gram négatif présentant les caractères généraux de la famille des Enterobacteriaceae. Elles sont généralement mobiles, et présente une paroi identique à celle des bactéries de la famille des Enterobacteriaceae comportant essentiellement les Lipopolysacharides, les antigènes flagellaires et le peptidoglycane (voir figure 1).

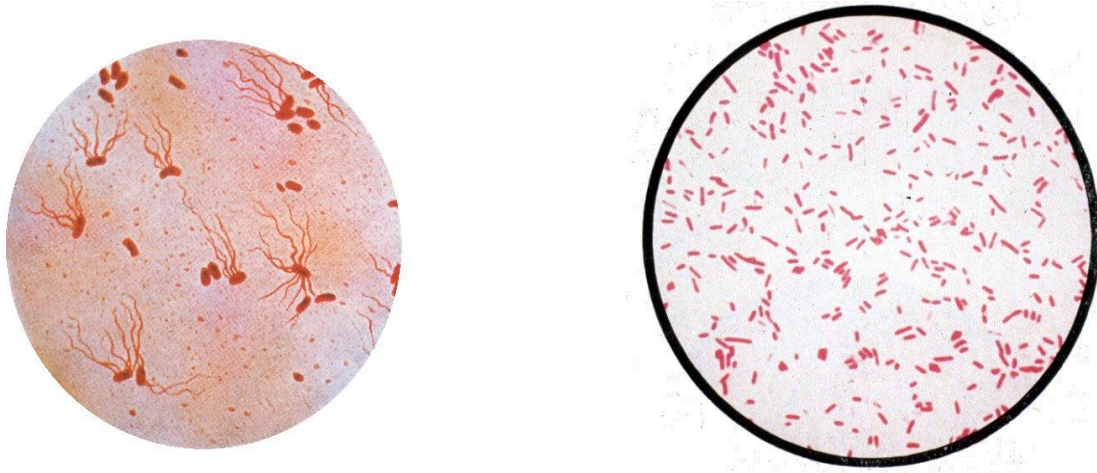
#### **3.2.4.1 Structures**



**Figure 1 :** Structure bactérienne de la *Salmonella* (26).

### 3.2.4.2 Morphologie et colorabilité

Les bactéries du genre *Salmonella* sont des bacilles à Gram négatif (27,28) pouvant mesurer 2 à 3  $\mu\text{m}$  de long sur 0,6  $\mu\text{m}$  de large pendant leur phase de 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 des bactéries mobiles avec une ciliature péritriche. (Voir figure 2)



**Figure 2 :** *Salmonella* vues au microscope électronique (à gauche) et optique (à droite) (29,30).

### 3.2.4.3 Caractères antigéniques

Comme toutes les entérobactéries, les salmonelles possèdent potentiellement trois types d'antigènes ayant un intérêt diagnostique. On distingue des antigènes somatiques (O), des antigènes flagellaires (H) et des antigènes de surface Vi. Dans le tableau I, les antigènes O sont chiffrés de 1 à 67 et les antigènes H sont représentés par une lettre pour la phase 1 et un nombre ou une lettre pour la phase 2 (31).

**Tableau II : Caractères antigéniques des principales souches *S. enterica* (32).**

|  | Antigène O        |         | Antigène H |   |                           | Antigène O |                    | Antigène H |         |
|--|-------------------|---------|------------|---|---------------------------|------------|--------------------|------------|---------|
|  |                   |         | Phase 1    | Phase 2                                   |                           |            |                    | Phase 1    | Phase 2 |
| <b>Groupe A (&lt; 1 % des isolements)</b>      |                   |         |            |   | <i>S. Choleraesuis</i>    | 6, 7       | c                  | 1, 5       |         |
| <i>S. Paratyphi A</i>                          | 1, 2, 12          | a       | –          |   | <i>S. Infantis</i>        | 6, 7       | r                  | 1, 5       |         |
| <b>Groupe B (&gt; 50 % des isolements)</b>     |                   |         |            |   | <i>S. Kentucky</i>        | 8,2        | i                  | z6         |         |
| <i>S. Typhimurium</i>                          | 1, 4 (5), 12      | i       | 1, 2       |   | <i>S. Bovismorbifians</i> | 6, 8       | r                  | 1, 5       |         |
| <b>Variante monophasique de Typhimurium</b>    | 1, 4 (5), 12      | i       | –          |   | <i>S. Hadar</i>           | 6, 7       | z10                | e, n, x    |         |
| <i>S. Saintpaul</i>                            |                   |         |            | 1, 4, 12,27                               | e, h                      | 1, 2       | <i>S. Thompson</i> | 6, 7       | k       |
| <i>S. Heidelberg</i>                           | 1, 4, (5), 12     | r       | 1, 2       |   | <i>S. Montevideo</i>      | 6, 7       | g, m, s            | –          |         |
| <i>S. Brandenburg</i>                          | 1, 4, 12          | l, v    | e, n, z15  |   | <i>S. Manhattan</i>       | 6, 8       | d                  | 1, 5       |         |
| <i>S. Bredeney</i>                             | 1, 4, 12, 27      | l, v    | 1, 7       |   | <i>S. Goldcoast</i>       | 6, 8       | r                  | l, w       |         |
| <i>S. Agona</i>                                | 1, 4, 12          | f, g, s | –          |   | <i>S. Braenderup</i>      | 6, 7       | e, h               | e, n, z15  |         |
| <i>S. Derby</i>                                | 1, 4, (5), 12     | f, g    | –          |   | <i>S. Livingstone</i>     | 6, 7       | d                  | l, w       |         |
| <i>S. Paratyphi B (biotype Java)</i>           | 1, 4, (5), 12     | b       | 1, 2       |   | <i>S. Mbandaka</i>        | 6, 7       | z10                | e, n, z15  |         |
| <i>S. Schwarzengrund</i>                       | 1, 4, 12, 27      | d       | 1, 7       |   | <i>S. Kottbus</i>         | 6, 8       | e, h               | 1, 5       |         |
| <i>S. Wien</i>                                 | 1, 4, 12, 27      | b       | l, w       |   | <i>S. Ohio</i>            | 6, 7       | b                  | l, w       |         |
| <i>S. Coeln</i>                                | 4, (5), 12        | y       | 1, 2       |   | <i>S. Muenchen</i>        | 6, 8       | d                  | 1, 2       |         |
| <i>S. Abortusovis</i>                          | 4, 12             | c       | 1, 6       |   | <i>S. Blockey</i>         | 6, 8       | k                  | 1, 5       |         |
| <i>S. Stanley</i>                              | 1, 4, (5), 12, 27 | d       | 1, 2       |   | <i>S. Tennessee</i>       | 6, 7       | z29                | (1, 2, 7)  |         |
| <i>S. Reading</i>                              | 1, 4, (5), 12     | e, h    | 1, 5       | <b>Groupe E (5 à 10% des isolements)</b>  |                           |            |                    |            |         |
| <i>S. Sandiego</i>                             | 4, (5) 12         | e, h    | e, n, x    |   | <i>S. Senftenberg</i>     | 1, 3, 19   | g, s, t            | –          |         |
| <b>Groupe D (~ 20 % des isolements)</b>        |                   |         |            |   | <i>S. London</i>          | 3, 10      | l, v               | 1, 6       |         |
| <i>S. Panama</i>                               | 1, 9 12           | l, v    | 1, 5       |   | <i>S. Anatum</i>          | 3, 10      | e, h               | 1, 6       |         |
| <i>S. Dublin</i>                               | 1, 9 12 (Vi)      | g, p    | –          |   | <i>S. Give</i>            | 3, 10      | l, v               | 1, 7       |         |
| <i>S. Enteritidis</i>                          | 1, 9 12           | g, m    | –          | <b>Groupe G (&lt; 5 % des isolements)</b> |                           |            |                    |            |         |
| <i>S. Typhi</i>                                | 9, 12 (Vi)        | d       | –          |   | <i>S. Kedougou</i>        | 1, 13, 23  | i                  | l, w       |         |
| <i>S. Gallinarum-pullorum</i>                  | 1, 9 12           | –       | –          |   | <i>S. Worthington</i>     | 1, 13, 23  | z                  | l, w       |         |
|  |                   |         |            |   | <i>S. Ibadan</i>          | 13, 22     | b                  | 1, 5       |         |
| <b>Groupe C1–C2–C3 (~ 20 % des isolements)</b> |                   |         |            |   | <i>S. Havana</i>          | 1, 13, 23  | f, g (s)           | –          |         |
| <i>S. Paratyphi C</i>                          | 6, 7, (Vi)        | c       | 1, 5       |   |                           |            |                    |            |         |

## **Antigènes de paroi ou antigènes O**

Les antigènes O sont portés par les chaînes spécifiques du lipopolysaccharide (LPS). Celui-ci est un des constituants de la membrane externe de la paroi bactérienne. Ces chaînes polysaccharidiques sont des polymères de chaînons répétés et identiques pour un même sérovar. Les différences antigéniques des chaînes spécifiques sont liées, soit à la nature des sucres qui composent le chaînon répété, soit à leur mode de liaison. La réaction des anticorps anti O avec les colonies bactériennes correspondantes conduit à la formation d'une agglutination nettement visible à l'œil nu.

## **Antigènes d'enveloppes**

Les antigènes de capsule, nommés Vi, n'ont été identifiés que chez trois sérovarys: *Salmonella* Typhi, Paratyphi C et Dublin. La présence de cet antigène peut induire un faux négatif lors des tests d'agglutinations pour la recherche des antigènes O. Pour permettre la réaction des sérums anti-O avec leurs antigènes correspondant, une étape préalable de chauffage pendant 10 minutes à 100°C est nécessaire pour détruire cette antigène et mettre à nu l'antigène somatique O (31).

## **Antigènes flagellaire antigènes H**

Les antigènes H sont portés par la flagelline qui est la protéine de structure des flagelles. La plupart des sérovarys de salmonelle possèdent deux systèmes génétiques codant pour les flagellines différentes. Les flagelles existent alors sous deux formes antigéniques qualifiées de phase 1 et de phase 2 : les antigènes H sont donc diphasiques. Pour une cellule bactérienne donnée, un seul des deux gènes s'exprime et les flagelles seront soit en phase 1 soit en phase 2. Dans une population bactérienne, on retrouve le plus souvent un mélange de cellules dont certaines expriment les antigènes flagellaires de la phase 1 et d'autres les antigènes correspondant à la phase 2. Pour une minorité de sérovarys, la bactérie ne peut synthétiser qu'un seul type de flagelle : l'antigène H est alors monophasique. La réaction des anticorps anti-H avec les bactéries correspondantes conduit à l'immobilisation des cellules (31).

### **3.2.4.4 Caractères biochimiques**

Les salmonelles possèdent une nitrate réductase mais pas d'oxydase. Elles fermentent le glucose avec ou sans production de gaz et se cultivent aisément sur les milieux ordinaires. Au sein de la famille des Enterobacteriaceae, les caractères permettant l'identification biochimique du genre *Salmonella* sont : l'absence d'uréase et de



tryptophane désaminase, l'absence de production d'indole et d'acétoïne, l'absence de fermentation du lactose, du saccharose, de l'inositol, de l'amygdaline, de l'adonitol et du 2-cétogluconate, la présence d'une thiosulfate réductase, la décarboxylation fréquente de la lysine et de l'ornithine et la capacité fréquente de croître sur milieu au citrate de Simmons (31).

Les deux espèces du genre *Salmonella* peuvent être différenciées par leurs caractères biochimiques : *Salmonella bongori* ne fermente pas le sorbitol et pousse sur un milieu contenant du KCN (cyanure de potassium), contrairement à *Salmonella enterica*.

Les six sous-espèces de l'espèce *Salmonella enterica* peuvent également être identifiées par leurs caractères biochimiques (voir Tableau 3).

**Tableau III** : Principaux caractères biochimiques des souches *S. enterica* et *S. bongori*.

| Caractères biochimiques         | <i>S. enterica</i> |                |                 |                   |                   |               | <i>S. bongori</i> |
|---------------------------------|--------------------|----------------|-----------------|-------------------|-------------------|---------------|-------------------|
|                                 | Sous espèce        |                |                 |                   |                   |               |                   |
|                                 | <i>enterica</i>    | <i>salamae</i> | <i>arizonae</i> | <i>diarizonae</i> | <i>housteanae</i> | <i>indica</i> |                   |
| <b>ONPG</b>                     | -                  | -              | +               | +                 | -                 | variable      | +                 |
| <b>Gélatinase</b>               | -                  | +              | +               | +                 | +                 | +             | -                 |
| <b>Culture sur milieu + KCN</b> | -                  | -              | -               | -                 | +                 | -             | +                 |
| <b>Dulcitol (fermentation)</b>  | +                  | +              | -               | --                | -                 | Variable      | +                 |
| <b>Malonate (utilisation)</b>   | -                  | +              | +               | -                 | -                 | -             | -                 |
| <b>Sorbitol (fermentation)</b>  | +                  | +              | +               | +                 | +                 | +             | -                 |
| <b>glucuronidase</b>            | variable           | Variable       | -               | +                 | -                 | Variable      | -                 |
| <b>glutamyl transferase</b>     | variable           | +              | -               | +                 | +                 | +             | +                 |
| <b>Lyse par le phage O1</b>     | +                  | +              | -               | +                 | -                 | +             | +                 |

### 3.2.4.5 Caractères cultureux

De nombreuses méthodes sont largement utilisées à travers le monde pour l'isolement des *Salmonella* (33,34). Ainsi plusieurs types de milieux peuvent être utilisés :

**Les milieux de pré-enrichissement** : Le nombre de salmonelles dans les fèces d'un animal asymptomatique, dans les échantillons d'environnement, dans les produits d'alimentation animale ou humaine est très souvent faible, et il est nécessaire d'utiliser des milieux d'enrichissement tels que l'eau peptonnée tamponnée, ou le bouillon universel de pré-enrichissement pour permettre l'isolement. Ceci permet aux faibles nombres de salmonelles qui, autrement, auraient été tuées par les effets toxiques des milieux d'enrichissement. Le pré-enrichissement permet au *Salmonella* (faible nombre) de se multiplier ou de les revivifier suite à un traitement au froid, à la chaleur, ou à une exposition aux biocides ou une dessiccation.

**Les milieux d'enrichissements** : Les milieux d'enrichissement sont des milieux liquides ou gélosés semi-solides qui contiennent des additifs qui permettent sélectivement la croissance de salmonelles alors que la croissance des autres bactéries est inhibée.

Néanmoins, certains peuvent être toxiques pour certains sérovars de *Salmonella*, comme par exemple, le sélénite qui inhibe *S. Choleraesuis* ou le vert brillant qui est toxique pour beaucoup de souches de *S. Dublin*. Des températures élevées ont aussi été utilisées pour augmenter la sélectivité du milieu d'enrichissement, et une température de 43°C est utilisée dans certains laboratoires, bien que cela puisse être inhibiteur avec certains milieux, par exemple, le tétrathionate et le Rappaport-Vassiliadis inhibe les souches sensibles à la température, particulièrement *S. Dublin*, et une température de 41,5°C est maintenant recommandée pour l'incubation du bouillon Rappaport-Vassiliadis.

L'enrichissement sélectif par mobilité peut être aussi utilisé pour augmenter la sensibilité d'isolement de *Salmonella* et un milieu d'enrichissement semi-solide comme par exemple le milieu Rappaport-Vassiliadis semi-solide ou le Diagnostic Semi-Solide *Salmonella* medium (DIASALM), peut permettre une sensibilité plus grande (35). La formulation du milieu, la température, le temps d'incubation et le volume des échantillons utilisés pour ensemercer le milieu peuvent concourir à améliorer le taux d'isolement et ces paramètres doivent toujours être pris en compte. Des exemples de milieu sélectif d'enrichissement sont le tétrathionate de sodium comme le bouillon Muller-Kauffman, le sélénite F, la sélénite cystéine, le bouillon vert brillant et les bouillons Rappaport-Vassiliadis ou le milieu Rappaport-Vassiliadis semi-solide. Du ferrioxamine E peut aussi être ajouté aux

milieux sélectifs pour améliorer l'isolement de *Salmonella* à partir de fer ou d'échantillons peu nutritifs tels que les œufs, l'eau ou le sol (36).

**Les milieux d'isolement :** Il existe des géloses sélectives solides qui permettent la croissance différentielle à des degrés variables. Ils inhibent la croissance des autres bactéries que *Salmonella* et donnent des informations sur les principales caractéristiques biochimiques différentielles - habituellement l'absence de fermentation du lactose et la production de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S). Les résultats sont lus après 24 et 48 h d'incubation à 37°C. Les milieux d'isolement les plus utilisés sont le milieu *Salmonella-Shigella* (SS), le milieu Mac Conkey, le milieu Hecktoen. Sur le milieu SS, les colonies de *Salmonella* apparaissent incolores, ou incolores à centre noir, car elles ne fermentent pas le lactose et produisent du H<sub>2</sub>S. Ces colonies peuvent se confondre avec celles d'autres comme les *Proteus*. Les colonies de *Salmonella* après 18– 24 heures d'incubation à 37°C sont lisses et mesurent 2 à 3 mm de diamètre. Des colonies naines s'observent rarement, de même que des colonies rugueuses ou des colonies muqueuses ressemblant à celle de *Klebsiella* (31).



**Figure 3 :** Colonies de *Salmonella* après 24 h d'incubation sur le milieu SS (37).

Le milieu 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. Il contient :

- deux indicateurs :
  - ✓ le bleu de bromothymol (indicateur de pH)

- ✓ la fuschine acide (qui se colore en présence d'aldéhyde)
- trois types de glucides :
  - ✓ la salicine (qui est un hétéroside),
  - ✓ le saccharose
  - ✓ le lactose.

La production d'H<sub>2</sub>S à partir de thiosulfate des colonies bleu-vert et bleu-vert à centre noir font soupçonner le genre *Salmonella*. Les colonies bleu-vert ou vertes font soupçonner le genre *Shigella* ou de *Salmonella* (31).



**Figure 4 :** Les colonies de *Salmonella* sur gélose Hektoen après 24 h d'incubation (38).

### 3.2.5 Diagnostic biologique

#### 3.2.5.1 Diagnostic direct

Il faut toujours chercher à isoler le germe au cours d'une salmonellose. Cela permet sa caractérisation précise pour une enquête épidémiologique et l'étude de sa sensibilité aux antibiotiques.

##### 3.2.5.1.1 L'hémoculture

Sa réalisation ne pose pas de problèmes techniques : les *Salmonella* poussent sur milieux usuels. L'hémoculture est surtout utile lors des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes. Pendant le premier septénaire de la maladie, elle est positive dans 90% des cas. Le taux de positivité descend à 40% pendant le troisième septénaire. L'hémoculture peut être

positive lors des gastro-entérites du jeune enfant. Sa positivité est exceptionnelle dans les gastro-entérites de l'adulte.

### **3.2.5.1.2 La coproculture**

Elle doit toujours être pratiquée parallèlement à l'hémoculture et au sérodiagnostic de Widal et Felix. Au cours des salmonelloses, l'excrétion de bactéries dans les selles peut être faible. De plus les *Salmonella* sont en nombre inférieur à celui des espèces commensales : *Escherichia coli* et *Proteus*. Il faut donc, pour les isoler, ensemercer des milieux d'isolements sélectifs et utiliser des milieux d'enrichissement. Ces impératifs font qu'il n'est en général pas possible de rendre le résultat de la coproculture avant le troisième jour après le prélèvement. La coproculture est le seul examen qui permet de déceler les porteurs sains, mais elle manque de sensibilité et il peut y avoir intérêt à répéter l'examen.

### **3.2.5.1.3 L'analyse des aliments suspects**

C'est la méthode permettant le diagnostic d'une toxi-infection alimentaire à *Salmonella*.

### **3.2.5.2 Diagnostic indirect**

Le sérodiagnostic de Widal et Felix n'est utile que pour le diagnostic tardif des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes.

#### **3.2.5.2.1 Indications**

Lorsque le malade est vu tardivement ou qu'il a bénéficié d'une antibiothérapie appliquée à l'aveugle, cet isolement n'est souvent plus possible. C'est alors que le sérodiagnostic de Widal et Felix a son intérêt. Il permet de rechercher les anticorps anti O et anti H dans le sérum. Mais de nombreuses causes d'erreurs existent et l'interprétation est parfois délicate. C'est pourquoi la prescription d'un sérodiagnostic de Widal et Felix doit toujours être accompagnée de celle d'une coproculture, voire d'une hémoculture visant à isoler la *Salmonella*.

#### **3.2.5.2.2 Principe et réalisation**

Il s'agit de rechercher dans le sérum des malades les agglutinines correspondant aux antigènes somatiques O et aux antigènes flagellaires H de *Salmonella* Typhi et des *Salmonella* Paratyphi A, B et C.

Pour cela on utilise des suspensions antigéniques TO, TH, AO, AH, BO, BH, CO, et CH. Ces suspensions antigéniques sont constituées de bactéries tuées, traitées soit par l'alcool qui détruit les antigènes H, soit par le formol qui détruit les antigènes O.

Dans une série de tubes, chaque suspension antigénique est mise en présence de dilutions croissantes du sérum du malade, pour déterminer le titre des agglutinines.

### **3.2.5.2.3 Résultats normaux**

Les agglutinines O apparaissent vers le 8<sup>e</sup> jour de la maladie et les agglutinines H vers les 10-12<sup>e</sup> jours. A la période d'état, il y a simultanément des agglutinines O et H. Le titre de ces dernières est plus élevé (par exemple TO = 1/200 ; TH = 1/800). Les agglutinines O disparaissent normalement en 2 à 3 mois. Les agglutinines H persistent plusieurs années après une infection ou une vaccination anti-typhoïdique. Seule la présence d'agglutinines O témoigne d'une infection récente.

Une fièvre peut parfois s'observer chez un vacciné, dans ce cas il y a présence d'agglutinines TH, AH, BH et d'agglutinines O. Il n'y a pas de relation entre le titre des agglutinines et la gravité de la maladie.

### **3.2.5.2.4 Résultats faussement positifs**

La présence d'agglutinines TO seules peut être due à une infection par une *Salmonella* ayant un antigène O commun avec *S. Typhi*, mais des antigènes H différents. Il s'agit le plus souvent de *S. Enteritidis*.

De même la présence d'agglutinines BO seules peut être due à une infection à *S. Typhimurium*, par exemple.

Certaines souches de *Yersinia pseudotuberculosis*, à cause de communautés antigéniques peuvent donner une agglutination avec BO (pour le type II) ou avec TO (pour le type IV).

Des réactions faussement positives peuvent être observées au cours de certaines maladies : paludisme, typhus exanthématique, dysglobulinémies (myélomes, collagénoses, cirrhoses) et infections diverses par des Entérobactéries.

### **3.2.5.2.5 Résultats faussement négatifs**

Le sérodiagnostic de Widal est négatif pendant le premier septénaire de la maladie. Un traitement précoce par des antibiotiques ou des corticoïdes peut empêcher l'élévation du taux des anticorps.

## **3.2.6 Traitement**

### **3.2.6.1 Traitement curatif**

#### **3.2.6.1.1 Fièvres typhoïdes**

Le thiamphénicol, l'ampicilline et le triméthoprime-sulfaméthoxazole utilisés par voie orale restent des antibiotiques utiles pour le traitement des fièvres typhoïdes dans les pays pauvres. La ceftriaxone et les fluoroquinolones ont une excellente activité permettant de réduire la durée du traitement. Contrairement à ce qui est observé dans d'autres parties du monde (Mexique, Vietnam, Tadjikistan), les souches de *S. Typhi* isolés en Europe sont généralement sensibles aux antibiotiques.

#### **3.2.6.1.2 Sérotypes ubiquitaires**

Les sérotypes responsables d'épidémies de gastro-entérites infantiles sont souvent ceux qui sont les plus résistants aux antibiotiques. Cela pose parfois des problèmes thérapeutiques difficiles.

Pour les salmonelloses mineures, purement digestives, survenant chez un adulte en bonne santé, le traitement antibiotique se discute. Il consiste en la prise unique d'une fluoroquinolone.

#### **3.2.6.2 Traitement des porteurs**

Les convalescents, porteurs transitoires, éliminent des *Salmonella* pendant quelques semaines. Les coprocultures se négativent souvent spontanément. Les porteurs chroniques éliminent des *Salmonella* pendant une durée supérieure à un an. Un portage digestif doit faire penser à une pathologie des voies biliaires. Un portage urinaire est souvent associé une lithiase ou une bilharziose. L'état de porteur est dangereux chez les patients immunodéprimés, exposés à des bactéries récidivantes, observées notamment au cours du SIDA. Le meilleur taux d'éradication du portage est obtenu avec les fluoroquinolones.

### 3.2.6.3 Traitement préventif

Le vaccin historique TAB était constitué de corps bactériens entiers tués par la Chaleur. Le vaccin actuel (Typhim®) est constitué de l'antigène Vi de *S. Typhi*, polysaccharique hautement purifié et injecté par voie sous-cutanée. Une seule injection assure une protection de 3 ans. Il est indiqué pour prévenir la typhoïde chez les personnes immunodéprimées (39).

### 3.2.7 Autres salmonelloses

Les bactéries du genre *Salmonella* sont une cause majeure de maladies d'origine alimentaire dans le monde entier. En zoonotique pathogène, *Salmonella* peut être trouvée dans les intestins de nombreux animaux producteurs d'aliments tels que la volaille et les porcs. L'infection est généralement acquise par la consommation d'eau contaminée ou d'aliments d'origine animale : principalement de la viande, de la volaille, des œufs et du lait insuffisamment cuits.

Les excréments humains ou animaux peuvent également contaminer la surface des fruits et des légumes, ce qui peut entraîner des éclosions d'origine alimentaire.

La plupart des souches de *Salmonella* provoquent une gastro-entérite, tandis que certaines souches, en particulier *Salmonella enterica* sérotypes Typhi et Paratyphi sont plus invasifs et provoquent typiquement la fièvre entérique. La fièvre entérique est l'infection qui pose le plus de problèmes de traitement en raison de la résistance antibactérienne dans de nombreuses parties du monde (40).

En France, 65 % des toxi-infections alimentaires collectives déclarées sont liées à *Salmonella*. L'incidence des *Salmonella* dans les pays développés est en diminution depuis quelques années, mais de plus en plus de souches résistantes aux antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire sont identifiées. *Salmonella enterica* sérotype Typhimurium appartenant au lysotype DT104 résistant habituellement à l'amoxicilline/ampicilline, à la streptomycine et à la spectinomycine, aux sulfamides, au chloramphénicol/ florfénicol, et à la tétracycline, s'est répandu dans les pays développés chez l'homme et l'animal depuis la fin des années 80. Plus récemment, des souches du sérotype Newport multirésistantes aux antibiotiques (Newport-MDR AmpC) viennent d'émerger aux Etats-Unis. Ces souches résistantes aux céphalosporines de troisième génération par production de la céphalosporinase plasmidique CMY-2, seraient apparues initialement chez le bétail après la mise sur le marché d'une céphalosporine de troisième génération en médecine vétérinaire (41).



Entre le 12 mai et le 4 juin 2003, 14 cas de salmonellose à *S. Newport* multirésistante aux antibiotiques ont été identifiés dans trois départements du nord de la France. Sept cas étaient des femmes, neuf cas étaient des enfants.

Les symptômes décrits étaient : diarrhée (100 %) ; sanglante (50 %), vomissement (86 %) et fièvre (71 %). Onze cas (79 %) ont été hospitalisés. Aucun décès n'a été observé.

La seule exposition commune rapportée par tous les cas était la consommation de viande de cheval, sous forme de viande hachée (11 cas) ou de steak (3 cas). La viande provenait de 14 boucheries fixes ou ambulantes appartenant à une même enseigne.

L'enquête vétérinaire a retrouvé un grossiste commun aux lieux d'achat cités par 13 des 14 cas. Ce grossiste importait des carcasses de cheval de : Argentine, Australie, Belgique, Brésil, Canada, Hongrie, Royaume-Uni et Uruguay. Les données sur l'origine des carcasses n'ont pas permis de remonter la filière jusqu'au pays d'origine de la viande. Les 14 souches de *S. Newport* isolées présentaient une résistance aux  $\beta$ -lactamines de type céphalosporinase de haut niveau, à la streptomycine, aux sulfamides, à la tétracycline et au chloramphénicol (42).

En 2017 l'agence française de santé publique a décelé une flambée de *Salmonella enterica* serovar Agona liée à des préparations pour nourrissons fabriquées par le groupe Lactalis Nutrition Santé en France. Au 21 décembre 2017, trente-cinq cas confirmés d'infections à *Salmonella* Agona chez des nourrissons de moins de 6 mois ont été décelés dans différentes régions de France. Seize nourrissons ont été hospitalisés, mais tous se sont rétablis complètement et aucun décès n'a été signalé.

Cette flambée est liée à la consommation de préparations pour nourrissons de 4 marques différentes. Le 10 décembre 2017, Lactalis Nutrition Santé a retiré de la vente et rappelé plus de 600 lots (plus de 7000 tonnes) de produits concernés, fabriqués entre le 15 février 2017 et la date du retrait.

Les produits concernés ont été distribués dans plus de 50 pays et territoires, dont 16 de la Région européenne de l'OMS. Les autorités sanitaires françaises recommandent aux parents qui ont encore des boîtes correspondant aux lots rappelés de ne pas les utiliser.

Le 21 décembre 2017, le groupe Lactalis a procédé à un nouveau rappel incluant l'ensemble des produits infantiles et nutritionnels fabriqués ou conditionnés dans l'usine de Craon depuis le 15 février 2017 (43).

## **4. METHODOLOGIE**

## 4 Méthodologie

### 4.1 Cadre de l'étude

Le Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (CICM) a constitué notre cadre d'étude. Le CICM est situé dans le quartier de l'ex-base aérienne de Bamako, rue du Docteur Charles Mérieux.

Le CICM a été mis en place suite à la signature de l'accord- cadre N°0956/1899 du 18 février 2004 entre le Gouvernement de la République du Mali et la Fondation Mérieux ainsi que la Convention du 16 janvier 2005 et son protocole annexe du 11 mai 2011 entre le Ministère en charge de la Santé et la Fondation Mérieux.

- 8 Décembre 2003 : Création de la Fondation Mérieux Mali
- 15 Janvier 2004 : Pose de la première pierre du CICM
- 17 Janvier 2005 : Inauguration du CICM
- 2 Mai 2005 : Démarrage des activités

Le CICM comprend :

- Une administration générale.
- Un centre de formation avec une formation diplômante le BAMS (Bachelor de Biologie Médicale Appliquée) en cours pour un Master de Biologie Médicale appliquée, des formations qualifiantes et des formations par compagnonnage.
- Un laboratoire d'analyses médicales dénommé Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM) avec des activités de recherche et des activités de routine.

La présente étude s'est déroulée dans le Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM).

Le CICM a pour mission de participer tout comme les autres structures du Ministère en charge de la Santé au développement sanitaire du Mali par le service rendu aux malades, la formation, la recherche et le renforcement des capacités dans le domaine du diagnostic biologique dans des conditions désintéressées au bénéfice de la population.

Les ressources humaines du CICM sont composées de 29 agents, répartis entre les services techniques du LRM (17 agents) et les fonctions de support administratif, financier et logistique (12 agents).

Le LRM se compose des Laboratoires 1 et 2 au sein desquels les activités de recherche et de diagnostic de routine sont effectuées. Le Laboratoire 1 offre le cadre et le matériel pour la réalisation des examens d'hématologie, de biochimie et d'immunologie et le Laboratoire 2 prend en charge les examens de microbiologie (bactériologie, mycologie et parasitologie).

## **4.2 Type d'étude**

Il s'agit d'une étude rétro-prospective portant sur les prélèvements bactériologiques réalisés au Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako.

## **4.3 Période d'étude**

Elle s'étend sur une période de 3 années, de Janvier 2015 à Décembre 2017 portant sur toutes les saisons : saison fraîche, saison sèche, saison pluvieuse.

## **4.4 Population d'étude**

La population d'étude était constituée de résultats de tous les prélèvements bactériologiques des patients ayant une infection à bacilles à gram négatifs isolées au laboratoire Rodolphe Mérieux de 2015 à 2017.

## **4.5 Echantillonnage**

Nous avons effectué un échantillonnage exhaustif.

### **4.5.1 Critère d'inclusion**

Tous les échantillons bactériologiques ayant mis en évidence des souches de *Salmonella* spp.

### **4.5.2 Critère de non-inclusion**

Tous les examens bactériologiques ayant donné autres germes différents de *Salmonella* spp.

## **4.6 Collecte de données**

Les données sur les résultats des examens cyto-bactériologiques, des cultures et des antibiogrammes ont collectés (ou tirés ou extrait ou recueillis) à partir du logiciel SYSLAM de CODAT informatique, France ; puis complétées avec les différents registres bactériologiques.

## 4.7 Variables

Les variables étudiées étaient :

- le sexe,
- le type de prélèvement,
- le type de germe (genres, espèces)
- la période (saison fraîche, saison sèche, saison pluvieuse)
- le profil de résistance et de sensibilité aux antibiotiques testés

## 4.8 Méthodes

### 4.8.1 Matériels et réactifs

- Examen microscopique
  - Lame et lamelles
  - Huile à immersion
  - Pipettes pasteurs
  - Microscope optique
  - Micropipettes
  - Bec Bunsen
  - Plaque chauffante
  - Colorants par GRAM.
- Isolement et identifications
  - Oese, anse de platine
  - Milieux de culture appropriée pour chaque type d'échantillon
  - Formol, éther
  - Eau physiologique
  - Bec Bunsen
  - Flacons d'hémocultures
  - Etuves à 37°C
  - Lame porte-objet
  - Galerie API 20E
- Antibiogramme
  - Tubes à hémolyse
  - Eau physiologique
  - Boîtes de pétri
  - Ecouvillons stériles
  - Pipetes Pasteurs pour BGN

- Agitateur type vortex
- Densitomètre ou étalons de turbidité (échelle de Mac Farland)
- Cassette Vitek®2 Compact pour entérobactéries AST-N 233, réf. 413117
- Applicateur de disque ou pinces
- Disques d'antibiotiques
- Automates : Vitek®2 Compact, Mini API.
- Souchothèque
  - Eau physiologique
  - Tubes d'épindol
  - Bec Bunsen
  - Bouillon cœur-cervelle
  - Glycérol
  - Agitateur type vortex
  - Micropipettes
  - Congélateur

#### **4.8.2 Prélèvement**

Les prélèvements étaient effectués au laboratoire par les techniciens ou apportés par les patients (dans un délai minimum le plus court et dans un maximum de 24 heures) après une prise de contact précédente au cours de laquelle les modalités de recueil des échantillons ainsi que les précautions leurs sont expliqués.

Les salmonelles sont systématiquement recherchées dans les selles et les hémocultures, elles peuvent également être retrouvées dans d'autres types de prélèvements.

##### **4.8.2.1 Cas des hémocultures**

Les flacons d'hémocultures analysées au laboratoire proviennent des différents centres de santé de Bamako. Les prélèvements ainsi reçues sont d'abord enregistrés sur le système informatique au niveau de la réception ensuite acheminés au labo où ils sont inscrits dans les registres des hémocultures.

Conditions et modalités de prélèvements (**Mode opératoire de la technique de prélèvement des hémocultures, cf. annexe 2**)

##### **4.8.2.2 Cas des liquides pleural**

Les échantillons de liquide pleural analysés étaient apportés en provenance des différentes structures de santé de Bamako.

Modalités de prélèvement (**Mode opératoire de la technique de prélèvement du liquide pleural, cf. annexe 3**).

#### 4.8.2.3 Cas des pus

Ils sont recueillis sur deux écouvillons stériles dont l'un sert à faire le frottis pour la coloration de Gram et l'autre pour l'ensemencement sur les milieux de cultures appropriés.

Nature et localisation du prélèvement. (**Mode opératoire de la technique de prélèvement des pus et abcès, cf. annexe 4**).

#### 4.8.2.4 Cas des selles

Les selles sont recueillies dans des boîtes de pétri stériles apportés par les patients et ensemencées sur les milieux de culture appropriés (gélose Hektoen, bouillon rappaport).

(**Mode opératoire de la technique de prélèvement des selles, cf. annexe 5**).

#### 4.8.2.5 Cas des urines

Ce prélèvement se fait sur la première urine du matin et recueillis dans un flacon stérile fourni par le laboratoire soit dans la salle de prélèvement ou à domicile.

(**Mode opératoire de la technique de prélèvement des urines, cf. annexe 6**).

#### 4.8.3 Acheminement des échantillons

Les échantillons recueillis étaient déposés dans le bac de bactériologie et acheminés sur le laboratoire 2 pour y être traités.

Pour les hémocultures les flacons reçus sont mis dans le BACT/ALERT 3D.

#### 4.8.4 Examen direct

L'aspect macroscopique de chaque type d'échantillons étaient systématiquement étaient observées à l'œil nu et notées sur la fiche d'examen du laboratoire et dans le registre approprié pour chaque type de prélèvement.

Ensuite ils sont mis en centrifugation et examinés au microscope optique à l'état frais après étalement entre lame et les lamelles et dans la cellule de Kova (**Mode opératoire d'utilisation de la cellule de Kova, cf. annexe 10**) ; on procède ensuite à la coloration de Gram (**Mode opératoire de la technique de coloration de GRAM, cf. annexe 10**).

On effectue la numération bactérienne (flore mono ou pluri bacillaire) ; cette étape est essentielle pour apprécier la qualité du produit pathologique et orienter le choix des milieux.

Il faudra aussi noter l'aspect des éléments cellulaires (polynucléaires plus ou moins altérés et éventuellement d'autres cellules), noter aussi l'abondance des germes (très rares, rares, peu nombreux, nombreux, très nombreux).

Chaque types d'échantillons étaient traités conformément au mode opératoire du laboratoire en vigueur établis et régulièrement actualisés. (**Mode opératoire des examens bactériologiques, cf. annexes**).

#### **4.8.5 Culture**

Les produits pathologiques sont ensemencés sur des milieux de cultures appropriés et incubés à l'étuve à 37°C pendant 24 à 48 heures. Ensuite procéder à la lecture des géloses et faire les antibiogrammes sur les colonies suspectées. Si la culture est stérile après 24h, ré-incuber les géloses au sang pour 48h.

#### **4.8.6 Identification**

L'identification a été basée sur l'examen des caractères morphologiques, culturels, mais surtout biochimiques (galerie API 20E).

#### **4.8.7 Antibiogramme**

Les Bactéries ainsi isolées et identifiées sont soumises à un test antibiogramme pour déterminer leur profil de sensibilité aux antibiotiques.

Les identifications et antibiogrammes sont effectués sur le milieu Muller Hinton par la méthode de stries serrés et par l'utilisation des automates : les appareils Vitek2

Compact ou sur le Mini Api (**Mode opératoire d'utilisation du Vitek®2 Compact et du Mini Api; cf. annexe et 12**)

##### **4.8.7.1 Contexte**

L'antibiogramme doit être faite sur une souche fraîche de 18 à 24h et correctement identifiée (colonies pures).

Pour les hémocultures l'antibiogramme doit être réalisé le plus tôt possible dès la mise en évidence de la positivité du prélèvement.

L'antibiogramme est effectué sur les colonies après s'être basé sur des critères de décisions qui sont résumés dans le tableau suivant :



| Prélèvement                           | Antibiogramme   | Pas d'antibiogramme  |
|---------------------------------------|---|--|
| Hémoculture                           | Pour toute espèce isolée sauf contamination évidente  | Si présence de contaminants  |
| Liquide de ponction (ascite, pleural) | En fonction de l'examen microscopique et du nombre des colonies   | Espèces commensales  |
| Pus                                   | <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>S. aureus</i> , entérobactéries, <i>P. aeruginosa</i> ...<br>En priorité sur l'espèce prédominante | Bactéries commensales, culture polymicrobienne   |
| Coproculture                          | Espèces responsables de gastro-entérites :<br>Shigelles,<br>Salmonelles, Vibriion cholérique, <i>E. coli</i> ...                                    | Espèces commensales  |
| Urine                                 | Si leucocyturie $\geq 10^4$ /ml et<br>bactériurie $\geq 10^5$ UFC/ml  | - Si leucocyturie $\leq 10^4$<br>et bactériurie $\leq 10^3$<br>UFC/ml<br>- Si $> 2$ espèces bactériennes |

#### 4.8.7.2 Technique

##### 4.8.7.2.1 Préparation de l'inoculum

- Prélever une colonie de salmonelles ;
- Emulsionner les colonies dans un tube à hémolyse contenant 2ml d'eau physiologique et agiter au vortex.

#### 4.8.7.2.2 Ajustement de la turbidité de l'inoculum

Ajuster la densité de l'inoculum à celle de l'étalon 0.5 Mc Farland ou grâce à un densitomètre en y ajoutant, soit un fragment de colonie, soit de l'eau physiologique.

#### 4.8.7.2.3 Dilution de l'inoculum

Diluer l'inoculum au 1/10 pour obtenir une turbidité de  $10^7$  UFC (c'est-à-dire mettre 1ml dans 10ml d'eau physiologique).

#### 4.8.7.2.4 Ensemencement des boîtes

Les boîtes sont d'abord séchées à l'étuve à 37°C et ramenées à la température de l'air ambiante avant d'être ensemencées sur la gélose de Mueller Hinton :

- Tremper un écouvillon stérile sec dans l'inoculum ;
- Eliminer l'excès en pressant l'écouvillon contre les parois du tube ;
- Ensemencer en stries sur toute la surface de la boîte à trois reprises ;
- Passer l'écouvillon sur le bord de la gélose.

Les boîtes peuvent également être ensemencées par la technique par inondation (moins utilisé).

#### 4.8.7.2.5 Choix des disques d'antibiotiques

En fonction de la famille (entérobactéries), de la disponibilité et du genre aussi (*Salmonella*), ont été testés les antibiotiques suivants :

- **Bêta-lactamines** : Amoxicilline (25 µg), Amoxicilline/Acide clavulanique (20 µg /10 µg), Ticarcilline (75 µg), Céfalotine (30 µg), Céfoxitine (30 µg), Ceftazidime (30 µg), Céfotaxime (30 µg), Imipenème (10 µg).
- **Quinolones** : Acide nalidixique (30 µg), Péfloxacine (5 µg), Ciprofloxacine (5 µg), Norfloxacine (5 µg).
- **Aminosides** : Gentamicine (15 µg), Tobramycine (10 µg), Amikacine.
- **Autres** : Co-trimoxazole (triméthoprime, sulfaméthoxazole,) (1,25 µg ; 23,75 µg), Fosfomycine (50 µg).

#### 4.8.7.2.6 Disposition des disques

Elle se fait soit avec un distributeur d'antibiotiques ou à l'aide de pinces stériles flambée. Deux importantes précautions sont à prendre :

Les disques doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement, en appuyant légèrement sur la surface de la gélose.

Une distance de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte et deux disques doivent être éloignés de 30mm centre à centre de sorte que les zones d'inhibition ne se chevauchent.

#### **4.8.7.2.7 Lecture des boîtes**

La lecture des boîtes est effectuée après 24h d'incubation, ensuite procéder à la mesure et à la notation du diamètre d'inhibition autour de chaque antibiotique en mm, la lecture se fait sous un bon éclairage avec une règle graduée.

#### **4.8.7.2.8 Interprétation**

La lecture s'effectue en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une règle graduée et confronté aux résultats obtenus par le L'interprétation des résultats a été faite conformément aux recommandations du comité de l'antibiotique de la société Française de Microbiologie version 2017.

#### **4.8.8 Souchothèque**

A la fin de l'identification et l'établissement de l'antibiogramme, on procède dans le cas où on observe des cas de multi-résistance à la conservation des souches concernées par la technique de souchothèque. (**Mode opératoire de la technique de souchothèque, cf. annexe 14**).

#### **4.8.9 Contrôle de qualité**

La technique doit être régulièrement contrôlée avec des souches de référence, *E. coli* ATCC était celle utilisée pour le contrôle de qualité des entérobactéries. Elle était réalisée sur une périodicité d'au moins une fois par semaine.

Ce qui permet de valider la technique, de vérifier la qualité des milieux et réactifs utilisés et les résultats du laboratoire.

### **4.9 Analyse des données**

Les données ont saisies et analysées par Epi Info 7.2.1.0 et nous avons utilisé Microsoft Word et Excel 2013 pour l'élaboration des tableaux et des figures.

## **5 Aspects éthiques**

L'anonymat et la confidentialité des patients ont été respectés conformément aux règles d'éthique médicale et à la législation sur la recherche biomédicale et scientifique.

## 6 Diagramme de GANTT

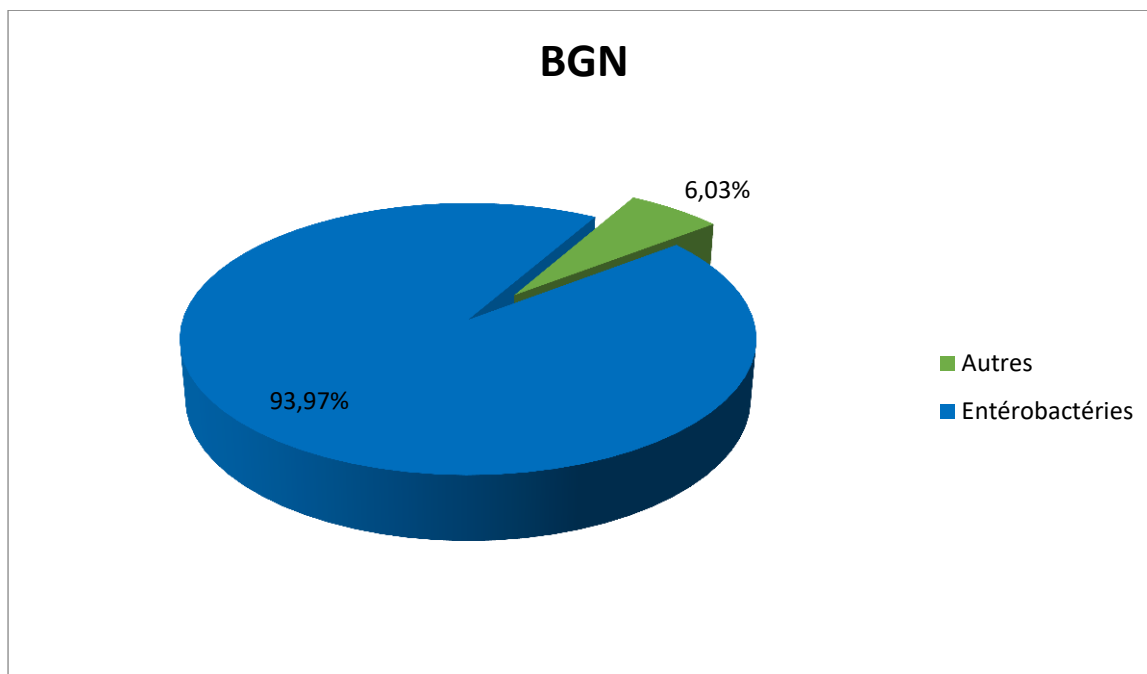
| Période/s activités | Nov. 2016 | Déc. 2016 | Janv. 2017 | Fév. 2017 | Mars 2017 | Avr. 2017 | Mai 2017 | Juin 2017 | Juil. 2017 | Aout 2017 | Sep. 2017 | Nov. 2017 | Oct. 2017 | Déc. 2017 | Janv. 2018 | Fév. 2018 | Mars 2018 | Avr. 2018 | Mai 2018 | Juin 2018 | Juil. 2018 |        |
|---------------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|------------|--------|
| Revue littérature   | Yellow    | Yellow    | Yellow     | Yellow    | Yellow    | Yellow    | Yellow   | Yellow    | Yellow     | Yellow    | Yellow    | Yellow    | Yellow    | Yellow    | Yellow     | Yellow    | Yellow    | Yellow    | Yellow   | Yellow    | Yellow     | Yellow |
| Méthodologie        |           |           |            |           | Blue      | Blue      | Blue     | Blue      | Blue       |           |           |           |           |           |            |           |           |           |          |           |            |        |
| Généralités         |           |           |            |           |           |           |          |           | Red        | Red       | Red       | Red       | Red       | Red       | Red        | Red       | Red       | Red       | Red      | Red       | Red        | Red    |
| Analyse des données |           |           |            |           |           |           |          |           |            |           |           |           |           | Brown     | Brown      |           |           |           |          |           |            |        |
| Corrections         |           |           |            |           |           |           |          |           |            |           |           |           |           |           |            |           |           | Grey      | Grey     | Grey      | Grey       |        |
| soutenance          |           |           |            |           |           |           |          |           |            |           |           |           |           |           |            |           |           |           |          |           |            | Green  |

## **5. RESULTATS**

## 7 Résultats

### 7.1 Résultats globaux

Pendant la période d'étude (de 2015 à 2017), 739 bactéries à Gram négatifs ont été isolées dans le laboratoire de bactériologie du LRM dont 693 entérobactéries et 46 non entérobactéries (*Acinetobacter*, *Bordetella*, *Burkholderia*, *Neisseria* et *Pseudomonas*).



**Figure 5 :** Fréquence d'isolement des bactéries à Gram négatifs durant la période d'étude.

Les entérobactéries représentaient 93,97% des bactéries à Gram négatifs isolées.

**Tableau IV** : Fréquence d'isolement en fonction des principaux genres.

| Genres                     | Effectifs  | Pourcentage |
|----------------------------|------------|-------------|
| <b>Entérobactéries</b>     |            |             |
| <i>Salmonella spp.</i>     | <b>54</b>  | <b>7,31</b> |
| <i>Escherichia spp.</i>    | 363        | 49,12       |
| <i>Klebsiella spp.</i>     | 132        | 17,86       |
| <i>Proteus spp.</i>        | 56         | 7,58        |
| <i>Enterobacter spp.</i>   | 41         | 5,55        |
| <i>Morganella spp.</i>     | 15         | 2,03        |
| <i>Providencia spp.</i>    | 11         | 1,49        |
| <i>Raoultella spp.</i>     | 6          | 0,81        |
| <i>Citrobacter spp.</i>    | 5          | 0,68        |
| <i>Serratia spp.</i>       | 4          | 0,54        |
| <i>Leclercia spp.</i>      | 1          | 0,14        |
| <i>Shigella spp.</i>       | 3          | 0,41        |
| <i>Pantoea spp.</i>        | 1          | 0,14        |
| <b>Non entérobactéries</b> |            |             |
| <i>Acinetobacter spp.</i>  | 20         | 2,71        |
| <i>Pseudomonas spp.</i>    | 20         | 2,71        |
| <i>Neisseria spp.</i>      | 5          | 0,68        |
| <i>Bordetella spp.</i>     | 1          | 0,14        |
| <i>Burkholderia spp.</i>   | 1          | 0,14        |
| <b>TOTAL</b>               | <b>739</b> | <b>100</b>  |

La fréquence d'isolement de *salmonella* est de 54 soit 7,31% sur 739 bactéries à Gram négatifs.

**Tableau V** : Fréquence d'isolement des bactéries à Gram à négatifs en fonction des différents types de prélèvements.

| Type de prélèvement            | Autres | Entérobactéries | TOTAL |
|--------------------------------|--------|-----------------|-------|
| <b>Urines</b>                  | 3      | 311             | 314   |
| <b>Pus</b>                     | 31     | 261             | 292   |
| <b>Selles</b>                  | 0      | 43              | 43    |
| <b>Sang<br/>(Hémocultures)</b> | 5      | 33              | 38    |
| <b>Liquide d'ascite</b>        | 1      | 27              | 28    |
| <b>Prélèvement<br/>urétral</b> | 3      | 7               | 10    |
| <b>Expectoration</b>           | 3      | 5               | 8     |
| <b>Sperme</b>                  | 0      | 3               | 3     |
| <b>Intertrigo</b>              | 0      | 1               | 1     |
| <b>LCR</b>                     | 0      | 1               | 1     |
| <b>Liquide pleural</b>         | 0      | 1               | 1     |
| <b>TOTAL</b>                   | 46     | 693             | 739   |

Les prélèvements d'urines (331), de pus (261) et de selles (43) étaient les plus fréquents dans lesquels les entérobactéries ont été isolées.



## 7.2 Résultats descriptifs

**Tableau VI :** Fréquence des salmonelles isolées en fonction des espèces.

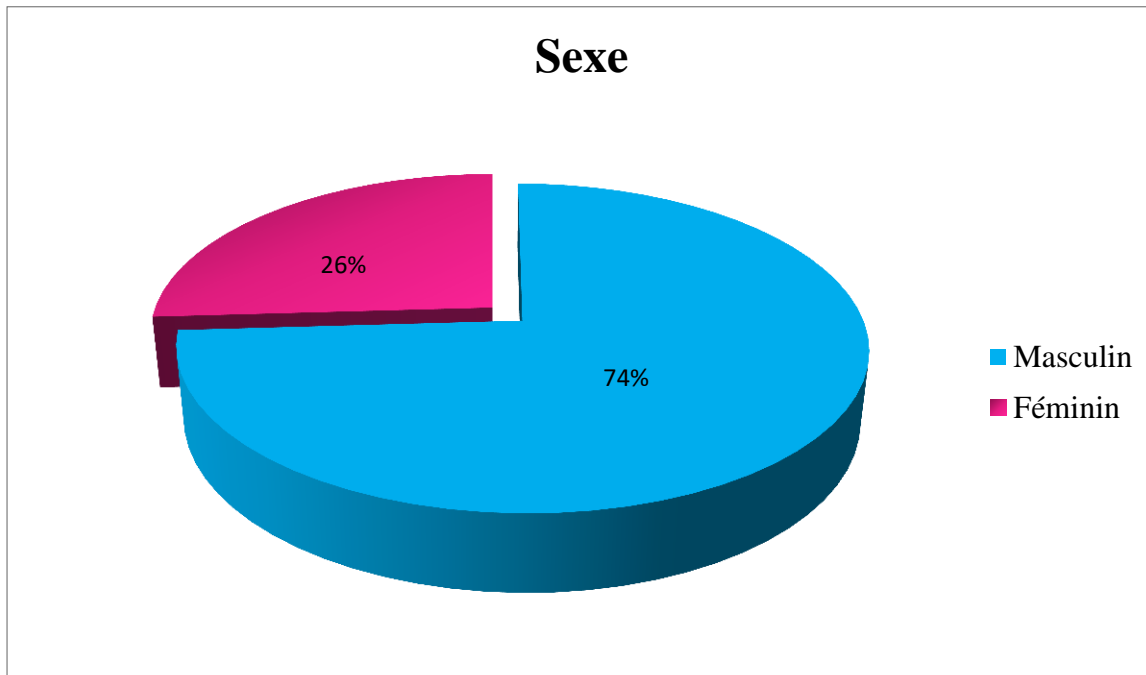
| Espèces  | Effectifs | Pourcentage |
|--|-----------|-------------|
| <b><i>S. enterica</i> spp. <i>enterica</i></b> | 21        | 38,39       |
| <b><i>S. spp.</i></b>                          | 17        | 31,48       |
| <b><i>S. group.</i></b>                        | 9         | 16,67       |
| <b><i>S. Typhi</i></b>                         | 6         | 11,11       |
| <b><i>S. enterica</i> spp. <i>arizonae</i></b> | 1         | 1,85        |
| <b>Total</b>                                   | 54        | 100         |

Nous avons identifié *Salmonella enterica* spp. *enterica* comme l'espèce la plus retrouvée avec une fréquence de 38,39%.

**Tableau VII :** Fréquence d'isolement des *Salmonella* en fonction du type d'échantillon.

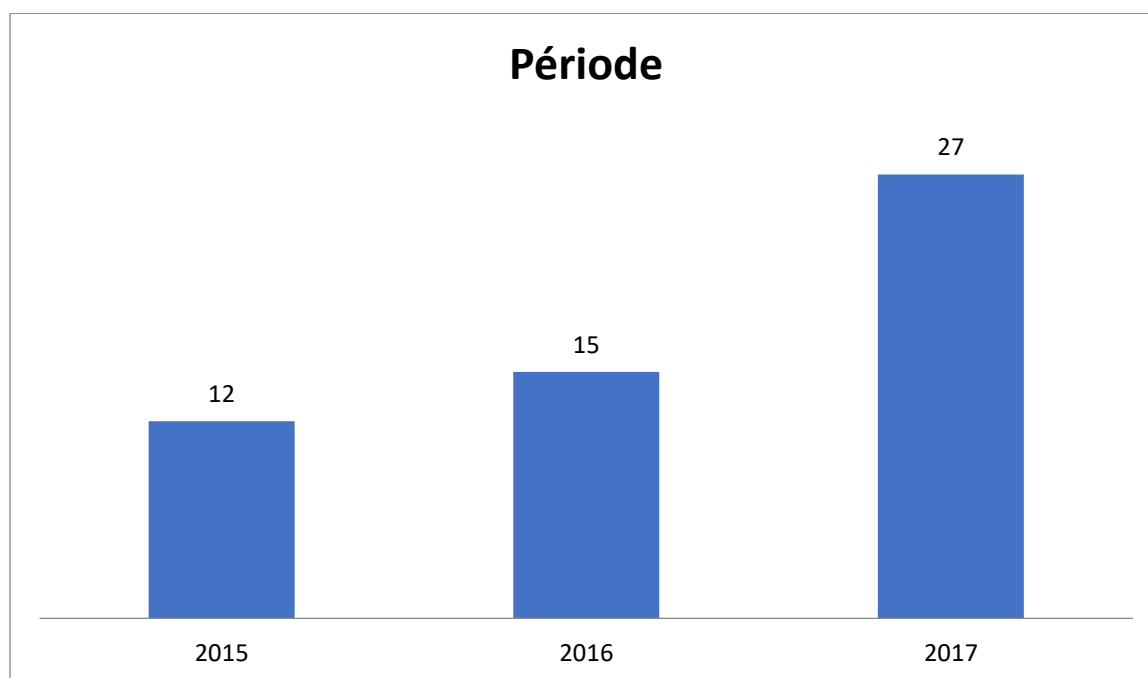
| Types de prélèvement             | Effectifs | Pourcentage |
|----------------------------------|-----------|-------------|
| <b>Selles<br/>(coproculture)</b> | 37        | 68,52       |
| <b>Sang<br/>(Hémocultures)</b>   | 11        | 20,37       |
| <b>Urines</b>                    | 3         | 5,56        |
| <b>Pus</b>                       | 2         | 3,70        |
| <b>Liquide pleural</b>           | 1         | 1,85        |
| <b>Total</b>                     | 54        | 100         |

Les selles et les hémocultures sont les plus prépondérants avec respectivement une fréquence de 68,52% et de 20,37%.



**Figure 6 :** Fréquence des infections à Salmonelles par rapport au sexe.

Les Salmonelles ont été plus retrouvées chez les hommes avec une fréquence de 74%.  
Le sexe-ratio est de 2,85.



La fréquence d'isolement des *Salmonella* augmentent de manière croissante durant la période d'étude.

**Figure 7** : Fréquence d'isolement de *Salmonella* en fonction de la période.

**Tableau VIII** : Fréquence selon les espèces isolées et la nature des prélèvements.

| Espèces                          | Hémocultures | Liquide pleural | Pus | Selles | Urines | Total |
|----------------------------------|--------------|-----------------|-----|--------|--------|-------|
| <i>S. enterica spp. enterica</i> | 2            | 1               | 0   | 18     | 0      | 21    |
| <i>S. group</i>                  | 2            | 0               | 1   | 6      | 0      | 9     |
| <i>S. Typhi</i>                  | 5            | 0               | 0   | 1      | 0      | 6     |
| <i>S. spp</i>                    | 2            | 0               | 1   | 11     | 3      | 17    |
| <i>S. enterica spp. arizonae</i> | 0            | 0               | 0   | 1      | 0      | 1     |
| <b>Total</b>                     | 11           | 1               | 2   | 37     | 3      | 54    |

*S. enterica spp. enterica* a été l'espèce la plus retrouvées dans les selles.

**Tableau IX** : Fréquence selon le sexe et les espèces isolées.

| Sexe         | <i>S. enterica</i> spp. arizona | <i>S. enterica</i> spp. enterica | <i>S.</i> group | <i>S.</i> spp | <i>S.</i> Typhi | TOTAL |
|--------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------|---------------|-----------------|-------|
| Masculin     | 1                               | 15                               | 6               | 12            | 6               | 40    |
| Féminin      | 0                               | 6                                | 3               | 5             | 0               | 14    |
| <b>TOTAL</b> | 1                               | 21                               | 9               | 17            | 6               | 54    |

*S. enterica* spp. *enterica* était l'espèce la plus retrouvée chez les deux sexes avec une prédominance de 38,88%.

### 7.3 Profils de résistance aux principales familles d'antibiotiques testés.

**Tableau X** : Profil de résistance aux bêta-lactamines.

| Antibiotiques                   | Résistants  | Sensibles | Total |
|---------------------------------|-------------|-----------|-------|
| Amoxicilline                    | 10 (18,51%) | 44        | 54    |
| Amoxicilline/Acide clavulanique | 4 (7,69%)   | 48        | 52    |
| Ticarcilline                    | 8 (15,38%)  | 44        | 52    |
| Céfalotine                      | 5 (11,90%)  | 37        | 42    |
| Céfoxitine                      | 3 (6%)      | 47        | 50    |
| Ceftazidime                     | 6 (11,11%)  | 48        | 54    |
| Céfotaxime                      | 5 (10,86%)  | 41        | 46    |
| Imipenème                       | 0 (0%)      | 49        | 49    |

Les résistances les plus élevées ont été observées à l'Amoxicilline (18,51%) et à la Ticarcilline (15,38%) dans les cas où ils ont été testés.

**Tableau XI** : Profil de résistance aux quinolones.

| Antibiotiques     | Résistants  | Sensibles | Total |
|-------------------|-------------|-----------|-------|
| Acide nalidixique | 15 (31,91%) | 32        | 47    |
| Péfloxacine       | 1 (25%)     | 3         | 4     |
| Ciprofloxacine    | 8 (19,51%)  | 33        | 41    |
| Norfloxacine      | 2 (8,33%)   | 22        | 24    |

Les souches de *Salmonella* ont montrés sur une certaine résistance à l'acide nalidixique (31,91%), à la péfloxacine (25%) et à la ciprofloxacine (19,51%) dans les cas où ils ont été testés.

**Tableau XII** : Profil de résistance aux aminosides.

| Antibiotiques | Résistants  | Sensibles | Total |
|---------------|-------------|-----------|-------|
| Gentamicine   | 10 (19,60%) | 41        | 51    |
| Tobramycine   | 9 (20,93%)  | 34        | 43    |
| Amikacine     | 8 (15,68%)  | 43        | 51    |

Les *Salmonella* sont résistantes à la gentamicine, à la tobramycine et à l'amikacine avec respectivement 19,60%, 20,93% et 15,68% dans les cas où ils ont été testés.

**Tableau XIII** : Profil de résistance aux autres familles d'antibiotiques.

| Antibiotiques  | Résistants | Sensibles | Total |
|----------------|------------|-----------|-------|
| Co-trimoxazole | 7 (13,20%) | 46        | 53    |
| Fosfomycine    | 0 (0%)     | 4         | 4     |

12,24% des souches de *Salmonella* étaient résistantes au co-trimoxazole dans les cas où il a été testé.

Aucun cas de résistance à la fosfomycine.

## 7.4 Souches multi résistantes

Parmi les souches isolées pendant notre période d'étude, nous avons isolés 5 souches multi résistantes aux antibiotiques.

### Patient 1

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>Age</b>        | <b>81</b>  |
| <b>Sexe</b>       | Masculin   |
| <b>Période</b>    | 30/10/2015   |
| <b>Espèce</b>     | <i>Salmonella</i> group.                               |
| <b>Résistants</b> | AMOX, AMC, TIC, CFT, CEF, CTX, CAZ, TOB, AKN, GEN, NAL |
| <b>Sensibles</b>  | TZP, IMI, TSU, CIP                                     |

### Patient 2

|                   |   |
|-------------------|---|
| <b>Age</b>        | <b>1</b>                                |
| <b>Sexe</b>       | Masculin                                |
| <b>Période</b>    | 19/10/2015                              |
| <b>Espèce</b>     | <i>Salmonella</i> spp.                  |
| <b>Résistants</b> | AMOX, AMC, TIC, CFT, TOB, AKN, GEN, TSU |
| <b>Sensibles</b>  | TZP, IMI, CTX, CAZ, NAL, CIP            |

### Patient 3

|                   |   |
|-------------------|---|
| <b>Age</b>        | <b>50</b>   |
| <b>Sexe</b>       | Masculin  |
| <b>Période</b>    | 01/07/2015  |
| <b>Espèce</b>     | <i>Salmonella</i> group.                          |
| <b>Résistants</b> | AMOX, TIC, CFT, CEF, CTX, CAZ, TOB, AKN, GEN, NAL |
| <b>Sensibles</b>  | AMC, TZP, IMI, TSU, PEF, CIP                      |

**Patient 4**

|                   |   |
|-------------------|---|
| <b>Age</b>        | <b>31</b>   |
| <b>Sexe</b>       | Masculin  |
| <b>Période</b>    | 30/06/2015  |
| <b>Espèce</b>     | <i>Salmonella</i> group.                          |
| <b>Résistants</b> | AMOX, AMC, TIC, CFT, CTX, CAZ, TOB, NAL, PEF, CIP |
| <b>Sensibles</b>  | TZP, IMI, CEF, AKN, GEN, TSU                      |

**Patient 5**

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>Age</b>        | <b>27</b>                                    |
| <b>Sexe</b>       | Féminin                                      |
| <b>Période</b>    | 03/06/2015                                   |
| <b>Espèce</b>     | <i>Salmonella</i> spp.                       |
| <b>Résistants</b> | AMOX, TIC, CFT, CEF; TOB, AKN, GEN, NAL, CIP |
| <b>Sensibles</b>  | AMC, TZP, IMI, CTX, CAZ, TSU                 |

## **6. DISCUSSION**



## 8 Discussions

L'objectif de notre étude était d'évaluer le profil de résistance des souches de *Salmonella* isolées au LRM. Pour atteindre cet objectif nous avons adopté la méthodologie qui a consisté à effectuer une étude rétrospective du 1<sup>er</sup> janvier 2015 au 31 décembre 2017, portant sur les patients ayant contracté une infection à entérobactérie plus spécifiquement celles dues à *Salmonella*.

### Du point de vue épidémiologie

Le germe présente une grande diversité d'un hôte à l'autre.

Au cours de l'année 2016, le CNR-ESS a enregistré 10545 isollements humains de *Salmonella* en France, dont 9826 en France métropolitaine et 719 dans les départements et territoires d'outre-mer (DOM-TOM) et à Monaco.

Pour la 1<sup>ère</sup> fois depuis 2004, le sérotype Enteritidis reprends la 1<sup>ère</sup> place des sérotypes responsables des salmonelloses humaines, cela est principalement dû à une diminution du sérotype Typhimurium.

Le système de surveillance du CNR-ESS a permis de suivre l'émergence des clones de salmonelles résistants à la ciprofloxacine, aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, aux carbapénèmes, à l'azithromycine et/ou à la colistine (44).

Selon une étude réalisée par **ABDELKADER A.S et al.** (5) les sérotypes majeurs retrouvés chez l'homme en Afrique sont *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* et *S. Typhi*. Chez la volaille, le sérotype prédominant est *S. Hadar* sauf en Afrique du Nord, où c'est *S. Typhimurium* qui prédomine; aussi que chez le bétail. Des résultats similaires ont été rapportés par **VAN IMMERSEEL F. et al.** (45).

Ainsi chez l'homme, l'analyse a donné 573 échantillons sérotypés avec 88 sérotypes circulants. Les dix (10) sérotypes prédominants retrouvés chez l'homme sont respectivement : *S. Typhimurium* 17,88% ; *S. Concord* 15,83% ; *S. Enteritidis* 13,59% ; *S. Corvallis* 8,57% ; *S. Johannesburg* 2,79% ; *S. Maastricht* 2,23% ; *S. Typhi* 2,23% ; *S. Banana* 2,05% ; *S. Poona* 1,49% ; *S. Dublin* 1,49%. En Afrique de l'Ouest, *S. Typhimurium* est le sérotype le plus prédominant avec une prévalence 20,91% suivi de *S. Enteritidis* 16,59% et de *S. Corvallis* 11,06%.

### Du point de vue résultats

Au terme de notre étude de janvier 2015 à décembre 2017 nous avons étudié 739 prélèvements dans lesquels nous avons isolés 739 bactéries à Gram négatifs dont 693 entérobactéries et 46 autres genres (*Acinetobacter*, *Bordetella*, *Burkholderia*, *Neisseria* et *Pseudomonas*).

Parmi les entérobactéries, nous avons isolés 363 souches d'*E. coli* (49%), 132 *Klebsiella* (17%), 56 *Proteus* (7,5%) et 54 *Salmonella* (7,3%).

Dans la période 2004-2005, des résultats similaires ont été retrouvés par **NIANDOU M.** (46) avec 585 souches d'entérobactéries dont 357 *E. coli* soit 61%, 83 *K. pneumoniae* soit 14%, 40 *Enterobacter sp.* soit 7% et 29 *S. enterica* soit 5%.

La majorité de nos souches provenaient d'urines (311) soit 44%, de pus (261) soit 37% et de selles (43) soit 6%, ces résultats se rapprochent de ceux rapportés par NIANDOU M. où les produits pathologiques les plus incriminés étaient constitués d'urines (367) soit 63%, de pus (112) soit 19% et de prélèvements vaginales (46) soit 7% et similaire à ceux trouvés par SAYE T. (47) avec 1551 souches dans les urines (63%), 384 dans les pus (15%) et 197 dans les selles (8%). A noter la rare présence de *Salmonella* dans les urines dans notre étude (dont 3 cas) est supérieur à celle retrouvées par ZITTI T.J.Z (48) qui n'avait eu qu'un cas (*Salmonella* Paratyphi A). Ceux-ci étant des cas de contaminations probables.

Durant cette étude, nous avons isolés 54 souches de *Salmonella* provenant essentiellement de *Salmonella enterica* spp. *enterica* avec 21 souches soit 38%.

TRAORE S. (49) avait trouvé dans son étude une dominance de *Salmonella* séro-groupe D avec une fréquence de 70% soit 138 sur ces 198 souches identifiées. MALLE D. (50) avait identifié *Salmonella* Paratyphi B avec une fréquence de 32.80% selon le réactif utilisé.

Dans notre étude le sexe masculin a été le plus dominant avec 74% dans notre étude et 26% pour le sexe féminin.

Ce résultat comparable à celui de KEITA .I (51) qui a trouvé une prédominance masculine de 60,3% et est contraire à celle de DIARRA D. (52) chez lequel le sexe féminin représentait une proportion de 53,7% dans ces résultats positifs. De même que pour BORE D. (53) avec 59,1%.

TRAORE M. (54) a trouvé une prédominance masculine de 59% dans son étude en 2007. Nos souches ont été relativement peu résistantes aux antibiotiques testés.

Ainsi pour les bêta-lactamines, Les résistances les plus élevées ont été observées à l'amoxicilline (18,51%) et à la Ticarcilline (15,38%) ; et faible avec l'association amoxicilline/acide clavulanique (7,69%). SAYE T. (47) a observé les résistances les plus élevées à *Salmonella* étaient l'amoxicilline et la Ticarcilline avec 44,4% ainsi que AIBO N.I (55) dans son étude où les souches de *S. Typhi* étaient également sensibles à la gentamicine (65%) à l'amoxicilline (54%) à l'association amoxicilline + acide clavulanique (79%). DIABATE C.F.M (56) a également trouvé une résistance de 15,38% à l'amoxicilline en 2004.

Les céphalosporines et les carbapénems ont été parmi les antibiotiques les efficaces : céfalotine (88,09%), céfoxitine (94%), ceftazidime (88,88%), céfotaxime (89,13%) et imipénème (100%).

Des taux de résistance un peu plus élevées ont été observés aux aminosides (tobramycine 20,98%, gentamicine 19,60%, amikacine 15,68%) et aux quinolones (acide nalidixique 31,91%, péfloxacin 25%, ciprofloxacine 19,51%, norfloxacine 8,3%). Le co-trimoxazole présentait 13% de résistance.

Il y a de plus en plus de preuves montrant que les souches de *S. Typhi* multi résistantes augmentent dans le monde entier. Une analyse récente de 41 cas de fièvre typhoïde du Cambodge a montré des taux de résistance aux médicaments multiples de 56% (contre

l'ampicilline, le triméthoprim / sulfaméthoxazole et le chloramphénicol) (57). Dans une autre étude canadienne, la résistance des isolats de *S. Typhi* à l'acide nalidixique a atteint 80% tandis que la résistance aux bêta-lactamines est restée constante entre 2002 et 2007. Il faut garder à l'esprit, cependant, que la résistance à l'acide nalidixique prédit un traitement échec avec les fluoroquinolones (malgré la sensibilité in vitro de l'isolat aux fluoroquinolones). Par conséquent, les taux élevés de résistance de *S. Typhi* à l'acide nalidixique pourraient empêcher l'utilisation des quinolones dans le traitement empirique de la fièvre typhoïde au Canada (58). D'un autre côté, d'autres études ont indiqué que si la résistance aux quinolones est maintenant répandue chez *S. Typhi*, d'autres options thérapeutiques conventionnelles ont retrouvé une sensibilité. Par exemple, dans le sous-continent indien, les taux de sensibilité de 128 isolats de *S. Typhi* au chloramphénicol, à l'ampicilline et au triméthoprim dépassaient 90% (59). Les résultats d'une étude confirment qu'au Liban, la résistance aux antimicrobiens parmi les isolats de *S. Typhi* est encore moindre malgré l'augmentation des cas signalés de résistance aux antimicrobiens, la grande majorité de ces isolats étaient sensibles à divers agents antibiotiques, notamment l'ampicilline, les céphalosporines, les quinolones et le triméthoprim / sulfaméthoxazole. (60).

Le profil de susceptibilité de ces souches à la ceftriaxone et à d'autres antibiotiques était examiné pour déterminer leur prévalence chez les patients dans le sud-ouest du Nigeria. 21 isolats cliniques ont été testés in vitro contre cinq antibiotiques. Un plus grand nombre d'isolats a montré MDR (76,19%) même à des concentrations plus élevées d'antibiotiques, alors que 61,9% étaient sensibles à la ceftriaxone. Parmi les isolats, 71,43% de résistance a été enregistrée contre l'ampicilline, 66,67% contre amoxicilline, résistance de 38,1% contre la ceftriaxone, résistance de 80,95% contre le chloramphénicol et 57,14% de résistance contre le co-trimoxazole. Cependant, 3 isolats (14,29%) étaient complètement sensibles à tous les antibiotiques. Le résultat obtenu montre une augmentation de l'incidence de la souche MDR *S. enterica* dans le sud-ouest du Nigeria, et que la ceftriaxone reste choix contre les souches de *Salmonella enterica*, même si le nombre d'isolats la résistance contre les antibiotiques est en augmentation (61).

En Arabie Saoudite, l'isolement de *Salmonella* spp. d'échantillons cliniques et environnementaux a permis d'isoler 33 souches identifiées comme *S. enterica* sur la base de leurs caractéristiques biochimiques et de l'ADNr 16S séquences. *S. enterica* serovar Enteritidis a montré la plus forte prévalence (39,4%), suivie par *S. Paratyphi* (21,2%), *S. Typhimurium* (15,2%), *S. Typhi* et *S. Arizona* (12,1%), respectivement. La plupart des isolats étaient résistants aux céphalosporines de 1ère et 2ème générations; et les aminoglycosides. De plus, plusieurs isolats de *S. enterica* ont montré une résistance aux antibiotiques de première intention utilisé pour le traitement de la salmonellose, y compris l'ampicilline, le triméthoprim-sulfaméthoxazole et le chloramphénicol. En outre, les résultats ont révélé l'émergence de deux *S. enterica* isolats montrant une résistance à la céphalosporine de troisième génération (60).

Nous avons identifié une souche de *S. enterica* spp. *arizonae* qui était particulièrement sensible à tous les antibiotiques testés excepté l'acide nalidixique; **DIOUARA M.** (62) avait obtenu une résistance au co-trimoxazole et à l'association amoxicilline/acide clavulanique.

De 1995 à 2002, un total de 62 souches de *Salmonella* ont été isolées dans les selles de patients atteints de diarrhée du voyageur. La sensibilité antimicrobienne à 12 antibiotiques a été déterminée, et les mécanismes moléculaires de résistance à plusieurs d'entre eux ont également été détectés. Les niveaux de résistance les plus élevés ont été observés contre la tétracycline et l'ampicilline (21 et 19%, respectivement), suivis de la résistance à l'acide nalidixique (16%), qui a été principalement détectée à partir de 2000 (63).

Dans une étude réalisée au Mali et au Chili, une méthodologie de PCR a été développée pour identifier les sérovars de *Salmonella enterica* Typhi, Paratyphi A et Paratyphi B. Une PCR multiplexe a identifié les souches de séro groupe D, A, B et Vi positives; une autre a confirmé l'antigène flagellaire "d", "a" ou "b". Les tests à l'aveugle de 664 isolats de sang de *Salmonella* maliens et chiliens ont démontré une sensibilité et une spécificité de 100% (64) .

## **7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS**

## 9 Conclusion

Au terme de notre étude portant sur la surveillance de la résistance aux antimicrobiens des souches de *Salmonella* isolées au LRM, nous avons isolés 54 souches de *Salmonella* sur 693 entérobactéries. Le sexe masculin a été le plus prédominant avec 74,07%. Les selles et les hémocultures étaient les types de prélèvements les plus fréquents dans lesquels nos souches ont été isolées, avec *Salmonella enterica* spp. *enterica* étant la plus retrouvées.

Pour une espèce naturellement sensible, nos souches ont été présentées un certain taux de résistances aux antibiotiques testés. Le plus élevé aux quinolones était à l'acide nalidixique (31,91%), aux aminosides (tobramycine 20,98%), aux bêta-lactamines (amoxicilline 18,51%) ainsi que 13,20% au co-trimoxazole.

### 9.1 Recommandations

#### Au LRM

- L'évaluation périodique de la surveillance et de la pertinence des données collectées sur la résistance aux antimicrobiens ;
- Renforcer la capacité du laboratoire à fournir des tests spécialisés pour le sérotypage pour la détection moléculaire de la résistance et les tests phénotypiques de résistance aux antibiotiques des souches de *Salmonella* ;
- Renforcer la surveillance de la résistance aux antibiotiques comme un élément clef d'un programme de lutte contre la résistance aux antimicrobiens afin de préserver l'efficacité des antibiotiques et d'améliorer la santé et la sécurité des patients et de la population.

#### Au Ministère de la santé

- L'intégration de la surveillance dans un programme de lutte contre l'antibiorésistance et les programmes de lutte contre les maladies infectieuses ;
- Mettre en place un comité de l'antibiogramme sur le plan national, sous régional ou continental ;
- Organiser la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne en réseau dans la sous-région afin de lutter efficacement contre ce phénomène aux lourdes conséquences ;
- Promouvoir l'utilisation judicieuse (adéquate) des antibiotiques en médecine humaine, animale et en agro-alimentation, une dimension et incontournable ;
- Elaborer et promouvoir un programme d'information, de sensibilisation, et de communication à l'intention des populations sur l'intérêt de l'hygiène alimentaire, le danger de l'automédication et l'utilisation judicieuse des antibiotiques en médecine humaine et animale.

### **A la population**

- De privilégier les consultations à l'automédication ;
- D'adopter les bonnes pratiques d'hygiène et alimentaire.

## **8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



1. La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important ! | Carle | Pharmactuel [Internet]. [cité 5 janv 2018]. Disponible sur: <http://www.pharmactuel.com/index.php/pharmactuel/article/view/977>
2. OMS | Résistance aux antimicrobiens [Internet]. WHO. [cité 2 janv 2018]. Disponible sur: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/fr/>
3. Tadesse BT, Ashley EA, Ongarello S, Havumaki J, Wijegoonewardena M, González IJ, et al. Antimicrobial resistance in Africa: a systematic review. BMC Infect Dis [Internet]. 11 sept 2017 [cité 20 sept 2017];17(1):616. Disponible sur: <https://sci-hub.io/https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2713-1>
4. Ouédraogo A., Jean Pierre H, Banuls A., Ouédraogo R, Godreuil S. Émergence et diffusion de la résistance aux antibiotiques en Afrique de l'Ouest : facteurs favorisants et évaluation de la menace. Médecine Santé Trop. 2017;27(2):147-54.
5. Abdelkader AS, Oumarou SS, Maârouhi IM, Ali DB, Yacoubou B. Prévalence Et Diversité De Salmonella En Afrique : Analyse Qualitative Et Quantitative. Eur Sci J ESJ [Internet]. 31 oct 2017 [cité 12 févr 2018];13(30). Disponible sur: <https://eujournal.org/index.php/esj/article/view/10088>
6. S K. Typhoid fever in sub-Saharan Africa: challenges of diagnosis and management of infections. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 12 sept 2017]. Disponible sur: [http://login.research4life.org/tacsgr1www\\_ncbi\\_nlm\\_nih\\_gov/pubmed/?term=salmonella+typhi+and+Mali](http://login.research4life.org/tacsgr1www_ncbi_nlm_nih_gov/pubmed/?term=salmonella+typhi+and+Mali)
7. OMS | Infections à *Salmonella* (non typhiques) [Internet]. WHO. [cité 15 janv 2018]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/fr/>
8. Akhtar S, Sarker MR, Jabeen K, Sattar A, Qamar A, Fasih N. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar typhi and paratyphi in South Asia-current status, issues and prospects. Crit Rev Microbiol. 2015;41(4):536-45.
9. Klemm EJ, Shakoor S, Page AJ, Qamar FN, Judge K, Saeed DK, et al. Emergence of an Extensively Drug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhi Clone Harboring a Promiscuous Plasmid Encoding Resistance to Fluoroquinolones and Third-Generation Cephalosporins. mBio [Internet]. 20 févr 2018 [cité 8 mars 2018];9(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5821095/>
10. Dramé AM. La prévalence de la fièvre typhoïde à Bamako en 2007 [Thèse de pharmacie]. Université de Bamako; 2010.
11. Tapia MD, Tennant SM, Bornstein K, Maiga A, Malle D, Sow SO. Invasive Nontyphoidal *Salmonella* Infections Among Children in Mali, 2002–2014: Microbiological and Epidemiologic Features Guide Vaccine Development. Clin Infect Dis [Internet]. 2015 [cité 14 sept 2017]; Disponible sur: [http://login.research4life.org/tacsgr1www\\_ncbi\\_nlm\\_nih\\_gov/pmc/articles/PMC4596934/](http://login.research4life.org/tacsgr1www_ncbi_nlm_nih_gov/pmc/articles/PMC4596934/)
12. Avril J-L, Dabernat H, Denis F, Monteil H. Bactériologie clinique. 3ème. Paris: Ellipses édition marketing S.A.; 2000. 171-173 p.
13. Fauchère J louis, Avril J-L. Bactériologie générale et médicale. Paris: Ellipses; 2002. 365 p.
14. Freney J, Girardo P, Freydière AM, Renaud FNR. Entérobactéries. Juin 2008;(90-5-135).
15. Ferron A. Bactériologie médicale. 15° éd. C et R; 157-163 p.

16. Farmer III JJ, Boatwright KD, Janda JM. Enterobacteriaceae: introduction and identification. In: Manual of clinical microbiology. 9<sup>ème</sup>. Patrick R. Murray; 2007. p. 649-66.
17. Bonnet R. Beta-lactamines et Entérobactéries. In: AntibioGramme. 3<sup>ème</sup>. Paris: ESKA; 2012. p. 165-88.
18. Freney J, Croze M. ENTEROBACTERIACEAE- généralité. In: Précis de bactériologie clinique. 2<sup>ème</sup>. Paris: ESKA; 2007. p. 979-87.
19. Bimet F. Conservation des bactéries. In: Précis de bactériologie clinique. 2<sup>°</sup> éd. Paris: Editions ESKA; 2007. p. 729-33.
20. Grimont PAD, Weill F-X. Salmonella. In: Précis de bactériologie clinique. 2<sup>°</sup> éd. Paris: Editions ESKA; 2007. p. 1051-72.
21. Zaki S, Karande S. Multidrug-resistant typhoid fever: A review. Vol. 5. 2011. 324 p.
22. Nataro JP, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB, Strockbine NA. Escherichia, Shigella, and Salmonella. In: Manual of clinical microbiology. 9<sup>ème</sup> édition. Washington, D.C: ASM Press; 2007. p. 670-87.
23. Le Hello S, Ploy M-C, Denis F. Enterobacteriaceae. In: Bactériologie médicale Techniques usuelles. 3<sup>è</sup> édition. Paris: Elsevier Masson S.A.; 2016. p. 302-25.
24. Ryan MP, O'Dwyer J, Adley CC. Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen Salmonella. BioMed Res Int [Internet]. 2017 [cité 27 nov 2017]; Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/3782182/abs/>
25. Denis F, Ploy M-C, Martin C, Bingen E, Quentin R. Bactériologie médicale Techniques usuelles. Paris: Elsevier Masson; 2007. 304-313 p.
26. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. 8<sup>°</sup> éd. Canada: Elsevier Masson Health Sciences; 2015. 848 p.
27. Cavallo J., Meyran M. Les salmonelles et leur pathologie : base bactériologique du traitement. Médecine et Maladies Infectieuses. Elsevier. mars 1992;331-9.
28. Control WEC on S, Organization WH. Lutte contre les salmonelloses : le rôle de l'hygiène appliquée aux animaux et aux produits, rapport d'un comité d'experts de l'OMS [réuni à Genève du 22 au 29 septembre 1987]. 1988 [cité 20 déc 2017]; Disponible sur: <http://www.who.int/iris/handle/10665/39650>
29. Tifoidea.pdf [Internet]. [cité 20 déc 2017]. Disponible sur: [http://www.vacunasyviajes.es/vacunasyviajes/Fiebre\\_Tifoidea\\_Atlas\\_files/Tifoidea.pdf](http://www.vacunasyviajes.es/vacunasyviajes/Fiebre_Tifoidea_Atlas_files/Tifoidea.pdf)
30. [cité 5 janv 2018]. Disponible sur: <http://salmonellatyphi.org/diagnostic.html>
31. Guillaume P. Les milieux de culture en microbiologie [Internet]. 2004 [cité 5 janv 2018]. Disponible sur: <http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/milieux.html>
32. Avril J-L, Dabernat H, Denis F, Monteil H. Bactériologie clinique. 3<sup>ème</sup>. Paris: Ellipses édition marketing S.A.; 2000. 189-203 p.
33. Ellis E., Williams J., Snoeyenbos G., Martin W. Culture methods for the detection of animal salmonellosis and arizonosis. Ames, IOWA USA: Iowa State University Press; 1976.

34. Wray C, Davies R. WHO IRIS: Guidelines on detection and monitoring of salmonella infected poultry flocks with particular reference to salmonella enteritidis [Internet]. 1994 [cité 9 janv 2018]. Disponible sur: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/66292?locale=fr>
35. Voogt N, Raes M, Wannet WJ, Henken AM, van de Giessen AW. Comparison of selective enrichment media for the detection of Salmonella in poultry faeces. Lett Appl Microbiol. févr 2001;32(2):89-92.
36. Reissbrodt R. Conventional and alternative methods for isolation and identification of Salmonella anoverview Biotest Bull. 1995;143-56.
37. Kenneth T. Salmonella and Salmonellosis [Internet]. Todar's online textbook of bacteriology. [cité 21 déc 2017]. Disponible sur: [http://textbookofbacteriology.net/salmonella\\_3.html](http://textbookofbacteriology.net/salmonella_3.html)
38. Hektoen Enteric agar | Medical Laboratories [Internet]. [cité 29 déc 2017]. Disponible sur: <http://www.medical-labs.net/hektoen-enteric-agar-2204/>
39. Fauchère J-L, Avril J-L. Bactériologie générale et médicale. Ellipses édition marketing S.A.; 2002. 365 p.
40. 9789241564748\_eng.pdf [Internet]. [cité 21 déc 2017]. Disponible sur: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf)
41. Weill F-X, Lailler R, Brisabois A. Tendances récentes de la résistance aux antibiotiques d'origines animale et humaine. 13 juill 2004;160.
42. Weill F-X, Espié E, Quelquejeu N, Le Querrec F, De Valk H, Vaillant V. Salmonellose à Salmonella enterica serotype Newport multirésistante aux antibiotiques. BEH. 13 juill 2004;158.
43. Flambée de Salmonella Agona liée à des préparations pour nourrissons distribuées à l'échelle internationale [Internet]. 2017 [cité 15 janv 2018]. Disponible sur: <http://www.euro.who.int/fr/health-topics/emergencies/pages/news/news/2017/12/salmonella-contamination-of-infant-formula>
44. rapport-cnr\_escherichia-coli-shigella-salmonella-2016\_pdf\_final\_.pdf [Internet]. [cité 4 mai 2018]. Disponible sur: [https://www.pasteur.fr/sites/default/files/rubrique\\_pro\\_sante\\_publique/les\\_cnr/escherichia\\_coli\\_shigella\\_salm onella/rapport-cnr\\_escherichia-coli-shigella-salmonella-2016\\_pdf\\_final\\_.pdf](https://www.pasteur.fr/sites/default/files/rubrique_pro_sante_publique/les_cnr/escherichia_coli_shigella_salm onella/rapport-cnr_escherichia-coli-shigella-salmonella-2016_pdf_final_.pdf)
45. Van Immerseel F, De Buck J, Boyen F, Pasmans F, Bertrand S, Collard J., et al. Salmonella dans la viande et dans les oeufs : un danger pour le consommateur qui demande la mise en place d'un programme de lutte efficace - Van Immerseel F. ORBI [Internet]. Université de Liège. 2005 [cité 12 févr 2018];34-48. Disponible sur: <https://orbi.uliege.be/handle/2268/132544>
46. Niandou MT. Sensibilité et évolution de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques. [Bamako]: Faculté de médecine et d'odonto-stomatologie; 2004.
47. Saye T. Prevalence des enterobacteries productrices de BLSE au CHU du point G de 2006 à 2008 [Thèse de pharmacie]. Université de Bamako; 2011.
48. Zitti TJZ. Mise en place de la surveillance des résistances aux antibiotiques des germes responsables d'infections urinaires dans le laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako [Thèse de pharmacie]. Université de Bamako; 2014.
49. Traoré S. Typage des souches de Salmonella isolées au laboratoire de bactériologie CVD du CHU Gabriel Touré de janvier 2011 à juillet 2013 [Thèse de pharmacie]. Université de Bamako; 2012.

50. Mallé D. Typage des souches de *Salmonella* isolées au laboratoire de bactériologie du CVD du CHU Gabriel Touré de janvier 2005 à mai 2006 [Thèse de pharmacie]. Université de Bamako; 2008.
51. Keita I. Les salmonelloses chez les enfants de 0 à 35 mois traitées en externe dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel Touré de janvier [Thèse de médecine]. Université de Bamako; 2008.
52. Diarra D. Salmonelloses chez les enfants de 0 à 15 ans hospitalisés dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel Touré du 1er janvier au 31 décembre 2008 [Thèse de médecine]. Université de Bamako; 2010.
53. Boré D. Utilisation du test de serodiagnostic de Widal et Felix dans le diagnostic de la fièvre typhoïde au centre de santé de référence de Kati, à propos de 220 cas [Thèse de pharmacie]. Université de Bamako; 2013.
54. Traoré M. Septicémies à salmonelloses non typhiques dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel Touré à propos de 37 cas [Thèse de médecine]. Université de Bamako; 2007.
55. Aibo NI. Evaluation du diagnostic biologique de la fièvre typhoïde au niveau du CHU GT, du CHU du POINT G et de l'INRSP, étude rétrospective sur 1 an (2007-2008) [Thèse de médecine]. Université de Bamako; 2010.
56. Diabaté CFM. Evaluation du rôle de *Salmonella* Typhi et Paratyphi A,B,C dans les infections bactériennes invasives en milieu pédiatrique à partir des liquides biologiques examinés au laboratoire CVD de l'hôpital Gabriel Touré [Thèse de pharmacie]. Université de Bamako; 2006.
57. Kasper MR, Sokhal B, Blair PJ, Wierzbica TF, Putnam SD. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella* enterica serovar Typhi with reduced susceptibility to fluoroquinolones in Cambodia. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 1 févr 2010 [cité 20 févr 2018];66(2):207-9. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889309003654>
58. Morris SK, Richardson SE, Sauve LJ, Ford-Jones EL, Jamieson F. Increasing fluoroquinolone resistance in *Salmonella* typhi in Ontario, 2002-2007. *Am J Trop Med Hyg.* juin 2009;80(6):1012-3.
59. Kumar Y, Sharma A, Mani KR. Re-emergence of susceptibility to conventionally used drugs among strains of *Salmonella* Typhi in central west India. *J Infect Dev Ctries.* 21 mars 2011;5(3):227-30.
60. Kanj SS, Kanafani ZA, Shehab M, Sidani N, Baban T, Baltajian K, et al. Epidemiology, clinical manifestations, and molecular typing of *salmonella* typhi isolated from patients with typhoid fever in Lebanon. *J Epidemiol Glob Health* [Internet]. juin 2015 [cité 12 sept 2017];5(2):159-65. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2210600614000744>
61. Idowu P., Jemiseye O., Agidigbi TS. Multidrug Resistant *Salmonella* enterica Strains in South Western Nigeria: Prevalence and Susceptibility to Ceftriaxone. *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences* [Internet]. mars 2016 [cité 20 févr 2018]; Disponible sur: [https://www.researchgate.net/publication/297663297\\_Multidrug\\_Resistant\\_Salmonella\\_enterica\\_Strains\\_in\\_South\\_Western\\_Nigeria\\_Prevalence\\_and\\_Susceptibility\\_to\\_Ceftriaxone](https://www.researchgate.net/publication/297663297_Multidrug_Resistant_Salmonella_enterica_Strains_in_South_Western_Nigeria_Prevalence_and_Susceptibility_to_Ceftriaxone)
62. Diouara M. Sensibilité des bactéries pathogènes aux antibiotiques dans le district de Bamako en 2006 [Thèse de pharmacie]. Université de Bamako; 2007.
63. Cabrera R, Ruiz J, Marco F, Oliveira I, Arroyo M, Aladueña A, et al. Mechanism of Resistance to Several Antimicrobial Agents in *Salmonella* Clinical Isolates Causing Traveler's Diarrhea. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 10 janv 2004 [cité 12 févr 2018];48(10):3934-9. Disponible sur: <http://aac.asm.org/content/48/10/3934>

64. Levy H, Diallo S, Tennant SM, Livio S, Sow SO, Tapia M, et al. PCR Method To Identify *Salmonella enterica* Serovars Typhi, Paratyphi A, and Paratyphi B among *Salmonella* Isolates from the Blood of Patients with Clinical Enteric Fever. *J Clin Microbiol* [Internet]. mai 2008 [cité 27 juill 2018];46(5):1861-6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2395068/>

## FICHE SIGNALÉTIQUE

**Nom :** MALLE

**Prénom :** Aly

**Adresse :** hardy6.am@gmail.com

**Nationalité :** Malienne

**Titre :** Surveillance de la résistance aux antimicrobiens des souches de *Salmonella* isolées au Laboratoire Rodolphe Mérieux de 2015 à 2017 à Bamako au Mali.

**Année universitaire :** 2016-2017

**Ville de soutenance :** Bamako - Mali

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie de Bamako

**Secteurs d'intérêt :** Bactériologie, Santé publique.

### Résumé

La présente étude avait pour objectif d'évaluer la sensibilité et le profil de résistance aux antimicrobiens des souches de *Salmonella* isolées au Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako (LRM).

L'étude retro prospective, réalisée au LRM, a porté sur les germes isolés des prélèvements susceptibles de contenir des entérobactéries et plus précisément *Salmonella*, de janvier 2015 à décembre 2017.

La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée par la technique de diffusion sur gélose Muller-Hinton et avec les automates Vitek 2 Compact et le Mini Api.

Au cours de la période d'étude, un total de 739 souches de bacilles à gram négatifs ont été isolées de tous les prélèvements reçus au laboratoire de bactériologie du LRM. Les entérobactéries représentaient 93,97% de l'ensemble des germes isolés soit 693 souches. Ces souches provenaient majoritairement d'urines (331), de pus (261) et de selles (43). *Escherichia coli* était l'espèce la plus fréquemment isolée (49,12%), suivie de *Klebsiella* (17,86%) et *Proteus* (7,58%). En plus des espèces couramment rencontrés dans les infections (*Salmonella*, *Morganella*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*), ont été également isolées en très faible proportion des espèces plus rares comme *Raoultella* spp. (6 souches des pus, du liquide d'ascite et des urines), *Pantoea* spp., *Bordetella* spp., *Leclercia* spp. (tous isolées des pus) et *Burkholderia* spp. (1 souche des expectorations). *Salmonella* spp. représentait 7,31% soit 54 souches dont la majorité était issu des prélèvements de selles (37) et d'hémocultures (11). Nos souches ont été particulièrement sensibles aux antibiotiques testés. Ainsi les taux de résistance les plus élevés déterminés ont été aux quinolones était à l'acide nalidixique (31,91%), aux aminosides (tobramycine 20,98%), aux bêta-lactamines (amoxicilline 18,51%) ainsi que 13,20% au co-trimoxazole. Nous avons isolés cinq souches de *Salmonella* multi résistantes aux antibiotiques testés.

L'évolution de la résistance aux antibiotiques augmente graduellement avec le temps.

**Mots clés :** *Salmonella*, Résistance, antibiotiques, Laboratoire Rodolphe Mérieux, Bamako.

## **MATERIAL SAFETY DATA SHEET**

**Name:** MALLE

**First Name:** Aly

**Address:** hardy6.am@gmail.com

**Nationality:** Malian

**Title:** Surveillance of antimicrobial resistance of strains of *Salmonella* isolated at the Rodolphe Mérieux Laboratory from 2015 to 2017 in Bamako, Mali.

**Academic year:** 2016-2017

**City of defense:** Bamako - Mali

**Place of deposit:** Library of the Faculty of Medicine, Pharmacy and Odonto-stomatology of Bamako

**Sectors of interest:** Bacteriology, Public health.

### **Abstract**

The objective of this study was to evaluate the sensitivity and antimicrobial resistance pattern of isolated *Salmonella* strains at the Rodolphe Mérieux Laboratory in Bamako (LRM).

The retro-prospective study, carried out at the LRM, focused on isolated bacteria from samples that may contain enterobacteria and more specifically *Salmonella*, from January 2015 to December 2017.

Antibiotic susceptibility was determined by the Mueller-Hinton agar technique and Vitek 2 Compact and Mini Api.

During the study period, a total of 739 gram-negative bacilli strains were isolated from all specimens received at the LRM bacteriology laboratory. Enterobacteria accounted for 93.97% of all isolated organisms, ie 693 strains. These strains came mainly from urine (331), pus (261) and stool (43). *Escherichia coli* was the most frequently isolated species (49.12%), followed by *Klebsiella* (17.86%) and *Proteus* (7.58%). In addition to the species commonly found in infections (*Salmonella*, *Morganella*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*), a very small proportion of rarer species such as *Raoultella* spp. (6 strains of pus, ascites fluid and urine), *Pantoea* spp., *Bordetella* spp., *Leclercia* spp. (all isolated from pus) and *Burkholderia* spp. (1 sputum strain). *Salmonella* spp. accounted for 7.31% or 54 strains, the majority of which came from stool samples (37) and blood cultures (11). Our strains were particularly sensitive to the antibiotics tested. Thus the highest resistance rates determined were to quinolones were nalidixic acid (31.91%), aminoglycosides (tobramycin 20.98%), beta-lactams (amoxicillin 18.51%) as well as 13, 20% co-trimoxazole. We isolated five strains of multi-resistant *Salmonella* resistant to antibiotics tested.

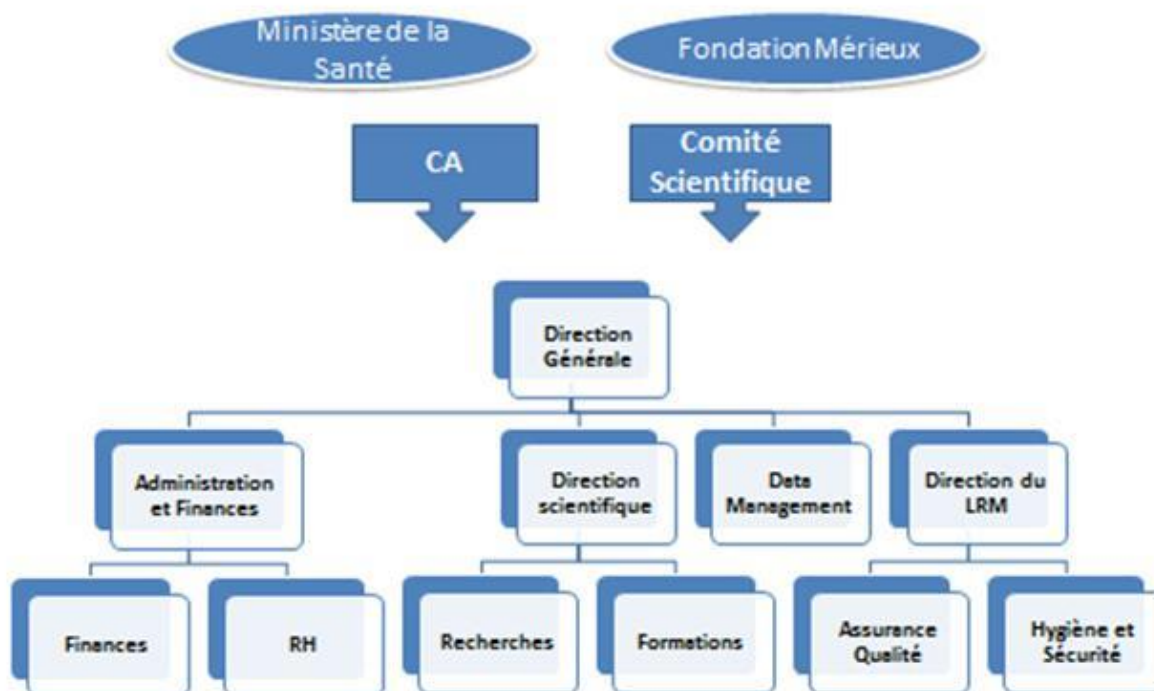
The evolution of antibiotic resistance gradually increases over time.

**Keywords:** Salmonella, Resistance, Antibiotics, Rodolphe Mérieux Laboratory, Bamako.



## ANNEXES

### Annexe 1 : Organigramme du CICM



ORGANIGRAMME DU C.I.CM

## Annexe 2 : MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN DES HEMOCULTURES

|                           |  |                               |     |              |
|---------------------------|--|-------------------------------|-----|--------------|
| Rédigé le:                | 30/06/2011   | Par : Abderrhamane MAIGA      | AMA | Visa :       |
| Vérifié le:               | 30/06/2011   | Par : Judicaël OUEDRAOGO      | JO  | Visa :       |
| Approuvé le:              | 04/07/2011   | Par : Pr Souleymane DIALLO II | SD  | Visa :       |
| Modifié le:               | 21/02/2016   | Par : Judicaël OUEDRAOGO      | JO  | Visa :       |
| Vérifié le :              | 23/02/2017   | Par : Abderrhamane MAIGA      | AMA | Visa :       |
| Approuvé le:              | 10/03/2017   | Par : Dr Madine TALL TOURE    | MTT | Visa :       |
| Mise en application :     | 10/04/2016   |                               |     | Version N° 3 |
| Date de revue :           | 21/02/2018   |                               |     |              |
| Objet de la modification: | Ajout ensemencement gélose au chocolat si Cocci à GRAM positif type Staphylocoque<br>Révision annuelle |                               |     |              |
| Archivé le :              |  |                               |     |              |

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité  
- Dossier commun sur le serveur

Documents Qualité liés:

**MAQ: Manuel Qualité LRM**

**P: Procédure de tri et élimination des déchets biomédicaux Réf. P10 HYG- 002 V1**

**MO: Mode opératoire d'utilisation du BacT/ALERT 3D Réf. M07 ANA BAC- 017 V1**

**Mode opératoire d'utilisation du Vitek 2 Compact Réf. M07 ANA BAC- 019 V1**

**Mode opératoire d'utilisation du mini Api Réf. M07 ANA BAC- 014 V1**

**Mode opératoire du test de l'oxydase Réf. M07 ANA BAC- 009 V2**

**Mode opératoire du test de la coagulase Réf. M07 ANA BAC- 023 V1**

**D:**

**E:**

### **I. Buts**

Décrire les techniques de mise en évidence de la présence ou non des micro-organismes dans le sang dans le cadre de l'étude de la fièvre et des infections chez l'enfant drépanocytaire au Mali.

### **II. Domaines et personnels concernés**

Secteur de Bactériologie du laboratoire Rodolphe Mérieux. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

### **III. Abréviations/Définitions**

### **IV. Références**

### **V. Contenu**

## MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN DES HEMOCULTURES

### 1. Principe

Identifier des micro-organismes pathogènes par ensemencement sur un certain nombre de milieux de culture spécifiques aux germes recherchés.

### 2. Matériel

- Microscope,
- Bec benzène,
- Micropipettes,
- Pipettes pasteur,
- Plaque chauffante,
- Etuve,
- Automates (mini API - VITEK 2 COMPACT),
- Vortex,
- Densitomètre,
- Cassette VITEK 2 COMPACT,
- BacT / ALERT 3D,
- Gants,
- Embouts stériles,
- Lames porte objets,
- Poubelle pour déchets usagés.

### 3. Consommable

- Gants,
- Embouts,
- Lame et lamelle,
- Anse,
- Cartes VITEK 2 COMPACT,
- Disques pour antibiogramme,
- Sachets anaérobies,
- Flacons aérobie et anaérobie, flacon pédiatrique pour le BacT / ALERT 3D.

## **4. Réactif**

- Milieux de culture : gélose chocolat, COS, Chapman, CAN2, CNA etc.
- Colorants de GRAM,
- Solutions de révélation

## **5. Pré analytique**

### **5.1. Condition du prélèvement**

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

### **5.2. Matériels**

- Deux solutions antiseptiques : alcool à 90°C, Bétadine dermique à 30%.
- Coton hydrophile : un coton imbibé d'alcool, un coton imbibé de Bétadine.
- Seringue de 10cc
- Une épicrotine
- Un garrot
- Boîte de récupération des aiguilles usagées
- Poubelles pour déchets biologiques.

Il est important de noter qu'il existe des critères d'inclusion des patients à l'hémoculture. Au centre de développement pour les vaccins du centre hospitalier universitaire Gabriel Touré se sont:

- Température non corrigée supérieure ou égale à 39°Celsius
- Suspicion d'infections bactériennes invasives : méningite, pleurésie, fièvre typhoïde, arthrite septique, péritonite...

Le préleveur s'assure de l'identité du patient (nom, prénom, âge) ; préparer le matériel nécessaire.

- Il pose le garrot, s'assure de l'asepsie en nettoyant le pli du bras à l'aide d'un coton imbibé d'alcool, et enfin un coton imbibé de Bétadine.
- En fonction de l'âge, prélever 1 ml chez le nouveau-né, 2 ml enfant de 1-4 mois, 3 ml enfant de plus de 4 mois.

**NB** : Les flacons d'hémoculture doivent être bien mélangés et immédiatement acheminés au laboratoire après prélèvement. On retrouve au fond de chaque flacon des détecteurs de CO<sub>2</sub>, dont le signal sera synonyme de présence de germes pathogènes dans la culture.

## **6. Analytique**

Enregistrer les flacons dans le registre prévu pour la circonstance se trouvant dans le laboratoire de Microbiologie.

### **6.1. Introduction des flacons dans le BacT/ALERT 3D.**

- A partir de l'écran principal appuyer sur l'icône bleue,
- Scanner le code barre du flacon à l'aide de la douchette située sous l'écran de contrôle, ou le noter à l'aide du clavier se trouvant sous la douchette,
- Introduire dans le tiroir du jour et dans l'alvéole de son choix (la position n'est pas déterminée par l'automate)

- Fermer le tiroir et valider les saisies en appuyant sur V.

**Remarque :** Si la mise en place des flacons est supérieure à 2 minutes, une alarme s'active en colorant l'écran en rouge et en mettant le code erreur 20.

Dans ce cas, fermer le tiroir, toucher l'écran et l'alarme s'arrête. Renouveler la procédure d'introduction depuis le début pour introduire les flacons restants.

## 6.2. Que faire lorsqu'un flacon est déclaré soit positif, soit négatif ?

L'écran devient jaune et un chiffre apparaît sur la colonne notée BC.

### ***Pour sortir le flacon positif du BacT/ALERT 3D***

- Appuyer sur l'icône +
- Un voyant s'allume sur le tiroir où se trouve le flacon positif
- Ouvrir le tiroir, l'alvéole concernée clignote
- Sortir le flacon sans le scanner et refermer le tiroir et valider en appuyant sur V.

### ***Pour sortir le flacon négatif du BacT/ALERT 3D***

- Appuyer sur l'icône –
- Un voyant s'allume sur le ou les tiroirs concernés
- Ouvrir le tiroir et sortir les flacons dont le voyant est vert un à un (à chaque retrait, le voyant vert se met à clignoter)
- Refermer le tiroir et appuyer sur V.

## 6.3. Traitement des flacons

- *Les flacons sortis négatif* ne feront pas l'objet d'étude et le résultat sera saisi « stérile » tout en mentionnant la date de sortie.
- *Les flacons sortis positif*
  - Désinfecter la partie caoutchouc du flacon avec de l'alcool iodé
  - Mélanger voir vortexer le flacon
  - Piquer le bouchon à l'aide d'une aiguille associée à une seringue de 10 ml
  - Si le bouchon du flacon (en particulier pour le flacon anaérobie) est bombé, évoquant la présence de gaz dans le flacon, retirer le piston, laisser le gaz s'échapper via l'aiguille, puis passer à l'ensemencement.
    - *Examen direct et mise en culture*
  - Sur une lame porter le numéro d'identification du patient, recouvrir d'une lamelle une à deux gouttes du bouillon bien mélangé et observer au microscope des éventuels germes mobiles.
  - Après observation retirer la lamelle, laisser sécher sur la paillasse et procéder à la coloration de GRAM et lire aussitôt.

**Cf. Mode opératoire de la coloration de GRAM Réf. M07 ANA BAC- 022 V2**

**N.B.** : La coloration de GRAM permet au Biologiste ou à ses assistants d'informer le site clinique Pneumobama à la pédiatrie du résultat obtenu.

Selon la morphologie lue, ensemercer :

- Si **bacille à GRAM négatif**, ensemercer une goutte du bouillon sur milieu Drigalski et sur une gélose au sang frais (COS) à incuber sous CO<sub>2</sub>,
- Si **cocci à GRAM positif type Staphylocoque**(en grappe de raisin), ensemercer une goutte du bouillon sur milieu Chapman, sur une gélose au sang frais et au chocolat à incuber sous CO<sub>2</sub>,
- Si **cocci à GRAM positif type Streptocoque** (en chaînette), ensemercer une goutte du bouillon sur milieu gélose au sang frais (COS) incubée sous CO<sub>2</sub> ;
- Si présence de **levures** ensemercer un sabouraud ou un CAN2.

*Pour le flacon anaérobie*, quelqu'en soit le GRAM lu ensemercer une gélose au sang frais et incuber en anaérobiose par le biais de sachet ana (genebag)

#### 6.4. Lecture et interprétation

- Bacille à GRAM négatif type entérobactérie oxydase négative, identification galerie API 20 E ou carte Vitek GN suivi de l'antibiogramme,
- Bacille à GRAM négatif type non entérobactérie oxydase positive, identification galerie API 20 NE ou carte Vitek GN suivi de l'antibiogramme **Cf. Mode opératoire du test de l'oxydase Réf. M07 ANA BAC- 009 V2**
- Cocci à GRAM positif type Streptocoque, identification galerie API 32 Streptocoques ou carte Vitek GP tout en ensemençant une gélose au sang cuit à partir de la suspension bactérienne en posant un disque d'optochine **Cf. Mode opératoire du test à l'optochine Réf. M07 ANA BAC- 031 V2**
- Cocci à GRAM positif type Staphylocoque :

Si catalase positive, slidex négatif et mannitol négatif Staphylocoque à coagulase négative à discuter avec le Biologiste ou ses assistants,

Si catalase positive, slidex positif et mannitol positif, identification galerie API Staphylocoques ou carte Vitek suivi de l'antibiogramme. **Cf. Mode opératoire du test de la coagulase Réf. M07 ANA BAC- 023 V1**

- Autre morphologie, à discuter avec le biologiste ou ses assistants.
- Les identifications et les antibiogrammes s'accompagnent toujours d'une pureté sur milieu de culture en fonction du germe.

#### 6.5. Interprétation des antibiogrammes

- Lorsqu'elle est réalisée à partir de disques sur milieu M.H ou sur milieu COS, l'interprétation se fera par mesure des différentes CMI tout en se référant sur la fiche des diverses CMI prévues pour la circonstance.
- Lorsqu'elle est faite par le biais des galeries ATB sur mini API, une relecture à l'œil nu est préconisée après celle de l'appareil afin d'être sûr sur la sensibilité – intermédiaire – résistance donné par l'appareil.

- Si cas d'une **Bêta lactamine à spectre élargie** faire la recherche de BLSE sur milieu MH avec les antibiotiques suivants : AMC au centre, CTX de côté et CZ de côté également permettant d'obtenir un bouchon de champagne.
- Réalisé sur le VITEK 2 COMPACT une éventuelle interprétation devient difficile en ce sens que tout se passe dans la machine et que les cartes ne sont pas faciles à interpréter. L'essentiel est de ne pas confondre le GRAM (positif et négatif).

## 6.6. Validation technique / Critères de repasse

Réservé au Technicien qui apprécie la pureté de ces colonies à travers les galeries API et celles des ATB.

Si un contaminant est observé ré purifier à partir de la pureté pour une bonne identification et antibiogramme.

## 6.7. Résultat

Les résultats sont validés automatiquement par le technicien grâce à une connexion bidirectionnelle. Si cette connexion est dérangée, les résultats peuvent être saisis manuellement sur le système CODAT.

Les résultats de l'étude Pneumobama sont enregistrés dans les documents y afférant.

## 6.8. Hygiène et sécurité

- Avant et après les manipulations, nettoyer la paillasse avec de l'eau de javel
- Toujours manipuler en présence d'une flamme ou sous une hotte.
- Toujours porter des gants, des chaussures fermées si possible un masque de protection
- Eviter de toucher les portails, les appareils et les microscopes avec les gants
- Ne jamais manger ni boire lors des manipulations en laboratoire
- Bien ranger les milieux de culture et les bouillons afin d'éviter les contaminants
- Eviter tout liquide inflammable aux environs de la flamme
- Eviter les bouteilles déposées au bord des paillasses
- Se laver les mains régulièrement à l'eau de robinet et au savon anti-bactéricide.

## 7. Post analytique

### 7.1. Validation Biologique

Réservé au biologiste ou ses assistants

Elle s'effectue en confrontant l'ensemble des résultats avec les éléments cliniques apportés par la discussion avec le médecin prescripteur.

Elle est objectivée par la signature du compte-rendu

### 7.2. Hygiène et sécurité

Lors des manipulations, il faut toujours :

- porter des gants
- Essuyer l'automate avec un papier essuie tout imbibé de javel dilué au 1/10

- Mettre les matériels souillés dans la poubelle réservée aux déchets contaminés
- Nettoyage de la paillasse avec de l'eau de javel à 3° Cl au début et à la fin de la journée.

### **7.3. Gestion des déchets**

Vider à chaque fin de journée les boîtes de pétri utilisées datant de deux jours et les sachets poubelle qui doivent être bien scotchés et déportés à l'arrière du laboratoire dans les grands fûts déposés pour la circonstance.

### **7.4. Archivage**

Les dossiers en fin d'étude doivent être mis dans un carton où est inscrite la période d'utilisation et une fois remplie le transférer au magasin où une étagère est prévue pour les archives.



### Annexe 3 : MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE DU LIQUIDE PLEURAL

|                           |                   |                            |     |              |
|---------------------------|-------------------|----------------------------|-----|--------------|
| Rédigé le:                | 01/08/2013        | Par : Judicaël OUEDRAOGO   | JO  | Visa :       |
| Vérifié le:               | 02/08/2013        | Par : Nana Kadidia KEITA   | NK  | Visa :       |
| Approuvé le:              | 08/03/2016        | Par : Dr Madiné TALL TOURE | MTT | Visa :       |
| Modifié le:               |                   | Par :                      |     | Visa :       |
| Vérifié le :              | 08/03/2017        | Par : Abderrhamane MAIGA   | AMA | Visa :       |
| Approuvé le:              | 08/03/2017        | Par : Dr Madiné TALL TOURE | MTT | Visa :       |
| Mise en application :     | 08/04/2016        |                            |     | Version N° 1 |
| Date de revue :           | 08/03/2018        |                            |     |              |
| Objet de la modification: | Révision annuelle |                            |     |              |
| Archivé le :              |                   |                            |     |              |

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité  
- Dossier commun sur le serveur

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P: Procédure de tri et élimination des déchets biomédicaux Réf. P10 HYG- 002 V1

MO: Mode opératoire d'utilisation du Vitek 2 Compact Réf. M07 ANA BAC- 019 V1

Mode opératoire d'utilisation du mini Api Réf. M07 ANA BAC- 014 V1

D :

E :

#### **I – Buts**

Décrire la technique de la réalisation de l'ECB du liquide pleural.

#### **II - Domaines et personnels concernés**

Secteur de Bactériologie. Les Biologistes et tous les responsables techniques habilités à utiliser cette technique.

#### **III - Abréviations/Définitions**

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

ECB : Examen CytoBactériologique

#### **IV – Références**

Documents du laboratoire

#### **V – Contenu**

## MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE DU LIQUIDE PLEURAL

### **1. But**

La conduite de l'examen cyto bactériologique des liquides des séreuses et l'interprétation des résultats sont dans l'ensemble identiques, quel que soit le liquide considéré. Normalement, ces liquides existent en très faible quantité, ils lubrifient les surfaces des séreuses qui constituent des sites anatomiques fermés, stériles.

A l'état pathologique le volume de ces liquides peut augmenter ; ils deviennent alors des exsudats (origine inflammatoire) ou des transsudats (origine mécanique).

Lorsqu'il s'agit d'exsudats d'origine bactérienne, une ponction faite avec les précautions d'asepsie habituelles doit permettre d'isoler la ou les bactéries responsables, sans risque de contamination exogène. Les prélèvements de ces différents liquides sont pour la plupart effectués en milieu d'hospitalisation.

### **2. Principe**

Le liquide pleural est obtenu par ponction intercostale dans une zone de matité franche après repérage radiologique. L'asepsie doit être rigoureuse. Le liquide est recueilli à l'aide d'une seringue puis transféré :

- Dans un tube stérile (tube sec) en vue de l'étude bactériologique,
- Dans un tube avec un anticoagulant (tube hépariné) en vue de l'examen cyto-chimique

Le prélèvement doit parvenir au laboratoire accompagné de renseignements cliniques et du contact du médecin traitant.

La possibilité de tuberculose pulmonaire, et donc la recherche du Bacille de Koch, doit toujours être envisagé.

### **3. Matériel**

- Micropipettes réglable ;
- Portoir en fer ;
- Plaque chauffante.

### **4. Consommable**

- Gants à usage unique ;
- Lames;
- Embouts ;
- Tubes à hémolyse ;
- Cellule de kovas ;

## 5. Réactif

- Colorant de GRAM ;
- Bouillon (cœur-cerveille) ;
- Milieux de culture (gélose au sang frais COS et au sang cuit Chocolat) ;
- Cartes Viteck 2 Compact ou galerie classique Mini Api.

## 6. Etape pré- analytique

### 6.1. Enregistrement

Informatique CODAT : code LIQ

### 6.2. Prélèvement

Tube hépariné préférentiellement ou tube sec.

## 7. Etape analytique

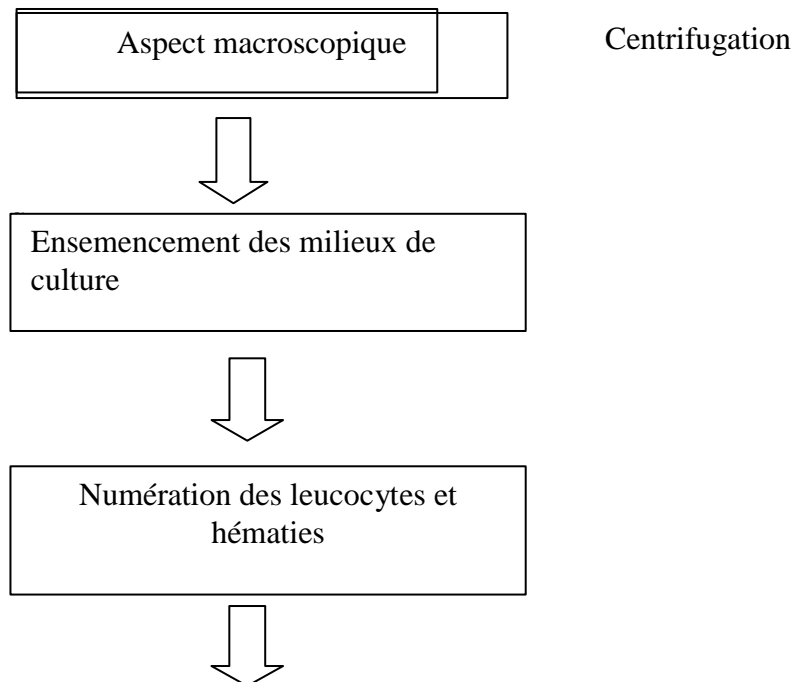
### 7.1. Examen bactériologique

L'analyse bactériologique est toujours faite immédiatement.

L'examen cytologique s'effectue de préférence sur le tube hépariné.

Noter sur la fiche de paillasse des liquides de ponction :

- Identification du laboratoire,
- La nature de la ponction.



Aspect du liquide : clair,  
trouble etc.

Gélose

Cos +

gélose

chocola

t sous

CO<sub>2</sub>. Si

liquide

purulent

gélose

Anaéro

bie.

Si présence de levures à

l'examen direct

Sabouraud +

cloramphénicol.

Après

homogénéisation,

faire la

numération

Sur cellule de

kovas. Si

nécessaire,

diluer dans

De l'eau

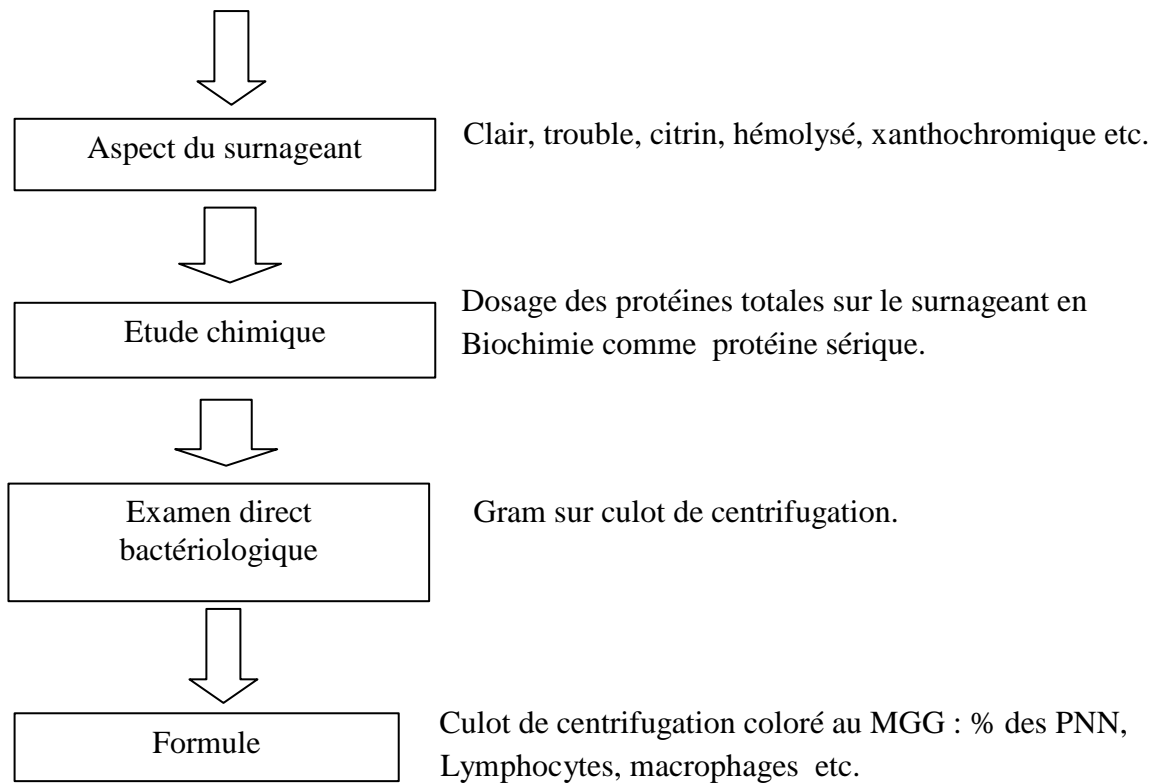
physiologique

.

3500 rpm pendant 5 minutes

Faire deux lames du culot pour

Gram et coloration MG



## 7.2. Incubation

L'incubation s'effectue à 37°C sous CO<sub>2</sub> dans une jarre pour les géloses chocolat et sang frais et en sachet anaérobie une gélose au sang frais pour le cas d'un liquide purulent. Le tout porté à l'étuve.

## 7.3. Lecture

La lecture des milieux est réalisée au bout de 24h puis 48h.

On procède à l'identification de toutes les bactéries. Les germes contenus dans le liquide d'ascite cirrhotique sont les entérobactéries et tout particulièrement *Escherichia coli*, mais aussi *Staphylococcus aureus* et plus rarement *Haemophilus parainfluenzae*, *Moraxella spp*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas spp*, etc .

Dans le cas de la tuberculose, la recherche de *Mycobacterium tuberculosis* dans l'épanchement est plus efficace .

## 7.4. Antibiogramme

On réalise un antibiogramme sur les germes suspects isolés en commun accord avec le Biologiste ou ses Assistants.

**N.B :** Identification + antibiogramme confère mode d'utilisation du Viteck 2 Compact ou du mini Api.

## 7.5. Hygiène et sécurité

- Ne jamais manipuler les échantillons à main nue et en absence de flamme ;
- Porter des gants à usage unique lors des manipulations ;
- Ne pas pipeter à la bouche ;
- Eviter les éclaboussures d'échantillons ou de solution les contenant ;
- Les surfaces souillées seront nettoyées par de l'eau de javel diluée à 10% ;
- Ne pas utiliser de réactifs après la date d'expiration : cas du Viteck ou Mini API
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents ;
- Utiliser un cône de distribution neuf pour chaque échantillon

## 7.6. Validation technique/ Critères de repasse

La validation de l'antibiogramme effectuée par la galerie Mini Api doit être faite par le technicien. Si le milieu est limpide, le germe est non résistant (sensible) à l'antibiotique existant dans ce puit, dans le cas où le milieu est trouble, le germe est résistant à l'antibiotique.

Le technicien doit vérifier que le résultat de l'automate est conforme à celle qu'il observe sur la galerie, dans le cas contraire rectifier les résultats de l'automate.

## 7.7. Résultat

Préalablement noté sur la fiche de paillasse édité, celui-ci doit être saisi dans le système informatique du laboratoire.

Si possible, communiquer le résultat au clinicien en charge du patient. Cependant seul le biologiste est à mesure de téléphoner ou ses assistants.

## 8. Etape post analytique

### 8.1. Validation biologique

Effectuer par le biologiste, consistant à interpréter les résultats du test en tenant compte du contexte clinique et éventuellement des résultats d'autres examens.

## **8.2. Rendu des résultats**

Les résultats sont rendus manuellement par le technicien responsable de l'examen sur le système CODAT.

## **8.3. Gestion des déchets**

Pendant la manipulation tous les objets souillés sont plongés systématiquement dans l'eau de javel à 12° chlorimétrique. Les objets tranchants sont jetés dans une boîte de sécurité et les objets souillés non tranchants dans la poubelle jaune (poubelle contaminée). Tous les déchets seront éliminés après le travail. **Cf. Procédure de tri et élimination des déchets biomédicaux Réf. P10 HYG- 002 V1**

## **8.4. Archivage**

L'enregistrement, les cahiers de paillasse et les registres de laboratoire (serveur électronique) sont conservés au laboratoire.

## Annexe 4 : MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN BACTERIOLOGIQUE DES PUS ET ABCES

|                           |                   |                            |     |              |
|---------------------------|-------------------|----------------------------|-----|--------------|
| Rédigé le:                | 21/02/2013        | Par : Doussou COULIBALY    | DC  | Visa :       |
| Vérifié le:               | 25/03/2013        | Par : Judicaël OUEDRAOGO   | JO  | Visa :       |
| Approuvé le:              | 25/03/2013        | Par : Dr Bréhima TRAORE    | BT  | Visa :       |
| Modifié le:               |                   | Par :                      |     | Visa :       |
| Vérifié le :              | 25/03/2017        | Par : Abderrhamane MAIGA   | AMA | Visa :       |
| Approuvé le:              | 25/03/2017        | Par : Dr Madiné TALL TOURE | MTT | Visa :       |
| Mise en application le :  | 25/04/2016        | Par :                      |     | Version N° 1 |
| Date de revue :           | 25/03/2018        |                            |     |              |
| Objet de la modification: | Révision annuelle |                            |     |              |
| Archivé le :              |                   |                            |     |              |

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité  
- Dossier commun sur le serveur

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P:

Procédure de gestion des déchets

MO: Mode opératoire de la coloration de Gram

Mode opératoire d'utilisation du VITEK 2 COMPACT

Mode opératoire d'utilisation du mini Api

D:

E:

### I – Buts

Décrire le mode de l'examen bactériologique des pus et abcès.

### II - Domaines et personnels concernés

Secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

### III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

ECB : Examen Cytobactériologique

ATB : Antibiogramme

### IV – Références

### V – Cont



# MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN BACTERIOLOGIQUE DES PUS ET ABCES

## 1. Principe

Il s'agit d'identifier des germes pathogènes par ensemencement sur un certain nombre de milieux de culture spécifiques aux germes recherchés.

## 2. Matériel

- Microscope,
- Bec benzène,
- Micropipettes
- Pipettes pasteur,
- Jarre (aérobie et anaérobie),
- Plaque chauffante,
- Etuve,
- Automate (mini Api - VITEK 2 Compact),
- Vortex,
- Densitomètre,
- Cassette VITEK 2 Compact.

## 3. Consommables

- Gants,
- Embouts,
- Lames et lamelles,
- Tubes à hémolyse,
- Oeses,
- Cartes VITEK 2 Compact,
- Disques pour antibiogramme,
- Sachets anaérobies.

## 4. Réactifs

- Milieux de culture,
- Bouillon,
- Colorants de Gram,
- Réactif de la catalase,
- Réactif du test de l'oxydase,
- Réactif du test de coagulase,

- Réactif Urée-Indole-TDA.

## 5. Etape pré analytique

### 5.1. Nature du prélèvement

La nature du prélèvement doit être inscrite en renseignement clinique sur la fiche d'analyse qui accompagne le prélèvement. Le prélèvement doit être collecté soit dans un tube sec, soit par écouvillonnage et acheminé immédiatement au laboratoire, à défaut le conserver au frais pour le lendemain

### 5.2. Localisation

- Editer fiche de paillasse sur le Syslam (Système Informatique de Gestion du Laboratoire) en tapant **66** après avoir saisi le nom et le mot de passe de l'utilisateur qui est individuel.

- Choisir une **imprimante** (2 ou 4) au niveau de la réception, puis **lancement** et terminer par **sortir**.

Sur la fiche récupérée, notifier le type de prélèvement dans la liste **DA** à savoir :

|               |                |               |           |           |
|---------------|----------------|---------------|-----------|-----------|
| cutané        | oreille droite | narine droite | plaie     | cathéter  |
| lait maternel | oreille gauche | narine gauche | ulcère    | escarre   |
| squames       | œil droit      | lingual       | péri anal | sécrétion |
| ongle         | œil gauche     | gingival      | gland     |           |
| nasal         | buccal         | gorge         | pus       |           |

-Préciser si le prélèvement est soit effectué au laboratoire, soit transmis ou soit apporté dans la liste **DC**.

Les listes **DE, DG, DI, DJA, DJB** sont à ignorer.

## 6. Etape analytique

### 6.1. Protocole de l'analyse

#### 6.1.1. Préparation de la suspension

- Porter les milieux de culture (Gélose au sang – Drygalski – Chapman- Sabouraud – Mueller Hinton) à l'étuve pour séchage cinq (05) minutes environ,
- Préparer si possible une suspension à l'aide de Api Medium (si prélèvement par écouvillonnage),
- Identifier un tube à hémolyse contenant un bouillon de cœur-cervelle et y ajouter deux à trois gouttes de la suspension réalisée si la plaie est profonde,
- Si le prélèvement est dans un tube utiliser directement le prélèvement.

#### 6.1.2. Examen direct

- Sur une lame, réaliser un étalement du prélèvement
- Sécher la lame sur la plaque chauffante préalablement régler à 50 °C,
- Passer à la coloration Gram **Cf. Mode opératoire de la coloration de Gram. Réf**
- Passer à la coloration Gram **Cf. Mode opératoire de la coloration de Gram. Réf. M07 ANA BAC- 021 V1**

**N.B.:** Attention ne pas dépasser cette température au risque de déformer les germes.

### 6.1.3. Culture

- Les différents milieux de culture sont ensemencés en fonction du Gram lu :
  - Gélose au sang (COS), incubée à 37°C sous CO<sub>2</sub>,
  - Gélose chocolat, incubée à 37°C sous CO<sub>2</sub>,
  - Gélose au sang, incubée à 37°C en anaérobiose,
  - Drygalski, incubé en aérobiose (si bacilles au Gram négatif),
  - Chapman, incubé en aérobiose,
  - Sabouraud, incubé en aérobiose (en fonction du prélèvement),
  - CAN 2, incubé en aérobiose,
  - Mueller Hinton, incubé en aérobiose,
  - Bouillon cœur cervelle.
- Porter le tout à l'étuve pendant 24 heures.

**NB :** si les germes ne poussent pas sur les différents milieux de culture cités ci-dessus avec un nombre élevé de leucocytes, penser à la recherche de BAAR.

### 6.1.4. Lecture et interprétation

- Identifier et faire les antibiogrammes sur les colonies suspectes
- Si la culture est stérile après 24 heures d'incubation, ré-incuber les géloses au sang sous CO<sub>2</sub> pendant 48 heures,

En présence d'un **Bacille Gram négatif** :

- Lactose positive, faire l'identification et l'antibiogramme

- Lactose négative, faire le test à l'oxydase puis réaliser simultanément une identification et un antibiogramme en fonction du résultat du test,

- En présence d'un **Cocci Gram positif**, catalase négative type Streptocoque, faire le Slidex Strepto-plus et étudier en fonction du contexte clinique (par exemple : la détermination du Streptococcus pneumo par le test d'optochine, Cf. mode opératoire du test à l'optochine),
- En présence d'un **Cocci Gram positif**, catalase positive, mannitol positif, faire la coagulase puis passer à l'antibiogramme en cas de positivité,
- Si la coagulase est négative discuter avec le biologiste ou ses assistants et étudier toujours en fonction du contexte clinique,
- En **présence des levures**, identifier et faire l'antifongogramme,
- Pour d'autres morphologies, discuter avec le biologiste ou ses assistants.

Les identifications et les antibiogrammes s'accompagnent toujours d'une pureté sur milieu de culture : Pour d'éventuel cas de souchage (Bacilles Multi résistants, Staphylocoques Méthicyline résistants et Vancomycine résistants...).

### **6.1.5. Interprétation des antibiogrammes**

- Lorsqu'elle est réalisée à partir des disques sur milieu Muller Hinton ou sur milieu COS, l'interprétation se fera par mesure des différentes CMI tout en se référant sur les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (Edition de Janvier 2007).
- Lorsqu'elle est faite par le biais des galeries ATB sur mini API, une relecture à l'œil nu est préconisée après celle de l'appareil afin d'être sûr des résultats donnés par l'appareil.
- Si l'antibiogramme est réalisé sur le VITEK 2 Compact, un système d'expertise incorporé à la base de données permet une interprétation plus détaillée des types de résistances. Devant une suspicion de présence d'une Bêta lactamase à spectre élargie (BLSE) faire la recherche sur milieu MH avec les antibiotiques suivants : AMC au centre, CTX de côté et CZ de côté également permettant d'obtenir un bouchon de champagne.

### **6.2. Validation technique/ Critères de repasse**

Ceux-ci sont réservés au technicien qui apprécie la pureté des colonies à travers les galeries API et celles des ATB. Si un contaminant est observé, purifier de nouveau à partir de la pureté pour une bonne identification et un bon antibiogramme.

### **6.3. Hygiène et sécurité**

- Avant et après les manipulations, nettoyer la paillasse avec de l'eau de javel à 10 %
- Toujours manipuler en présence d'une flamme
- Toujours porter des gants, des chaussures fermées si possible un masque de protection
- Eviter de toucher les portails, les appareils et les microscopes avec les gants
- Ne jamais manger ni boire lors des manipulations en laboratoire
- Bien ranger les milieux de culture et les bouillons afin d'éviter les contaminations
- Eviter tout liquide inflammable aux environs de la flamme
- Eviter de déposer les bouteilles au bord des paillasses
- Se laver les mains régulièrement à l'eau de javel et au savon anti-bactéricide.

## **7. Etape post analytique**

### **7.1. Validation biologique**

Réservé au biologiste ou ses assistants. Elle s'effectue en confrontant l'ensemble des résultats avec les éléments cliniques apportés par la discussion avec le médecin prescripteur. Elle est objectivée par la signature du compte-rendu.

### **7.2. Rendu des résultats**

Préalablement noté sur la fiche de paillasse éditée sur le système informatique CODAT, saisir les résultats. Si possible téléphoner le résultat au clinicien en charge du patient. Cependant seul le biologiste ou ses assistants sont à mesure de téléphoner.

### **7.3. Gestion des déchets**

Vider à chaque fin de journée les boites de pétri utilisées datant de deux jours et les sachets poubelle qui doivent être bien scotchées et déportées à l'arrière du laboratoire dans les grands fûts déposés pour la circonstance. **Cf. Procédure de tri et élimination des déchets biomédicaux. Réf. P10 HYG- 002 V1**

### **7.4. Archivage des données**

Les dossiers en fin d'étude doivent être mis dans un carton où est inscrite la période d'utilisation et une fois remplie le transférer au magasin où une étagère est prévue pour les archives. Le système informatique du laboratoire archive aussi tous les dossiers des patients.

|                           |                   |                            |     |              |
|---------------------------|-------------------|----------------------------|-----|--------------|
| Rédigé le:                | 16/02/2005        | Par : AlHadji SIDIBE       | AS  | Visa :       |
| Vérifié le:               | 03/03/2005        | Par : Louis DEWEERDT       | LD  | Visa :       |
| Approuvé le:              | 04/03/2005        | Par : Fatou Traoré FAYE    | FTF | Visa :       |
| Modifié le:               | 22/02/2016        | Par : Judicaël OUEDRAOGO   | JO  | Visa :       |
| Vérifié le :              | 25/02/2017        | Par : Issa SOUMARE         | IS  | Visa :       |
| Approuvé le:              | 25/02/2017        | Par : Dr Madiné TALL TOURE | MTT | Visa :       |
| Mise en application :     | 25/03/2016        |                            |     | Version N° 3 |
| Date de revue :           | 25/02/2018        |                            |     |              |
| Objet de la modification: | Révision annuelle |                            |     |              |
| Archivé le :              |                   |                            |     |              |

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité  
- Classeur de Bactériologie

Documents Qualité liés:

**MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako**

**P: Procédure de tri et élimination des déchets biomédicaux Réf. P10 HYG- 002 V1**

**MO: Mode opératoire de la technique de coloration de Gram Réf. M07 ANA BAC- 022 V2**

**Mode opératoire du prélèvement des selles Réf. M07 ANA BAC- 027 V1**

**Mode opératoire d'utilisation du Vitek 2 Compact Réf. M07 ANA BAC- 019 V1**

**Mode opératoire d'utilisation du mini Api Réf. M07 ANA BAC- 014 V1**

**D:**

**E:**

### **I – Buts**

Décrire le mode de l'examen bactériologique des selles.

### **II - Domaines et personnels concernés**

Secteur de bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utilisé cette technique.

### **III - Abréviations/Définitions**

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

### **IV – Références**

### **V – Contenu**

# MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN BACTERIOLOGIQUE DES SELLES

## 1. Principe

L'examen bactériologique des selles, ou coproculture, est un examen des matières fécales.

L'ensemencement d'un milieu de culture avec des fragments de matières fécales permet de rechercher et d'identifier des bactéries pathogènes. Celles-ci sont susceptibles d'entraîner des diarrhées et infections digestives.

Il permet donc de :

- Rechercher les bactéries responsables d'une diarrhée infectieuses (*Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Campylobacter spp*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*...);
- Rechercher d'éventuelles bactéries résistantes chez un patient asymptomatique ;
- Réaliser un bilan suite à une intoxication alimentaire ;
- Détecter éventuellement une parasitose intestinale.

## 2. Matériel

- Microscope ;
- Micropipettes ;
- Bec bunsen ;
- Etuve ;
- Autoclave ;
- Automate (Vitek2 Compact, Mini Api) ;
- Cassette Vitek2 Compact ;
- Vortex ;
- Plaque chauffante ;
- Portoir tubes ;

## 3. Consommable

- Oese plastique (10 µl) ;
- Embouts ;
- Lame et lamelles ;
- Tube conique (10 à 50ml) ;
- Cartes Vitek2 ;
- Pissettes ;
- Pot stérile ;
- Tube sec ;

## 4. Réactif

- Milieux de culture : Hektoen, EMB, Mac Conkey, CIN (Cefsulodine, Irgasan, Novobiocine qui inhibent les BGN sauf Yersinia et inhibent aussi les CGP), Karmali milieu spécifique pour le Campylobacter et EPA plus TCBS pour les Vibrio ;
- Bouillon rappaport ;
- Bouillon sélénite ;
- Colorants de gram : Violet de Gentiane, Lugol, Alcool-Acétone, Fuchsine.

## **5. Etape pré analytique**

### **5.1. Nature du prélèvement**

Les selles doivent être fraîchement émises puis acheminer rapidement au laboratoire (< à 2heures), s'il s'agit d'un nouveau né ou d'un petit enfant l'écouvillonnage rectal est recommandé.

### **5.2. Enregistrement**

- Vérifier la conformité de l'échantillon (nom, prénom, âge, sexe, nature...),
- Etiqueter le prélèvement,
- Enregistrer le prélèvement dans le serveur électronique et dans le cahier de paillasse.

### **5.3. Prétraitement et conservation de l'échantillon**

Sortir les milieux du frigo et les placer à l'étuve pour les ramener à une température de 37°C. Les échantillons reçus seront traités immédiatement à défaut les mettre dans le frigo à +4°C.

## **6. Analytique**

### **6.1. Contrôle de qualité**

La vérification de la date de préparation des milieux, ainsi que la coloration du milieu avant l'ensemencement et vérifier une contamination du milieu avant ensemencement.

### **6.2. Protocole de l'analyse**

- Examen macroscopique

Noter la couleur (verdâtre, noirâtre, jaunâtre), la consistance (molle, dure, liquide), présence d'éléments rajoutés (parasites : adulte d'Ascaris, femelle d'oxyure, anneau ou chaîne de tœnia, glaire (mucus), sang).

- Examen microscopique des selles

Il est réalisé à l'aide d'un microscope et permet de rechercher les œufs et larves d'helminthes, les formes végétatives et kystiques des protozoaires. Il signale aussi la présence de leucocytes, d'hématies, d'éléments fongiques, de cristaux et de résidus alimentaires dans la selle.

L'examen microscopique comporte un examen direct à l'eau physiologique et un examen direct au lugol.

- Examen direct à l'eau physiologique et au lugol

Dans un tube conique contenant l'eau physiologique :

- Ajouter à l'aide d'une pissette une parcelle de selles ;
  - Mélanger jusqu'à obtenir une suspension homogène ;
  - Numéroté la lame ;
  - Déposer séparément une goutte de la suspension sur deux lames différentes;



- Mettre une goutte de lugol sur l'une des lames ;
- Recouvrir chaque goutte avec une lamelle ;
- Lire au microscope à l'objectif X10 puis à X40.

- Coloration de Gram

A partir de la suspension de selles :

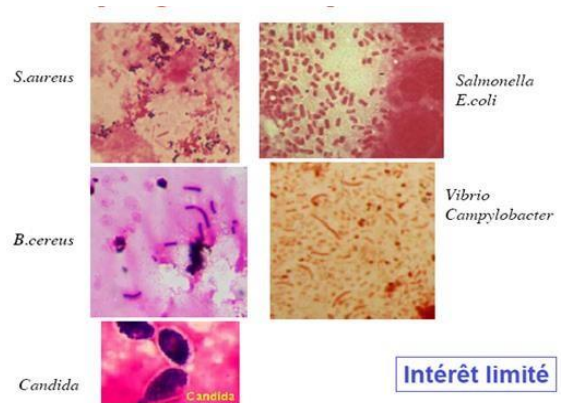
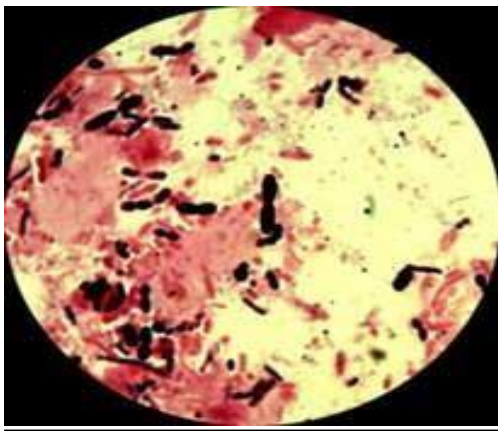
- Etaler une goutte sur la lame,
- Déposer sur la plaque chauffante,

○ Faire la coloration de gram **Cf. Mode opératoire de la technique de coloration de Gram.**

**Réf. M07 ANA BAC- 022 V2**

La coloration de Gram (mise au point par Christian Gram) est une coloration de base en bactériologie. C'est une "coloration double", qui permet de différencier les bactéries:

- D'après leur forme ;
- D'après leur affinité pour les colorants.



**Figure1:** l'examen microscopique des selles à l'huile d'immersion

**Figure2:** Germes pathogènes dans les selles vues au microscope à l'huile d'immersion

- Culture

Ensemencement des selles sur milieux gélosés et liquide

- Milieux d'isolement

- Allumer la flamme ;
- Identifier le milieu hektoen ;
- Porter le numéro de l'échantillon sur le milieu ;
- Retourner le couvercle au-dessus ;
- prendre le tube conique contenant la suspension de selles déjà préparée et vortexer ;
- Déboucher le tube conique ;
- Prélever une goutte de la suspension à l'aide de la pissette ;
- Déposer la goutte sur la gélose

- A l'aide de l'oese stérile faire des stries très serrées sur un tiers de la boîte ;
- Faire faire un quart de tour de la boîte dans le sens des aiguilles d'une montre ;
- Refaire les stries sur un tiers de la boîte ;
- Faire un quart de tour de la boîte ;
- Faire des stries sur un tiers et une petite signature sur la partie restante ;
- Fermer la boîte ;
- Mettre à l'étuve à 37°C pendant 24h.

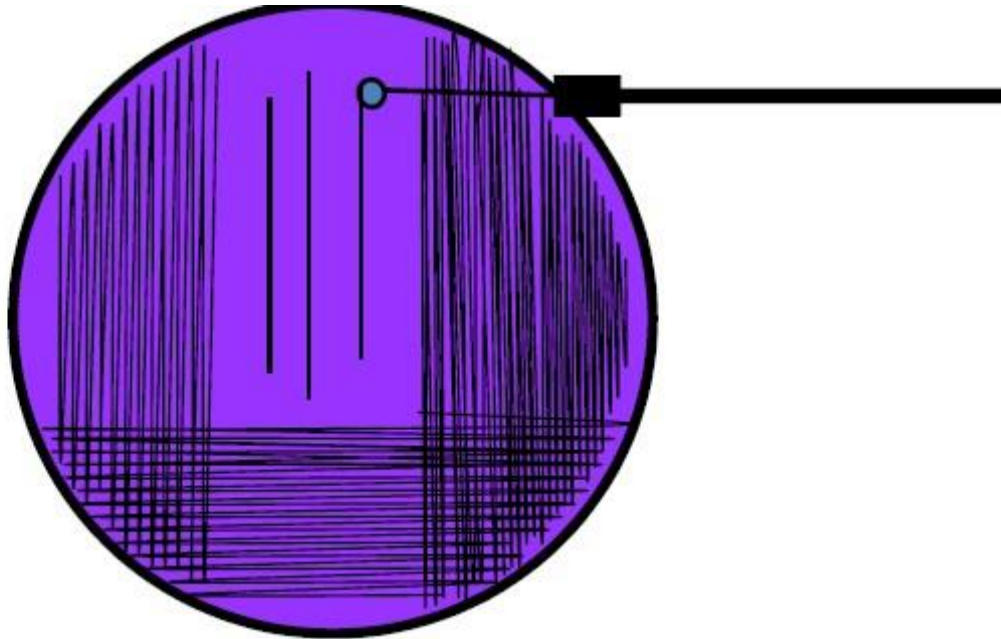
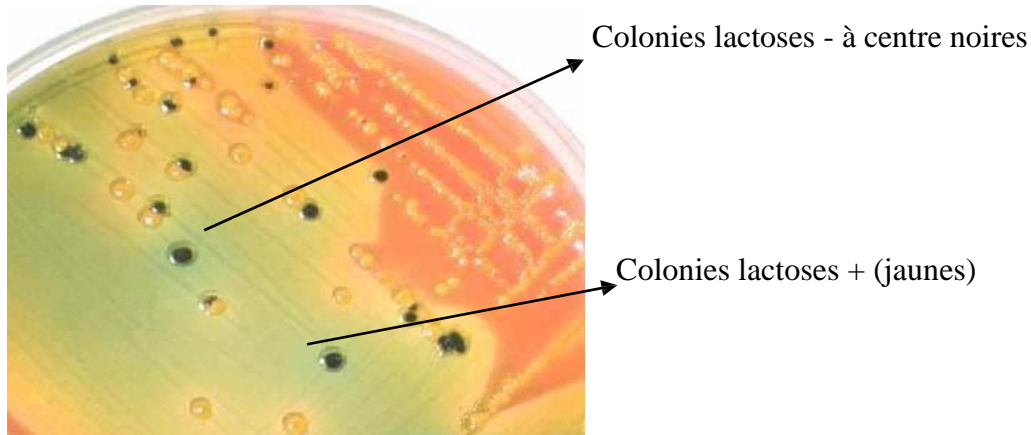


Figure 3 : Technique d'ensemencement d'une selle à l'aide d'oese

Si enfant de moins de 2ans :

- Ensemencer un milieu EMB ou Uri select ;
- Faire une recherche de Rota virus en utilisant les tests ROTA STRIP et en suivant le mode opératoire proposé Par le fabricant du réactif.
- Milieux d'enrichissement :
  - Prendre le flacon contenant le bouillon rapport ;
  - Déboucher le flacon ;
  - Flamber rapidement l'orifice du flacon ;
  - Transvaser le bouillon dans un tube sec numéroté jusqu'à sa moitié ;
  - Renflammer le flacon et fermer ;
  - A l'aide d'une pissette mettre quelques gouttes de la suspension dans le tube contenant le bouillon ;
  - Fermer le tube et agiter légèrement ;
  - Mettre le tube à l'étuve à 37°C pendant 24h.
- Lecture des milieux :
  - Première lecture à 24h : 2<sup>ème</sup> jour
    - Ensemencer une goutte du bouillon rapport du 1<sup>er</sup> jour sur un milieu Hektoen=H2.
- Lecture des colonies sur milieu hektoen1=H1 :
  - Rechercher les colonies :
    - Lactose négatif (verte) et **H2S négatif** suspecte Salmonelle ou Shigelle,
    - Lactose négatif et **H2S positif** (centre noir) suspecte *Salmonella*,

- Lactose positive (les colonies ont l'aspect jaunâtre), flore digestive normale.



**Figure 4 :** Aspect de colonies sur Hektoen après 24 heures d'incubation dans l'étuve

- Ensemencement des colonies lactoses négatives dans urée-indole
  - Prendre avec l'oese de 3 à 5 colonies dissemblables et procéder ainsi :
  - Repiquer 3 à 5 colonies lactose -, H<sub>2</sub>S<sup>+</sup> ou H<sub>2</sub>S<sup>-</sup>, oxydase-, chacune dans 2 gouttes de milieu urée-indole ;
  - Incuber 4h à 37°C.

Uréase positif : Jeter le tube, ni Salmonelle, ni Shigelle

Uréase négatif : Ensemencer un milieu Hajna et un milieu Uriselect 4 (pour les enfants de moins de 2ans).

Milieu uriselect 4 ensemencé pour la recherche d'*E. Coli* entéropathogène

- Rechercher les colonies roses :
  - Faire l'urée-indole pour la confirmation cf. mode opératoire Urée-Indole
  - Faire un antibiogramme cf. mode opératoire de la réalisation de l'antibiogramme
  - 3<sup>ème</sup> jour : Lecture des milieux ensemencés la veille :
- Lecture du milieu Hajna (jaune= positif, rouge= négatif) (lactose : pente du tube, glucose : culot)

**Si lactose positif :** Eliminer

**Si lactose négatif :** Forte suspicion de Salmonelle ou Shigelle (si H<sub>2</sub>S<sup>+</sup> ou H<sub>2</sub>S<sup>-</sup>)

Faire le plus tôt possible le matin une identification sur API20E ou une carte GNB vitek2 ;

S'il s'agit d'une Salmonelle ou d'une Shigelle faire un antibiogramme (ATB G- ou carte AST-N vitek2).

- Le milieu Hecktoen2 : H2

Même procédé que la lecture du milieu Hektoen 1 (H1).

- 4<sup>ème</sup> jour : Lecture des milieux ensemencés la veille

- Lecture du milieu Hajna (jaune= positif, rouge= négatif)

**(Lactose : pente du tube, glucose : culot)**

**Si lactose + :** Eliminer

**Si lactose- :** Forte suspicion de Salmonelle ou Shigelle (si H<sub>2</sub>S<sup>+</sup> ou H<sub>2</sub>S<sup>-</sup>)

Ensemencer le plus tôt possible le matin sur API20E ou une carte d'identification GNB vitek2

S'il s'agit d'une Salmonelle ou d'une Shigelle faire un antibiogramme (ATB G- ou carte AST vitek2).

- Mise en culture d'autres germes responsables des diarrhées infectieuses
  - *Campylobacter spp*

Milieu utilisé : Karmali

L'incubation se fait à 37°C pendant 24h

Faire la lecture à 24h puis identifier et monter l'antibiogramme sur mini Api ou Vitek2.



**Figure 5:** *Campylobacter* sur Karmali

- *Yersinia enterocolitica*

Milieu spécifique et peu sélectif : CIN (Cefsulodine, Irgasan, Novobiocine qui inhibe les entérobactéries sauf les *Yersinia* et inhibe aussi les CGP)

L'incubation se fait à 30°C pendant 24h à 48h

Faire la lecture à 24h puis identifier et monter l'antibiogramme soit sur mini Api ou soit sur le Vitek2.



**Figure 6:** *Yersinia enterocolitica* sur CIN

### 6.3. Résultat

Préalablement noté sur la fiche de paillasse édité, celui-ci doit être saisi dans le système informatique du laboratoire.

Si possible, communiquer le résultat au clinicien en charge du patient. Cependant seul le biologiste est à mesure de téléphoner ou ses assistants.

### 6.4. Validation technique/ Critères de repasse

Ceux-ci sont réservés au Technicien qui apprécie la pureté des colonies à travers les galeries API et celles des ATB. Si un contaminant est observé, purifier de nouveau à partir de la pureté pour une bonne identification et un bon antibiogramme.

## **7. Post analytique**

### **7.1. Validation biologique**

Elle est faite par le biologiste après s'être rassuré que l'analyse a été faite selon le protocole et en comparaison avec les informations dont il dispose. Il pourra éventuellement demander une reprise pour les résultats douteux.

### **7.2. Rendu des résultats**

Après la validation biologique les résultats sont enregistrés par le technicien ou la secrétaire dans le registre de la section bactériologie/parasitologie et rendu sous pli fermé au médecin ou au malade.

### **7.3. Conservation des échantillons**

Les souches peuvent être conservées dans les bouillons glycélinés et garder à -80°C.

### **7.4. Gestion des déchets**

Pendant la manipulation tous les objets souillés sont plongés systématiquement dans l'eau de javel à 12° chlorimétrique. Les objets tranchants sont jetés dans une boîte de sécurité et les objets souillés non tranchants dans la poubelle jaune (poubelle contaminée). Tous les déchets seront éliminés après le travail.

### **7.5. Archivage des données**

L'enregistrement, les cahiers de paillasse et les registres de laboratoire (serveur électronique) sont conservés au laboratoire.

## **8. Hygiène et sécurité**

Avant et après les manipulations :

- Nettoyer la paillasse avec de l'eau de Javel à 10% ;
- Manipuler en présence d'une flamme ;
- Porter des gants, des chaussures fermées et si possible un masque de protection ;
- Eviter de toucher les portails, les appareils et les microscopes avec les gants ;
- Ne jamais manger ni boire lors des manipulations dans le laboratoire.

## Annexe 6 : MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE DES URINES

|                           |            |                            |     |              |
|---------------------------|------------|----------------------------|-----|--------------|
| Rédigé le:                | 21/02/2005 | Par : AlHadji SIDIBE       | AS  | Visa :       |
| Vérifié le:               | 22/02/2005 | Par : Louis DEWEERDT       | LD  | Visa :       |
| Approuvé le:              | 23/02/2005 | Par : Fatou Faye TRAORE    | FFT | Visa :       |
| Modifié le:               | 21/02/2013 | Par : Tony ZITTI           | LD  | Visa :       |
| Vérifié le :              | 25/03/2017 | Par : Abderrhamane MAIGA   | AMA | Visa :       |
| Approuvé le:              | 25/03/2017 | Par : Dr Madiné TALL TOURE | MTT | Visa :       |
| Mise en application le :  | 25/04/2016 | Par :                      |     | Version N° 4 |
| Date de revue :           | 25/03/2018 |                            |     |              |
| Objet de la modification: |            |                            |     |              |
| Archivé le :              |            |                            |     |              |

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité  
- Dossier commun sur le serveur

Documents Qualité liés:

**MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako**

**P: Procédure de tri et élimination des déchets biomédicaux Réf. P10 HYG- 002 V1**

**MO: Mode opératoire du prélèvement cyto bactériologique des urines Réf. M07 ANA BAC-029**

**Mode opératoire d'utilisation du Vitek 2 Compact Réf. M07 ANA BAC- 019 V1**

**Mode opératoire d'utilisation du mini Api Réf. M07 ANA BAC- 014 V1**

**Mode opératoire du test de l'oxydase Réf. M07 ANA BAC- 009 V2**

**Mode opératoire du test de la coagulase Réf. M07 ANA BAC- 023 V1**

**Mode opératoire de la technique de souchothèque Réf. M07 ANA BAC- 025 V2**

**Mode opératoire de la technique de coloration de Gram Réf. M07 ANA BAC- 022 V2**

**Mode opératoire d'utilisation de la cellule Kova Réf. M07 ANA BAC- 001 V1**

**Mode opératoire d'utilisation du microscope Réf. M04 MAT**

D :

E :

### **I – Buts**

Décrire le mode de l'examen cyto bactériologique des urines.

### **II - Domaines et personnels concernés**

Secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

### **III - Abréviations/Définitions**

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

ECBU : Examen Cyto bactériologique des Urines

BK : Bacille de Koch

E. coli : Escherichia coli

Na Cl : Chlorure de potassium

ATB : Antibiogramme

### **IV – Références**

### **V – Contenu**

# MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE DES URINES

## 1. Principe

L'examen cyto bactériologique des urines permet de rechercher une infection urinaire et d'identifier le(s) microorganisme(s) en cause.

## 2. Matériel

- Bocal (aérobie et anaérobie) ;
- Automate (mini API - VITEK 2 Compact) ;
- Densitomètre ;
- Vortex ;
- Cassette VITEK 2.

## 3. Consommables

- Oese ;
- Cartes VITEK 2 Compact ;
- Cellule de numération (Kova® slide) ;
- Bandelette (3 paramètres) ;
- Tube conique (10 à 20 ml) ;
- Tube sec.

## 4. Milieu de culture

- Gélose URI SELECT4

## 5. Etape pré analytique

### 5.1. Nature du prélèvement

Le prélèvement urinaire doit être collecté dans **un flacon stérile**, et acheminé immédiatement au laboratoire pour traitement.

Le recueil des urines est une étape essentielle qui conditionne pour une grande part la qualité et l'interprétation de l'examen **Cf. Mode opératoire du prélèvement cyto bactériologique des urines.**

Réf. M07 ANA BAC- 029 V2

## 6. Analytique

Récupérer la fiche de paillasse destinée à L'ECBU contenant, toutes les informations concernant le patient (en faisant le numéro 66 sur le CODAT informatique) puis procéder aux différentes étapes qui suivent.

### 6.1. Examen macroscopique

Elle consiste à noter l'aspect et la couleur des urines. Une urine normale est de couleur jaune et d'aspect limpide.

**Aspect :** limpide, légèrement trouble, trouble, hémorragique,

**Couleur** : jaune, jaune pâle, jaune dore, jaune foncé, jaune claire, ambrée.

## 6.2. Mise en culture

Ensemencer systématiquement pour éviter toute contamination des urines :

- Homogénéiser le prélèvement par agitation ;
- Porter le numéro d'identification du patient sur la gélose Uri select 4 devant recevoir l'ensemencement ;
- Ensemencer sur une gélose Uri select 4 qui permet la numération et l'identification des principaux germes urinaires ;
- L'ensemencement proprement dit est réalisé à l'aide d'une oese stérile calibrée à 10 $\mu$ l :
  - Immerger l'oese dans l'urine en la tenant verticalement ;
  - Décharger le contenu de cette oese en appuyant la boucle sur le haut de la gélose Uri select 4 ;
  - Tirer de ce point une verticale jusqu'au 1/3 de la boîte;
  - Sans recharger l'oese, faire des stries perpendiculaires serrées en partant du point de dépôt jusqu'à la fin ;
  - Si la technique est correctement réalisée et si le dépôt n'est pas trop important, après incubation, la boîte doit présenter des colonies isolées.
- Mettre la gélose **Uri select 4** dans un bocal (aérobie) et laisser incuber à 37°C pendant 24h.

## 6.3. L'examen microscopique

- Comptage des éléments

Après agitation délicate (pour avoir des urines homogènes), mettre 10 $\mu$ l d'urine dans la cellule de Kova, laisser reposer quelques minutes et lire au microscope à l'objectif x10 et x40 puis noter les différents éléments rencontrés dans les urines à savoir : les leucocytes, les hématies, les cellules épithéliales, les cristaux, les cylindres, les œufs de Schistosomes, le Trichomonas ...

- Les images de quelques éléments rencontrés dans les urines :



※ Les cylindres hyalins correspondent à une accumulation physiologique des protéines d'origine tubulaire qui se moulent dans les lumières tubulaires. Ces cylindres, qui ne contiennent aucune inclusion, ne sont pas pathologiques.

※ Tous les autres cylindres sont pathologiques et témoignent d'une atteinte rénale (granuleux, leucocytaires, hématiques ...).

### CYLINDRES À L'EXAMEN DIRECT

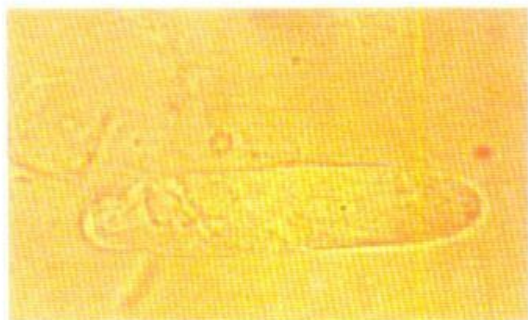


Fig. 11. - Hyalin.



Fig. 12. - Cireux.

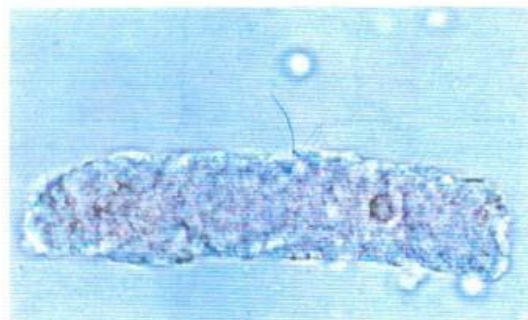


Fig. 13. - Granuleux.

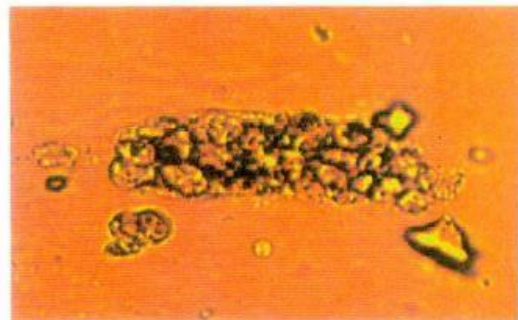


Fig. 14. - Leucocytaire.

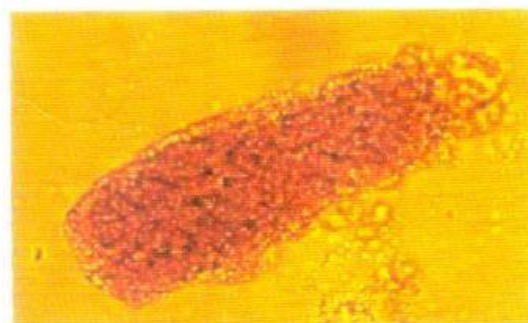


Fig. 15. - Hémoglobinique.

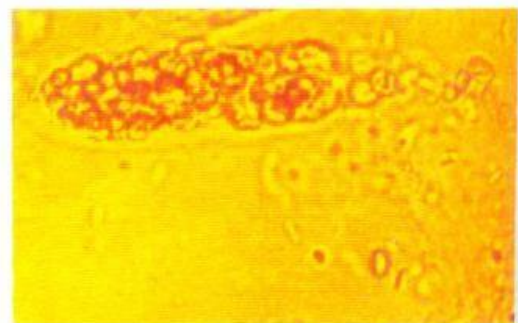


Fig. 16. - Hématique.

## CRISTAUX À L'EXAMEN DIRECT

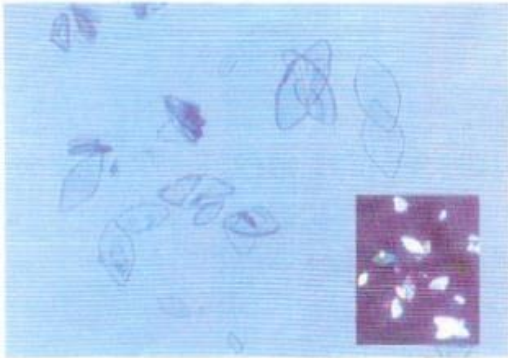


Fig. 1. - Acide urique (direct + lumière polarisée).

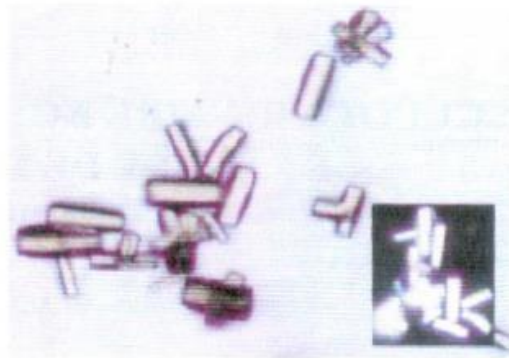


Fig. 2. - Acide urique (direct + lumière polarisée).



Fig. 3. - Urate.



Fig. 4. - Phosphate amorphe.



Fig. 5. - Oxalate de calcium.

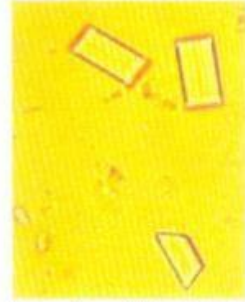


Fig. 6. - Phosphate ammoniaco-magnésien.

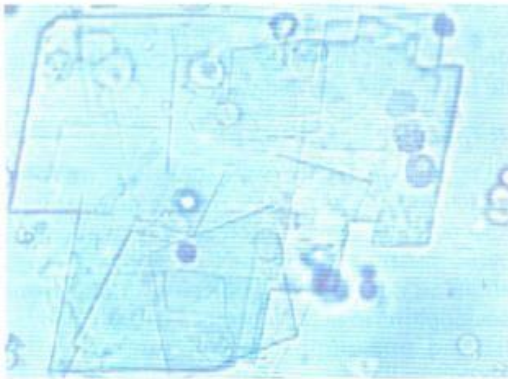


Fig. 7. - Cholestérol.

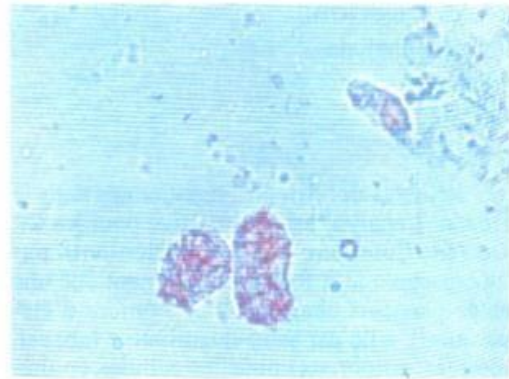


Fig. 8. - Bilirubine.

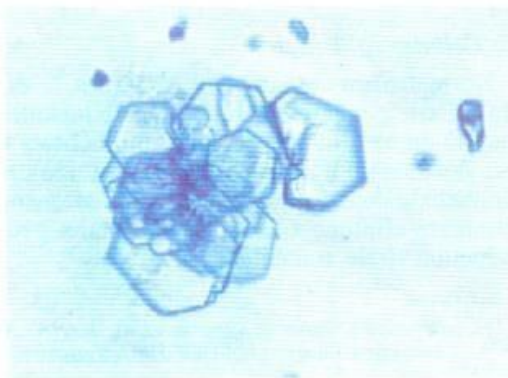


Fig. 9. - Cystine.

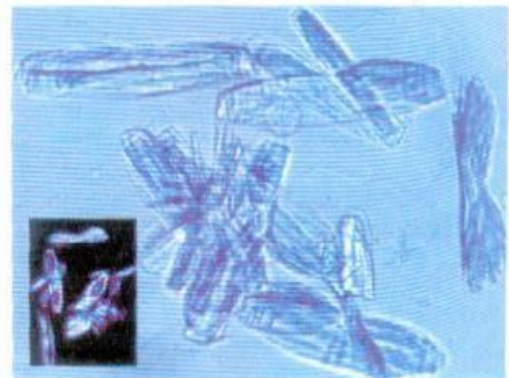


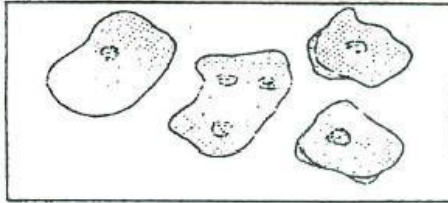
Fig. 10. - Cristaux médicamenteux.

F. Cellules épithéliales

1. Cellules épithéliales pavimenteuses

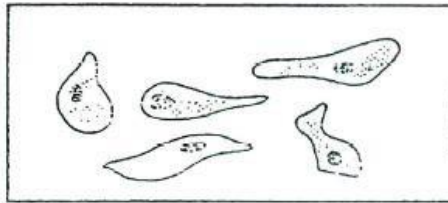
Grandes cellules rectangulaires de desquamation (arrachées aux épithéliums qui recouvrent les voies et organes urinaires). Elles proviennent:

- de l'urètre
- ou du vagin.



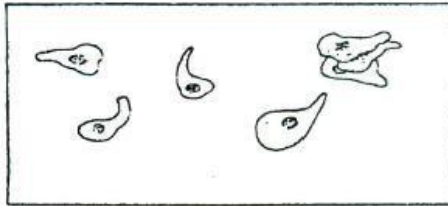
2. Cellules de la vessie

Grandes cellules souvent en losange, avec un noyau bien distinct.



3. Cellules du bassinnet

Cellules de taille moyenne (comme 3 leucocytes), granuleuses avec une sorte de queue.

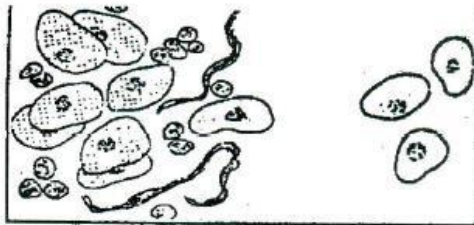


Cellules de l'urètre ou du bassinnet

Cellules moyennes, ovales, à noyau bien distinct.

Si elles sont nombreuses, accompagnées de leucocytes et de filaments, elles peuvent provenir de l'urètre.

Si elles sont peu nombreuses, sans leucocytes, il peut s'agir de cellules du bassinnet.

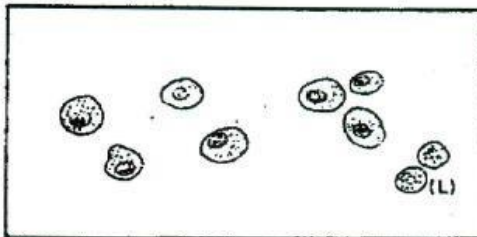


Cellules rénales

Les cellules rénales sont petites.

- larges comme 1 à 2 leucocytes (L)
- très granuleuses.

Le noyau y est nettement visible, réfringent. Elles sont presque toujours accompagnées de protéines dans l'urine.



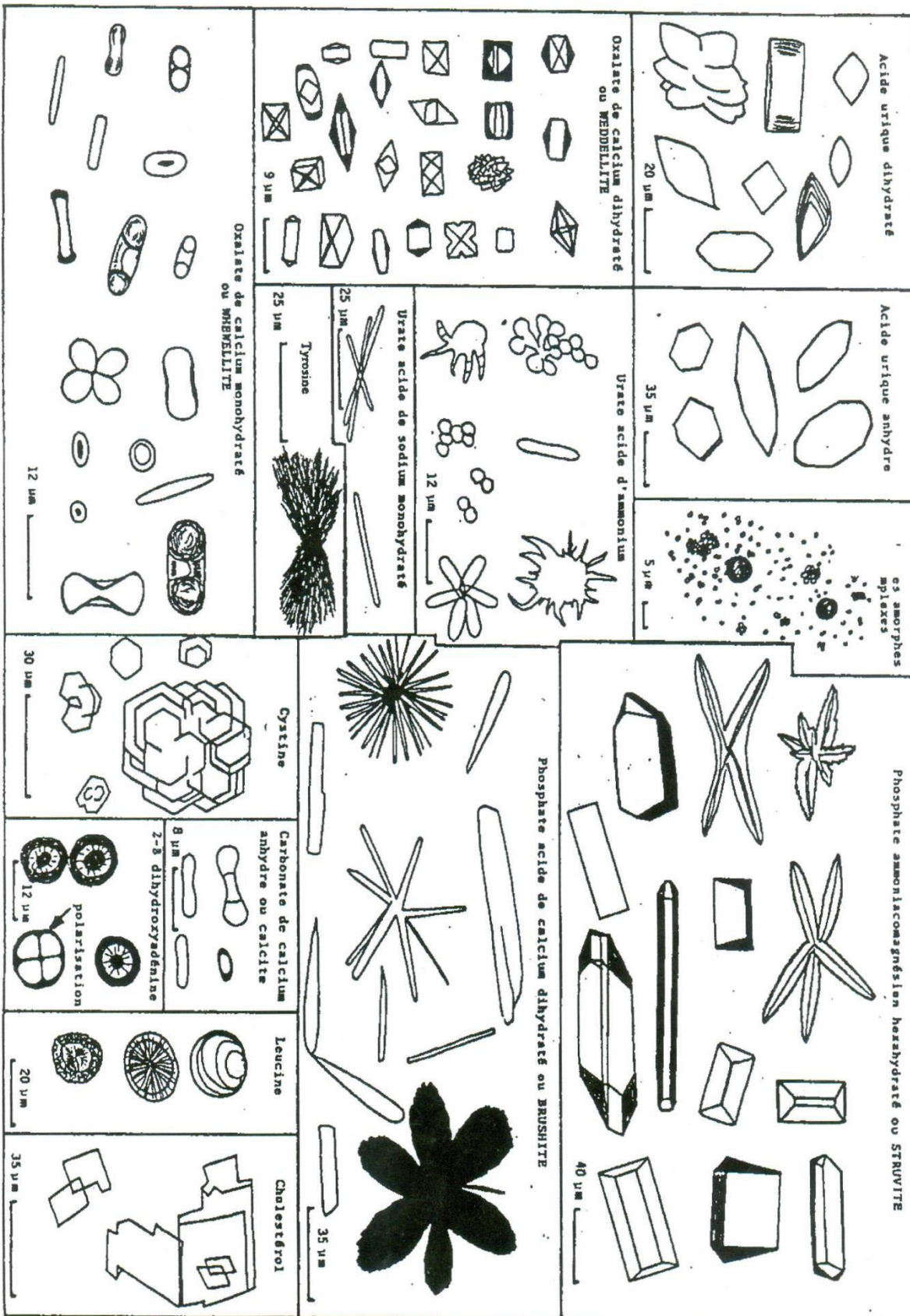


PLANCHE DE CRISTAUX URINAIRES

- Préparation du culot urinaire
  - Homogénéiser l'urine ;
  - Remplir les 3/4 d'un tube conique à centrifuger ;
  - Centrifuger 5 minutes à 35 00 tours/minute ;
  - Rejeter le surnageant dans le lavabo, en retournant le tube conique ;

- Remettre en suspension le culot en aspirant et refoulant doucement trois fois avec une pipette ;
- Etaler le culot sur une lame portant le numéro d'identification du patient pour la coloration de Gram **Cf. Mode opératoire de la coloration de Gram.**
- En suivant les règles d'utilisation du microscope, observer le frottis à l'immersion (objectif  $\times 100$ ).

- Dosages de protéines et du glucose

Elle consiste à la recherche de la présence de protéine et de glucose dans les urines à l'aide d'une bandelette adaptée :

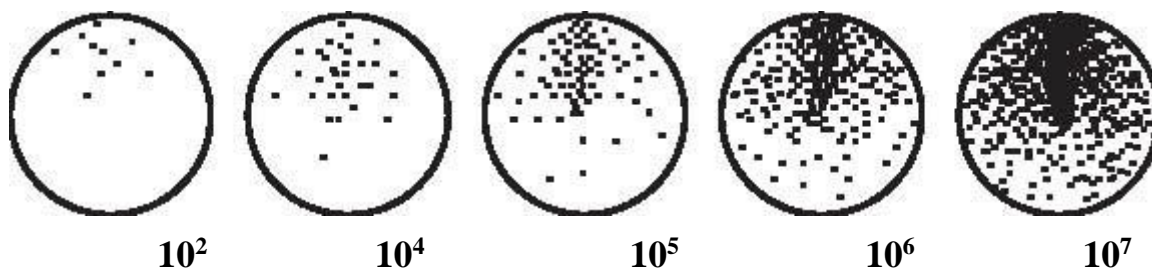
- Ne pas toucher les zones réactives de la bandelette,
- La plonger dans l'urine et la retirer immédiatement en éliminant l'excès d'urine en tapotant légèrement la tranche de la bandelette sur le bord du récipient.
- La tenir horizontale pour éviter toute interférence avec les réactifs des plages voisines.
- Lire à l'œil par comparaison à l'échelle colorimétrique.
- Si la lecture de la bandelette se révèle positive pour la recherche de protéine ou/et de glucose, prendre un tube conique et transvaser une partie des urines du flacon à centrifuger à 3500 tours pendant 5 minutes.
- Prendre un tube sec (tube à hémolyse) sur lequel on inscrira le numéro d'identification du patient, et y recueillir le surnageant qu'on enverra sur la paillasse de biochimie pour le dosage des protéines et/ou glucose.

**N.B :** Si l'urine est hémorragique il n'est pas nécessaire de faire l'étude chimique. Faire une recherche des cristaux et des parasites (schistosome) à partir du culot urinaire entre lame et lamelle.

#### 6.4. Lecture et interprétation

- Numération

Après 24 heures d'incubation à  $37^{\circ}\text{C}$ , la densité des colonies présentes sur la moitié supérieure de la gélose **URISELECT 4** sera comparée à celle du schéma suivant :



Une numération  $\leq 10^4$  germes/ml correspond le plus souvent à une contamination. Toutefois, un tel résultat doit être interprété en fonction de la leucocyturie et du contexte clinique. Une numération  $\geq 10^5$  germes/ml correspond probablement à une infection, à condition que le prélèvement ait été correctement réalisé.

| Leucocyturie (leuco/ml) | Bactériurie (bact/ml) | Interprétation   |
|-------------------------|-----------------------|--|
| $<10/\text{mm}^3$       | $<10^2$               | Urine normale, non infectée  |
| $>10/\text{mm}^3$       | $>10^2$               | Infection urinaire, habituellement mono microbienne, et poly microbienne chez un porteur d'une sonde à demeure |

|                      |                                   |  |
|----------------------|-----------------------------------|--|
| < 10/mm <sup>3</sup> | >10 <sup>2</sup>                  | Discordance entre absence de réaction cellulaire et bactériurie: infection débutante, contamination, infection sur terrain particulier |
| < 10/mm <sup>3</sup> | 10 <sup>2</sup> à 10 <sup>5</sup> | Contamination, prélèvement incorrecte. Un nouveau prélèvement est nécessaire   |
| >10/mm <sup>3</sup>  | < 10 <sup>2</sup>                 | Leucocyturie sans germe. Infection à BK, infection traitée par antibiotique, ou cause non bactérienne                                  |

**Tableau :** Numération et interprétation des colonies sur la gélose URISELECT 4.

- Identification

Etablir le diagnostic en fonction de la couleur des colonies :

**Coloration rose :** il y a présomption d'*E. coli* à confirmer par le test urée / indole car toutes les colonies de coloration rose ne sont pas forcément des *E. coli*. On effectuera l'identification par le Vitek 2 Compact si Indole négative car *E. coli* est **Indole positive**.

Un faible pourcentage de souches d'autres bactéries possèdent une activité β galactosidase et peuvent apparaître de couleur rose sur ce milieu : il s'agit de souches rarement isolées au cours des infections urinaires (*Salmonella, Shigella, Streptocoque A*) ou de souches pouvant être rencontrées dans ce type d'infections mais étant indole négative (*Citrobacter, Hafnia, staphylocoques, Streptocoque B*).

Un très faible pourcentage des souches d'*E. Coli* présente un profil indole négative.

**Coloration incolore :**

**Bacille à Gram négatif :** faire une oxydase **Cf. Mode opératoire du test de l'oxydase**

- **Si l'oxydase est positive**, il y a forte présomption de bactéries non fermentaires (*Pseudomonas, Burkholderia...*) ;
- **Si l'oxydase est négative**, cas des bactéries fermentaires (Entérobactéries).

Dans les deux cas faire une identification et l'antibiogramme par Vitek 2 Compact.

- *Pseudomonas aeruginosa...* **Cf. Mode opératoire de la technique de souchothèque Réf. M07 ANA BAC- 025 V2**

## 6.5. Résultat

Préalablement noté sur la fiche de paillasse édité, celui-ci doit être saisi dans le système informatique du laboratoire.

Si possible, communiquer le résultat au clinicien en charge du patient. Cependant seul le biologiste est à mesure de téléphoner ou ses assistants.

## 6.6. Validation technique/ Critères de repasse

La validation de l'antibiogramme effectuée par la galerie Mini Api doit être faite par le technicien. Si le milieu est limpide, le germe est non résistant (sensible) à l'antibiotique existant dans ce puit, dans le cas où le milieu est trouble, le germe est résistant à l'antibiotique.

Le technicien doit vérifier que le résultat de l'automate est conforme à celle qu'il observe sur la galerie, dans le cas contraire rectifier les résultats de l'automate.

## 6.7. Hygiène et sécurité

Avant et après les manipulations, nettoyer la paillasse avec de l'eau de Javel à 10%.

- Faire toujours les manipulations en présence d'une flamme ;

- Toujours porter des gants, des chaussures fermées et si possible un masque de protection ;
- Eviter de toucher les portails, les appareils et les microscopes avec les gants ;
- Ne jamais manger, ni boire lors des manipulations en laboratoire.
- Bien conserver à +2 - 8°C, à l'abri de la lumière les milieux de culture et les bouillons afin d'éviter les contaminations ;
- Eviter tout liquide inflammable aux environs de la flamme ;
- Eviter de déposer les bouteilles au bord des paillasse ;
- Se laver les mains bien et régulièrement à l'eau de Javel et au savon anti-bactéricide.

## **7. Post analytique**

### **7.1. Validation biologique**

Réservée au biologiste, elle s'effectue en confrontant l'ensemble des résultats avec les éléments cliniques apportés par la discussion avec le médecin prescripteur. Elle est objectivée par la signature du compte-rendu.

### **7.2. Rendu des résultats**

Après la validation biologique les résultats sont enregistrés par le technicien ou la secrétaire dans le registre de la section bactériologie/parasitologie et rendu sous pli fermé au médecin ou au malade.

### **73. Gestion des déchets**

Pendant la manipulation tous les objets souillés sont plongés systématiquement dans l'eau de javel à 12° chlorimétrique. Les objets tranchants sont jetés dans une boîte de sécurité et les objets souillés non tranchants dans la poubelle jaune (poubelle contaminée). Tous les déchets seront éliminés après le travail. **Cf. Procédure de tri et élimination des déchets biomédicaux Réf. P10 HYG- 002 V1**

### **7.4.. Archivage des données**

L'enregistrement, les cahiers de paillasse et les registres de laboratoire sont conservés au laboratoire. Le système informatique du laboratoire permet d'archiver tous les dossiers des patients.

## Annexe 7 : PROCEDURE D'IDENTIFICATION DES BACTERIES AU LRM

|                           |   |                            |     |              |
|---------------------------|---|----------------------------|-----|--------------|
| Rédigé le:                | 22/02/2016                                | Par : Dr Lassina TIMBINE   | LT  | Visa :       |
| Vérifié le:               | 22/02/2016                                | Par : Judicaël OUEDRAOGO   | JO  | Visa :       |
| Approuvé le:              | 22/02/2016                                | Par : Dr Madiné TALL TOURE | MTT | Visa :       |
| Modifié le:               |   | Par :                      |     | Visa :       |
| Vérifié le :              | 22/02/2017                                | Par : Abderrhamane MAIGA   | AMA | Visa :       |
| Approuvé le:              | 28/02/2017                                | Par : Dr Madiné TALL TOURE | MTT | Visa :       |
| Mise en application :     | 22/03/2016                                |                            |     | Version N° 1 |
| Date de revue :           | 22/02/2017                                |                            |     |              |
| Objet de la modification: | Création de document<br>Révision annuelle |                            |     |              |
| Archivé le :              |   |                            |     |              |

Document provisoire

X Document opérationnel

**Exemplaires :** - Classeur Assurance Qualité  
- Dossier commun sur le serveur Documents Qualité liés:

**MAQ:** Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako **P:**

**MO:**

**D:**

**E:**

### I – Buts

Décrire la procédure d'identification des bactéries au LRM.

### II - Domaines et personnel concerné

Secteur de bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

### III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

### IV – Références

### V – Contenu



# PROCEDURE D'IDENTIFICATION DES BACTERIES AU LRM

## 1. Schéma

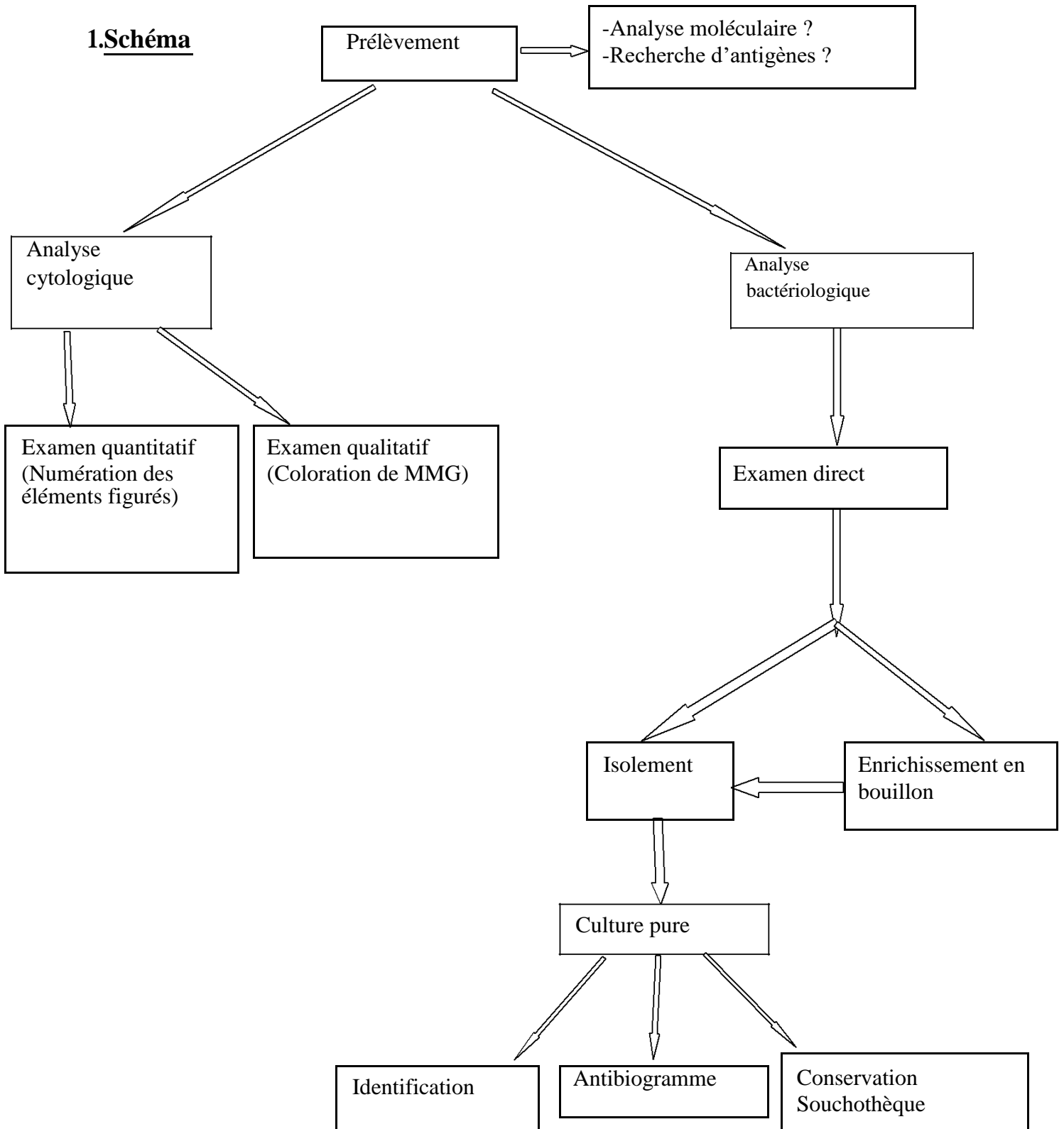
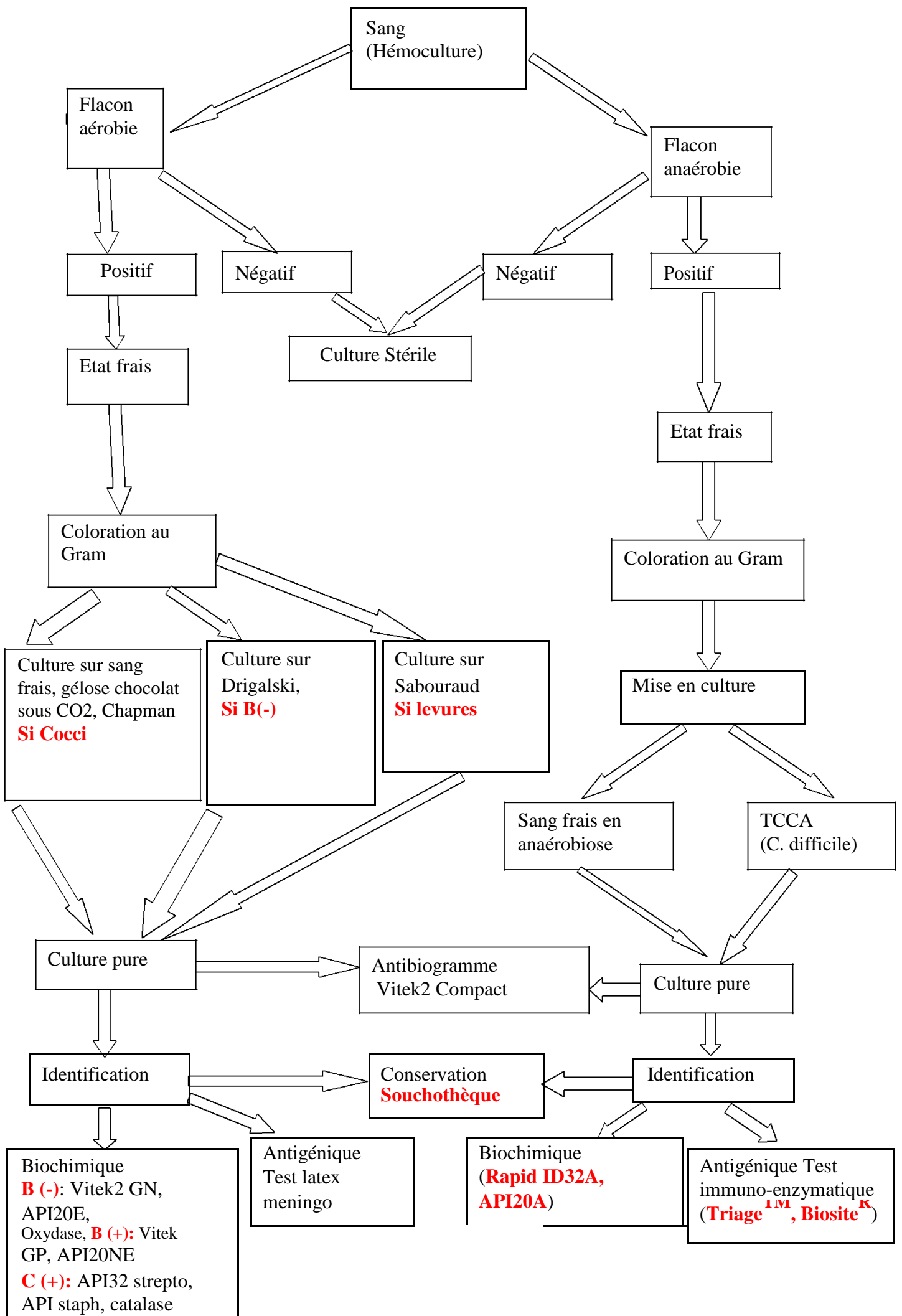
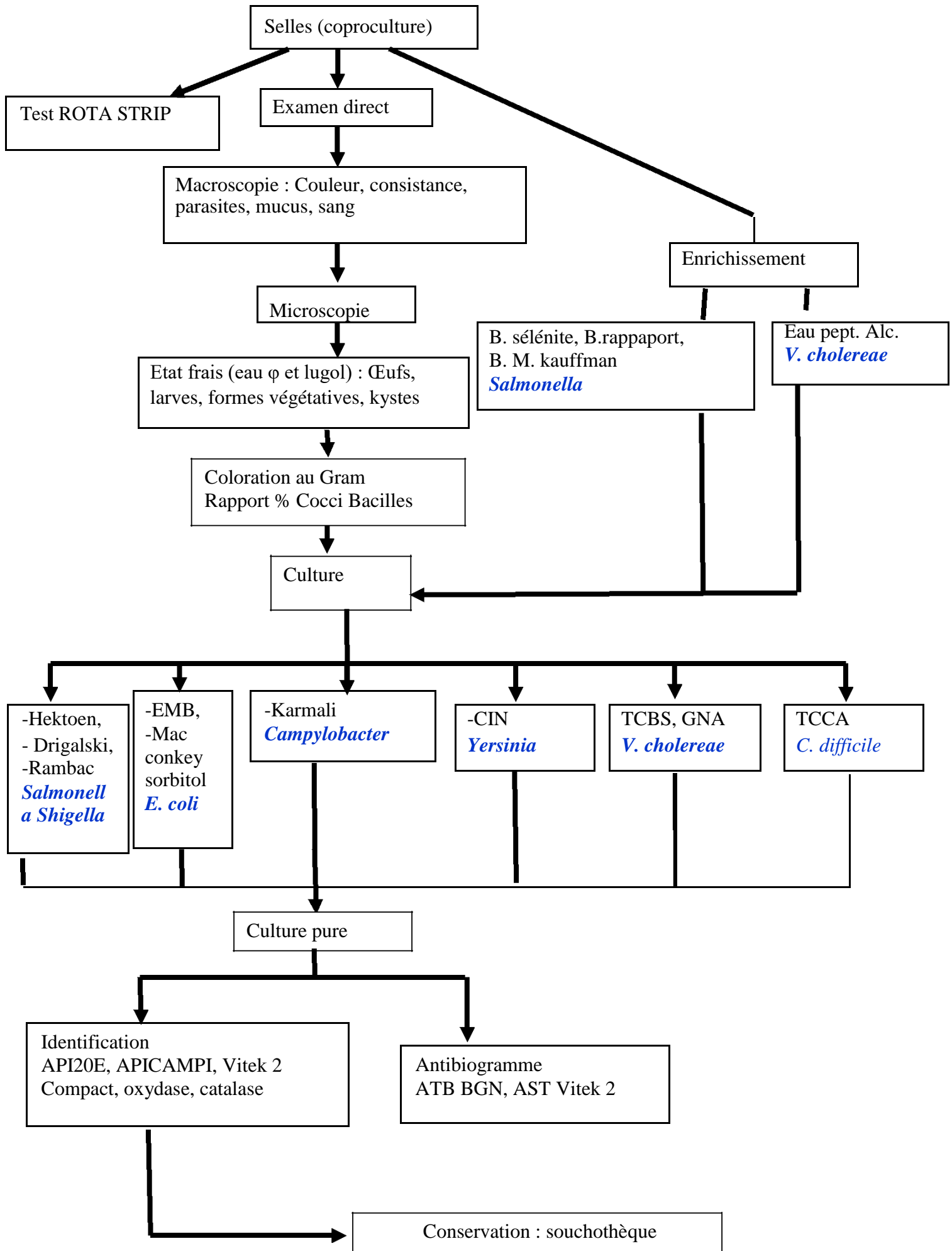
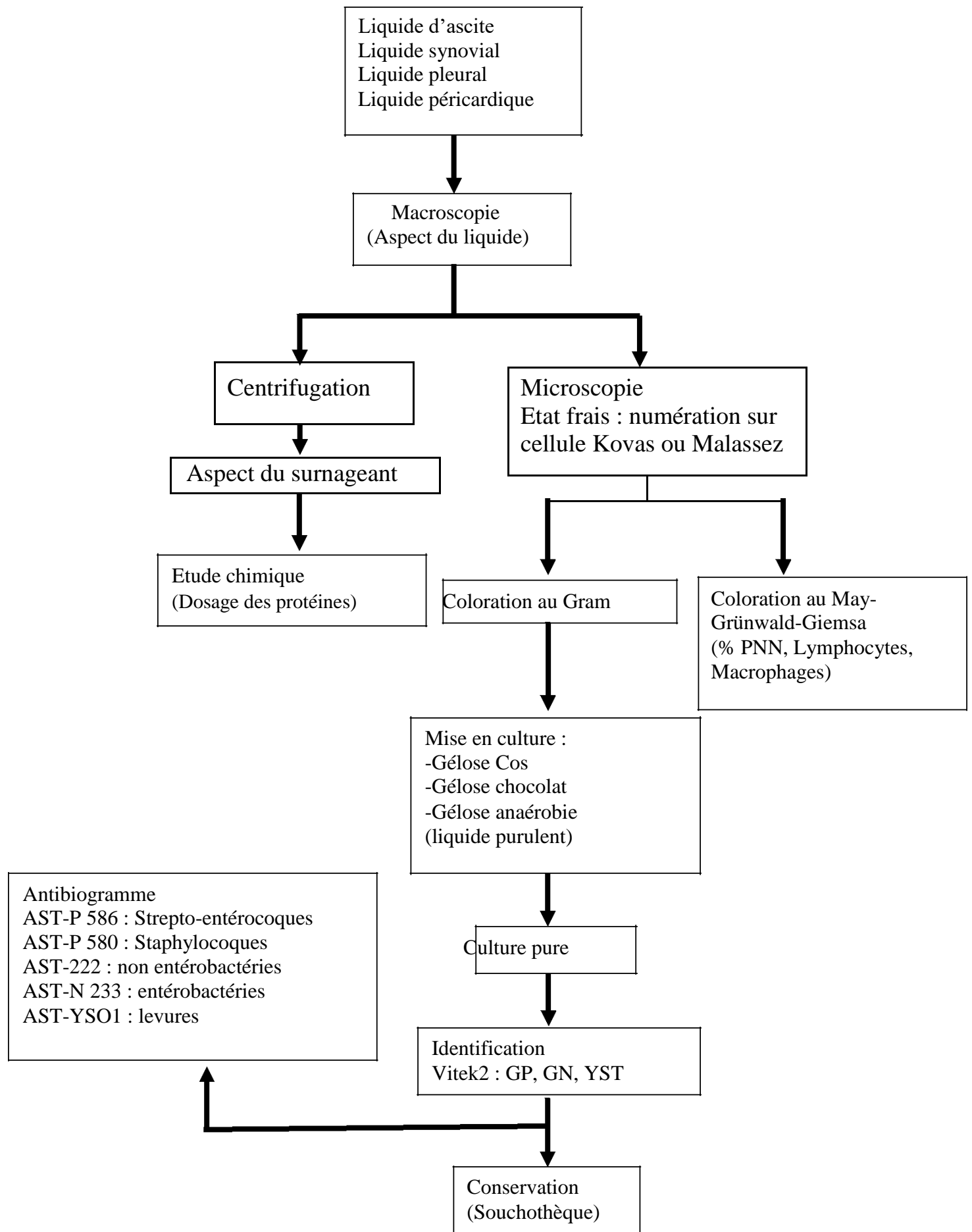
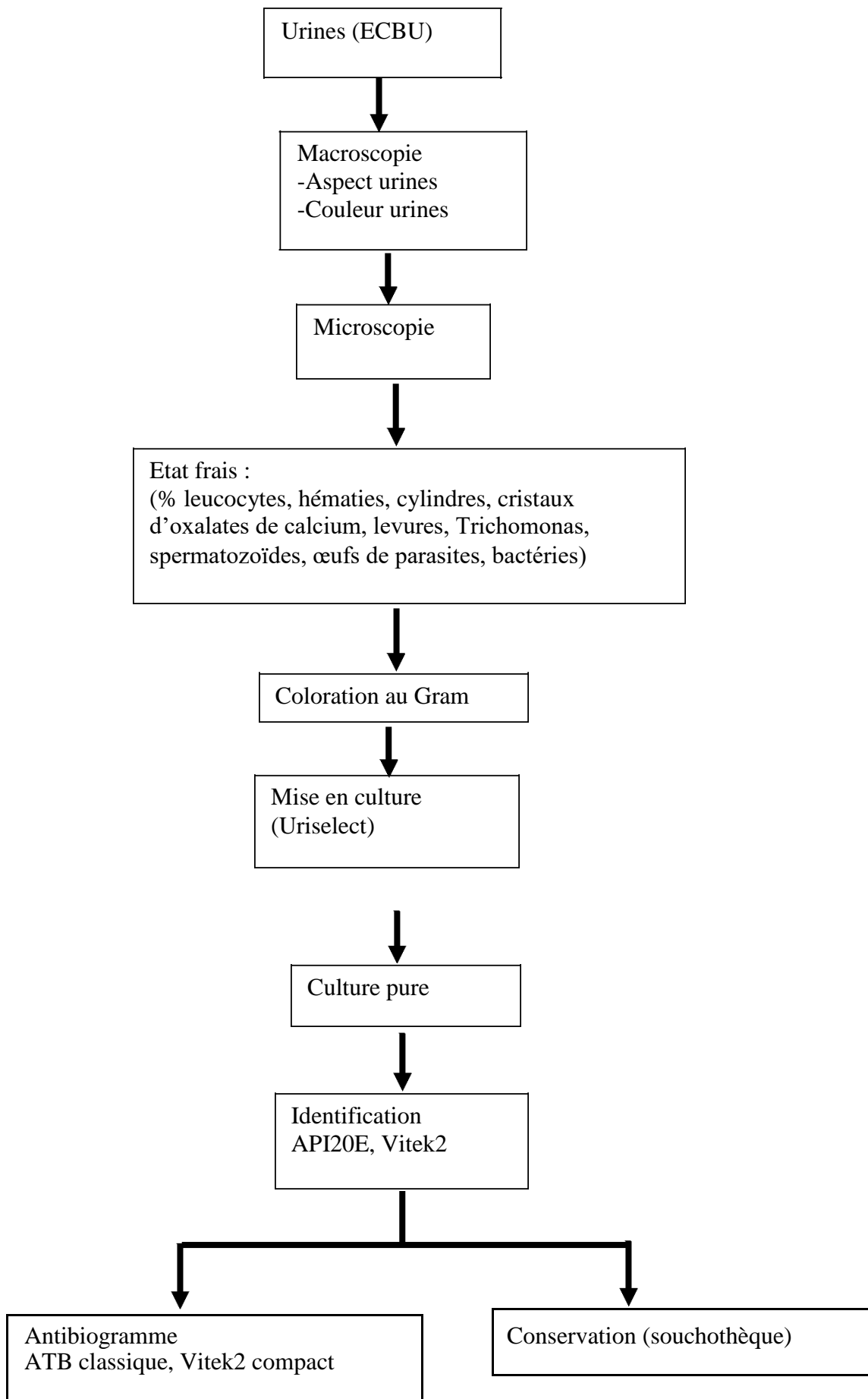


Schéma général de la démarche de l'analyse bactériologique









Recherche de mycoplasmes dans les prélèvements uro-génitaux

Ensemencer le réactif Mycoplasma R1 avec le prélèvement Introduire le prélèvement dans le

Préparer l'inoculum :  
-homogénéiser  
-transférer 3ml du Mycoplasma R1 ensemencé dans le réactif Mycoplasma R2, agiter au vortex

Préparer la galerie :  
-Ramener à la t° ambiante  
- Sortir la galerie de l'emballage  
-Mettre le couvercle  
-Inscrire la référence de l'échantillon

Ensemencer la galerie :  
-Répartir le bouillon dans les cupules  
-Ajouter 2 gouttes de paraffine dans les cupules  
-Incuber la galerie et le reste du bouillon pendant 24h et 48h à 36°C +/-2°C

Identification :  
-Coloration jaune du bouillon = Négatif  
-Coloration orange à rouge du bouillon= Positif  
-Lecture de la galerie à 24h et 48h

Test de sensibilité aux antibiotiques  
E-test, Kit étudiant la sensibilité et identifiant l'espèce

## Annexe 8 : MODE OPERATOIRE DE LA RECHERCHE DE L'OXYDASE

|                           |            |                            |     |              |
|---------------------------|------------|----------------------------|-----|--------------|
| Rédigé le:                | 25/02/2005 | Par : Al Hadji SIDIBE      | AS  | Visa :       |
| Vérifié le:               | 25/02/2005 | Par : Louis DEWEERDT       | LD  | Visa :       |
| Approuvé le:              | 28/02/2005 | Par : Fatou Traoré FAYE    | FTF | Visa :       |
| Modifié le:               | 21/02/2013 | Par : Fatoumata MAIGA      | FM  | Visa :       |
| Vérifié le :              | 21/04/2016 | Par : Abderrhamane MAIGA   | AMA | Visa :       |
| Approuvé le:              | 21/04/2016 | Par : Dr Madiné TALL TOURE | MTT | Visa :       |
| Mise en application le :  | 21/05/2016 | Par :                      |     | Version N° 2 |
| Date de revue :           | 21/04/2017 |                            |     |              |
| Objet de la modification: |            |                            |     |              |
| Archivé le :              |            |                            |     |              |

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité

- Dossier commun sur le serveur Documents

Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P:

MO:

D:

E:

### I – Buts

Décrire la technique du test de l'oxydase en microbiologie.

### II - Domaines et personnels concernés

Le secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

### III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

### IV – Références

### V – Contenu

# MODE OPERATOIRE DE LA RECHERCHE DE L'OXYDASE

## 1. But du test :

La recherche de l'oxydase permet :

- D'identifier le genre *Neisseria* spp (positif)
- De séparer les Entérobactéries (négatif) des espèces du genre *Pseudomonas* (positifs pour la plupart)
- De différencier *Moraxella* (positif) et *Neisseria* (positif) d'*Acinetobacter* (négatif)
- De différencier *Pseudomonas maltophilia* (négatif) des autres *Pseudomonas* sp (positif)
- D'aider à l'identification d'*Aeromonas* (positif), *Alcaligenes* (positif), *Branhamella* (positif) et *Yersinia* (négatif).

## 2. Principe

Le test de l'oxydase est basé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire. En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, cette enzyme oxyde le réactif phénylènediamine, pour former un composé coloré en violet, l'indophénol. L'acide ascorbique, incorporé dans le réactif, agit en tant qu'agent réducteur pour limiter l'auto-oxydation et améliorer la stabilité du réactif. Cette formulation est basée sur la formule de la réactive oxydase de Kovac.

## 3. Matériel

- Oese (en platine, plastique).
- Disques non imprégnés de diamètre 6 mm.

## 4. Condition de stockage

- Les réactifs se conservent entre 18°C et 25°C dans leur coffret jusqu'à la date de péremption.
- Ne pas congeler.
- Conserver à l'abri de la lumière.
- Le réactif oxydase s'auto-oxyde rapidement et perd sa sensibilité. Tout réactif partiellement utilisé doit être éliminé au bout de 24 heures.

## 5. Nature de l'échantillon

L'échantillon est constitué d'une colonie isolée pour laquelle on veut détecter l'enzyme cytochrome oxydase. Cette colonie doit être issue d'une culture de 18 à 24 heures sur milieux de culture gélosés solides.

## 6. Contrôle de qualité

L'activité du réactif peut être testée à l'aide des souches suivantes cultivées sur géloses Trypcase-Soja(ou Drygalski) :



- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Escherichia coli* ATCC 25922

| Souche                                      | Résultats                     |
|---|-------------------------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27853 | Positif : coloration violette |
| <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 25922       | Négatif : pas de coloration   |

## 7. Réalisation du test

- Placer le flacon compte-gouttes dans le briseur d'ampoule.
- Tapoter le fond du flacon pour éliminer les bulles qui auraient pu s'y former.
- Saisir le milieu de l'ensemble flacon/briseur et appuyer doucement pour briser l'ampoule.
- Distribuer précisément une goutte de réactif sur un disque non imprégné de diamètre 6 mm.
- Etaler la colonie sur le disque.

## 8. Résultat

- **Lecture et interprétation**
  - L'apparition en 10 à 30 secondes d'une coloration allant de violet à pourpre indique un test positif.
  - Des réactions tardives ou l'absence de couleur indiquent un test négatif.

### NB :

- La réaction d'oxydase ne doit pas être réalisée sur des colonies obtenues sur gélose EMB ou CHAPMAN 2, ni sur des colonies issues d'une culture de 48 heures sur des milieux gélosés solides.
- La recherche de l'oxydase ne doit pas être effectuée sur des colonies isolées présentant une coloration spontanée (couleur violette, rose, noire...). Dans ce cas, la lecture du test est impossible.
- L'utilisation d'un volume de réactif trop important peut entraîner des résultats faussement négatifs. N'utiliser qu'une seule goutte de réactif comme indiqué dans le mode opératoire.
- Il est conseillé d'utiliser une oese ou une aiguille en platine ou en plastique pour le test de l'oxydase. Toute trace de fer (nichrome) peut catalyser la réaction de l'oxydase et conduire à une réaction faussement positive.
- Tout réactif partiellement utilisé doit être éliminé au bout de 12 heures.
- Les genres faiblement producteurs d'oxydase comme les *Pasteurella*, peuvent donner des résultats négatifs.

- Des résultats faussement négatifs peuvent survenir en cas de cultures mixtes de *Pseudomonas* et *Neisseria*. Une substance inhibitrice est produite par *Pseudomonas spp.* interférant avec la production d'oxydase de *Neisseria spp.*

## **9. Gestion des déchets**

Les réactifs non utilisés peuvent être éliminés comme déchets non dangereux.

Éliminer les réactifs utilisés ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

## Annexe 9 : MODE OPERATOIRE DE LA RECHERCHE DE LA CATALASE

|                           |            |                            |     |              |
|---------------------------|------------|----------------------------|-----|--------------|
| Rédigé le:                | 24/02/2005 | Par : Al Hadji SIDIBE      | AS  | Visa :       |
| Vérifié le:               | 03/03/2005 | Par : Louis DEWEERDT       | LD  | Visa :       |
| Approuvé le:              | 04/03/2005 | Par : Fatou Traoré FAYE    | FTF | Visa :       |
| Modifié le:               | 21/02/2013 | Par : AHANOGBE Lem K. A    | AL  | Visa :       |
| Vérifié le :              | 22/04/2016 | Par : Judicaël OUEDRAOGO   | JO  | Visa :       |
| Approuvé le:              | 22/04/2016 | Par : Dr Madiné TALL TOURE | MTT | Visa :       |
| Mise en application le :  | 22/05/2016 |                            |     | Version N° 2 |
| Date de revue :           | 22/04/2017 |                            |     |              |
| Objet de la modification: |            |                            |     |              |
| Archivé le :              |            |                            |     |              |

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité  
- Dossier commun sur le serveur

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P:

MO:

D:

E:

### I – Buts

Décrire la technique du test de la catalase en microbiologie.

### II - Domaines et personnels concernés

Le secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

### III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

### IV – Références

### V – Contenu

# MODE OPERATOIRE DE LA RECHERCHE DE LA CATALASE

## 1. But :

La recherche de la catalase est réalisée pour différencier le genre :

- Sretptococcus (catalase négative) du genre Staphylococcus (catalase positive)
- Bacillus (catalase positive) du genre Clostridium (catalase négative)
- Listeria (catalase positive) et/ou Corynebacterium (catalase positive) du genre Erysipelothrix (catalase négative)

## 2. Principe

La catalase est une enzyme qui hydrolyse le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. La présence de catalase est détectée chez les micro-organismes par une libération d'oxygène à partir d'eau oxygénée.

La présence d'un agent épaississant et d'un colorant facilitent l'observation du dégagement gazeux.

## 3. Matériel

- Le réactif de catalase
- La lame porte-objet ;
- Le bâtonnet ;
- La souche pure.

## 4. Contrôle de qualité

L'activité du réactif peut être testée vis à vis des souches suivantes :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, la catalase est **positive**
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, la catalase est **négative**

## 5. Réalisation du test

Laisser les flacons revenir à température ambiante

- Test sur lame
  - Déposer sur la lame une goutte d'ID color catalase ;
  - Disperser 1 à 2 colonies dans la goutte ;
  - A l'aide d'un bâtonnet, bien triturer.
- Test direct sur le milieu de culture
- Déposer une goutte d'ID color catalase directement sur la colonie.

## **6. Résultat**

**Le test doit être réalisé sur des colonies de 18 à 24 heures après incubation. Les colonies plus âgées pourraient perdre leur catalase et donner des faux négatifs. La présence de catalase se matérialise par une production de bulles ;**

Les entérobactéries sont toutes des bactéries catalase positive, à l'exception de *Shigella dysenteriae* ; Les bacilles à Gram négatif non fermentaires sont en général, catalase positive telles que *Pseudomonas, Acinetobacter...* ;

Quelques cocci à Gram positif son catalase positive comme les Staphylocoques.

## **7. Gestion des déchets**

**Les objets tranchants sont jetés dans une boîte de sécurité et les objets souillés non tranchants dans la poubelle jaune.**

## Annexe 10 : MODE OPERATOIRE DE LA TECHNIQUE DE COLORATION DE GRAM

|                           |            |                            |     |              |
|---------------------------|------------|----------------------------|-----|--------------|
| Rédigé le:                | 25/02/2005 | Par : Al Hadji SIDIBE      | AS  | Visa :       |
| Vérifié le:               | 25/02/2005 | Par : Louis DEWEERDT       | LD  | Visa :       |
| Approuvé le:              | 02/03/2005 | Par : Fatou Traoré FAYE    | FTF | Visa :       |
| Modifié le:               | 21/02/2013 | Par : Tony ZITTI           | TZ  | Visa :       |
| Vérifié le :              | 25/03/2016 | Par : Judicaël OUEDRAOGO   | JO  | Visa :       |
| Approuvé le:              | 25/04/2016 | Par : Dr Madiné TALL TOURE |     | Visa :       |
| Mise en application :     | 25/05/2016 |                            |     | Version N° 2 |
| Date de revue :           | 25/04/2017 |                            |     |              |
| Objet de la modification: |            |                            |     |              |
| Archivé le :              |            |                            |     |              |

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité  
- Dossier commun sur

le serveur Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM  
de Bamako P:

MO:

D:

E:

### I – Buts

Décrire le mode opératoire de la technique de coloration de Gram.

### II - Domaines et personnels concernés

Secteur de bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

### III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

### IV – Références

### V – Contenu

# MODE OPERATOIRE DE LA TECHNIQUE DE COLORATION DE GRAM

## 1. Principe

C'est la coloration de base en bactériologie et elle permet une classification des bactéries selon leur structure. Elle est l'une des caractères essentiels de la classification des bactéries. Plusieurs facteurs vont intervenir dans cette coloration :

- La différence de composition chimique de bactéries ;
- La différence de perméabilité de la paroi bactérienne à l'alcool-acétone.

## 2. Matériel

- Microscope ;
- Blouse ;
- Bac de coloration ;
- Plaque chauffante ;
- Bec bunsen ;
- Centrifugeuse.

## 3. Consommable

- Gants ;
- Lames porte objet ;
- Tube conique ;
- Pipette pasteur.

## 4. Réactif

- Colorants : violet de gentiane, le lugol, l'alcool-acétone, la fuchsine.
- L'huile d'immersion.

## 5. Nature du prélèvement

Frottis d'un produit pathologique bien séché sur une lame

## 6. Contrôle de qualité

Les lames positives (frottis préparés avec une souche de bactérie connue) sont conservées et utilisées comme lames de référence.

## 7. Technique

La coloration de Gram se déroule en plusieurs étapes qui se succède et consiste à :

- Fixer le frottis ;
- Recouvrir le frottis de la solution de cristal violet, laisser agir une minute (violet de gentiane) ;
- Rejeter le colorant puis laver à l'eau ;
- Recouvrir la préparation de lugol, laisser agir une minute ;

- Rejeter le colorant puis laver à l'eau ;
- Décolorer à l'alcool-acétone ;
- Rincer à l'eau de robinet et recouvrir la lame de solution de fuchsine diluée, laisser agir 30 secondes ;
- Rejeter la Fuchsine, laver à l'eau, égoutter, sécher entre deux feuilles de papier buvard propres ;
- Lire le frottis coloré au microscope à l'objectif x100 à l'huile d'immersion.

## **8. Résultat**

A la coloration de Gram :

- Bactéries Gram négatifs : coloration rose
- Bactéries Gram positifs : coloration violette
- Levures : forme ovale coloration violet



## Annexe 11 : MODE OPERATOIRE DE L'UTILISATION DE LA CELLULE DE KOVA

|                           |                   |                            |     |              |
|---------------------------|-------------------|----------------------------|-----|--------------|
| Rédigé le:                | 21/02/2013        | Par : Tony ZITTI           | TZ  | Visa :       |
| Vérifié le:               | 25/03/2013        | Par : Judicaël OUEDRAOGO   | JO  | Visa :       |
| Approuvé le:              | 25/03/2013        | Par : Dr Bréhima TRAORE    | BT  | Visa :       |
| Modifié le:               |                   | Par :                      |     | Visa :       |
| Vérifié le :              | 25/03/2017        | Par : Judicaël OUEDRAOGO   | JO  | Visa :       |
| Approuvé le:              | 25/03/2017        | Par : Dr Madiné TALL TOURE | MTT | Visa :       |
| Mise en application le :  | 25/04/2016        |                            |     | Version N° 1 |
| Date de revue :           | 25/03/2018        |                            |     |              |
| Objet de la modification: | Révision annuelle |                            |     |              |
| Archivé le :              |                   |                            |     |              |

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité :

### Documents Qualité liés:

**MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako**

**P: Procédure de la réalisation des analyses en bactériologie Procédure de gestion des déchets**

**MO:**

**D:**

**E:**

### I – But

Décrire le mode d'utilisation de la cellule de Kova.

### II - Domaines et personnels concernés

Secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette cellule.

### III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

### IV – Références

### V – Contenu

# MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DE LA CELLULE DE KOVA

## 1. Principe

Il consiste à quantifier les cellules (leucocytes, hématies, cellules épithéliales, cristaux, cylindres, œufs de schistosomes...) dans les urines ou dans les liquides de ponction à l'aide de la cellule de Kova vue au microscope optique à l'objectif x10 puis x40.

## 2. Matériel

- Microscope ;
- Micropipettes.
- Cellule de Kova

## 3. Consommables

- Gants ;
- Embouts ;
- Essuie- tout.

## 4. Nature du prélèvement

Les urines et les liquides de ponction

## 5. Protocole

- Mélanger et pipeter 10 $\mu$ l de l'échantillon;
- Remplir le quadrant de la cellule de KOVA.

## 6. Règles d'utilisation de la cellule de Kova

- Chaque cellule contient 10 grilles de comptage séparées ;
- Chaque grille est constituée de 9 cases, chacune étant constituée de 9 petits carrés ;
- Chaque cellule à un volume de 1  $\mu$ l = 1mm<sup>3</sup> ;
- On ne compte pas les éléments qui sont sur les lignes (qui représentent 1/9 de la surface) ;
- Le nombre d'éléments comptés dans 1 case doit être multiplié par 10 pour obtenir un nombre par  $\mu$ l ou mm<sup>3</sup> ;
- Le nombre d'éléments comptés dans un carré doit être multiplié par 100 ;
- Ne pas oublier de multiplier par le facteur de dilution si l'échantillon a été dilué ;
- Penser à rayer les chambres déjà utilisées à l'aide d'un marqueur ;

- Regarder au microscope à l'objectif X10 puis à l'objectif X40 et quantifier les éléments à savoir :
  - Pour les urines : leucocytes, hématies, cristaux, cylindres, cellules épithéliales... ;
  - Pour les liquides de ponction : leucocytes et hématies.
  
- En ce qui concerne les urines, lorsqu' une leucocyturie est présente, faire une coloration de Gram à partir du culot urinaire pour orienter le diagnostic.

## Annexe 12 : MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU MINI API

|                           |                   |                            |     |              |
|---------------------------|-------------------|----------------------------|-----|--------------|
| Rédigé le:                | 22/02/2013        | Par : Abderrhamane MAIGA   | AMA | Visa :       |
| Vérifié le:               | 14/03/2016        | Par : Judicaël OUEDRAOGA   | JO  | Visa :       |
| Approuvé le:              | 14/03/2016        | Par : Dr Madine TALL TOURE | MTT | Visa :       |
| Modifié le:               |                   | Par :                      |     | Visa :       |
| Vérifié le :              | 14/03/2017        | Par : Judicaël OUEDRAOGA   | JO  | Visa :       |
| Approuvé le:              | 14/03/2017        | Par : Dr Madine TALL TOURE | MTT | Visa :       |
| Mise en application :     | 14/04/2016        |                            |     | Version N° 1 |
| Date de revue :           | 14/03/2018        |                            |     |              |
| Objet de la modification: | Révision annuelle |                            |     |              |
| Archivé le :              |                   |                            |     |              |

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité  
- Dossier commun sur le serveur

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P:

MO:

D:

E:

### I – Buts

Décrire l'utilisation en routine du Mini Api.

### II - Domaines et personnel concerné

Secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utilisé cet appareil.

### III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

### IV – Références

### V – Contenu

# MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU MINI API

## 1. Principe

Le Mini API permet deux types de lecture.

### 1.1. La lecture turbidimétrique

Elle est destinée aux galeries turbidimétriques.

#### **Exemple :**

ID 32 GN

ID 32 C

ATB UR

**Turbidimétrie** : mesure de l'intensité de la lumière transmise (T) inversement proportionnelle à la croissance bactérienne.

**Néphélométrie** : mesure de l'intensité de la lumière diffusée (D) à 30°C directement proportionnelle à la croissance bactérienne.

Ces deux mesures permettent d'évaluer la densité bactérienne dans chaque cupule.

Le cycle d'une lecture turbidimétrique se fait en deux étapes :

#### **1ère étape :**

Entrée du chariot porte galerie et détection du code de la galerie

#### **2ème étape :**

Mesure sous la position sans filtre puis sortie du chariot porte galerie

Lorsque le cycle de lecture est terminé, le logiciel traite les mesures effectuées.

### 1.2. La lecture colorimétrique

Elle est destinée aux galeries colorimétriques.

#### **Exemple:**

ID 32 STAPH

ID 32 E

Rapid ID 32 A

Rapid ID 32 STREP

Le Mini API effectue pour chaque cupule une mesure de transmission de la lumière dans 4 régions du spectre visible.

Le cycle d'une lecture colorimétrique se fait en 4 étapes :

#### **1ère étape :**

- 1ère entrée du chariot porte galerie
- Détection du code de la galerie
- Mesure sous filtre K60

#### **2ème étape :**

- 1ère sortie du chariot porte galerie
- Mesure sous filtre K40

### **3ème étape :**

- 2ème entrée du chariot porte galerie
- Mesure sous le filtre DT bleu

### **4ème étape :**

- 2ème sortie du chariot porte galerie
- Mesure sous le filtre DT vert
- Lorsque le cycle de lecture est terminé, le logiciel traite les mesures effectuées.

## **2. Mise en route**

Il faut :

Mettre le Mini API sous tension en appuyant sur l'interrupteur d'alimentation (marche/arrêt) à l'arrière de l'appareil.

A la mise sous tension, la configuration interne du système est testée (identification du microprocesseur, taille de la mémoire).

Deux signaux sonores retentissent. Le Mini API a effectué avec succès les tests internes. L'écran affiche brièvement la page de présentation du logiciel Mini API puis le menu principal apparaît.

## **3. Procédure d'utilisation**

### **3.1. Description du logiciel**

Le logiciel Mini API est composé de 6 modules :

#### **SAISIE.**

Ce module permet à l'utilisateur de créer les dossiers patients gérés par le Mini API.

Un dossier patient est identifié par une référence unique.

L'examen d'un dossier patient contient les informations relatives à un prélèvement.

Les résultats d'identification et d'antibiogramme concernant un prélèvement sont affectés d'un numéro d'ordre géré automatiquement.

L'examen d'un dossier patient peut contenir jusqu'à 5 germes.

#### **CONSULT.**

Ce module permet de visualiser les données patientes et de vérifier l'examen et les résultats associés.

#### **COMM.**

Ce module permet l'échange d'information entre le Mini API et le système informatique du laboratoire.

#### **EXPERT.**

Ce module intègre la gestion d'un système EXPERT permettant l'interprétation des résultats bruts des antibiogrammes enregistrés.

#### **OUTILS.**

Ce module regroupe tous les utilitaires du logiciel : Création et Mise à jour des Thésaurus, Sauvegarde/ Restauration / Extraction, Destruction des données.

Api /ATB.

Ce module permet d'effectuer des lectures de galeries d'identification ou d'antibiogramme sans créer un dossier patient et d'examen associé. Les résultats pour l'identification et l'antibiogramme ne sont pas enregistrés. Les résultats de l'antibiogramme ne sont pas expertisés.

### **3.2. Réalisation d'un test**

Avant d'effectuer la lecture des galeries, il faut :

#### **1ère étape :**

- Mettre en marche Mini API.
- Attendre au moins 15 minutes (préchauffage) avant de commencer la lecture des galeries.
- Création d'un dossier patient.

#### **2ème étape :**

- Préparation des galeries pour la lecture.
- Enlever le couvercle des galeries.
- Ajouter les réactifs nécessaires pour la révélation de certains tests (se reporter à la notice d'utilisation des galeries).

#### **3ème étape :**

- Tirer l'arceau de protection.

#### **Attention :**

Il est impératif de tirer complètement l'arceau de protection pour procéder à la sortie du chariot porte galerie.

L'arceau de protection délimite la surface pour le libre déplacement du chariot porte galerie.

Il ne doit pas être utilisé comme poignet pour déplacer

l'instrument. Ne rien poser sur l'arceau de protection lorsque celui-ci est tiré.

La sortie du chariot porte galerie est effectuée automatiquement par le logiciel Mini API au moment de la lecture automatique des galeries.

#### **Important :**

Ne pas toucher le chariot porte galerie durant le mouvement de celui-ci.

#### **4ème étape :**

- Positionner la galerie sur le chariot porte galerie

#### **5ème étape : lecture des galeries :**

- La lecture des galeries est déclenchée par le logiciel Mini API
- La lecture des galeries est automatique
- Le code de la galerie est lu et les résultats interprétés générant ainsi le traitement de la galerie correspondante: lecture turbinéphéléométrique ou colorimétrique.

## **4. Arrêt du Mini Api**

Lorsque le menu principal de mini Api est affiché, sortir de l'application

- Appuyer sur <SUPPR>
- Eteindre l'appareil

- Rentrer l'arceau de protection

## **5. Gestion des documents**

| Type de document   | Contenant  | Lieu                      | Durée de conservation                                       |
|--------------------|--|---------------------------|---|
| Document qualité   | Classeur Assurance qualité Mini Api                | Laboratoire Bactériologie | <b>3 ans</b> après la fin de leur utilisation               |
| Traçabilité AQ     | Fiche de vie Mini Api                              | Laboratoire Bactériologie | Pendant la durée de vie de l'appareil et <b>3 ans</b> après |
| Document fabricant | Manuel d'utilisation et Manuel Instrument Mini Api | Laboratoire Bactériologie | Pendant la durée de vie de l'appareil et <b>3 ans</b> après |



## Annexe 13 : PROCEDURE DE PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE

|                           |                   |                            |     |              |
|---------------------------|-------------------|----------------------------|-----|--------------|
| Rédigé le:                | 02 /06 /2011      | Par : Quentin MASSOT       | QM  | Visa :       |
| Vérifié le:               | 03/06/2011        | Par : Judicaël OUEDRAOGO   | JO  | Visa :       |
| Approuvé le:              | 03/06/2013        | Par : Dr Bréhima TRAORE    | BT  | Visa :       |
| Modifié le:               |                   | Par :                      |     | Visa :       |
| Vérifié le :              | 03/06/2016        | Par : Judicaël OUEDRAOGO   | JO  | Visa :       |
| Approuvé le:              | 03/06/2016        | Par : Dr Madiné TALL TOURE | MTT | Visa :       |
| Mise en application :     | 03/07/2016        |                            |     | Version N° 1 |
| Date de revue :           | 03/06/2017        |                            |     |              |
| Objet de la modification: | Révision annuelle |                            |     |              |
| Archivé le :              |                   |                            |     |              |

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité  
Dossier commun sur le serveur

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P : Procédure de tri et élimination des déchets biomédicaux Réf. P10 HYG- 002 V1

MO:

D :

E :

### I – Buts

Décrire la méthode pour préparer les milieux de cultures essentiels à l'étude des bactéries.

### II. Domaines et personnels concernés

Tout le secteur de Bactériologie du laboratoire Rodolphe Mérieux. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

### III - Abréviations/Définitions

### IV. Références

### V. Contenu

# PROCEDURE DE PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE

## 1. Principe

Cette procédure doit expliquer la façon de préparer les milieux de cultures, qui sont nécessaires aux analyses de bactériologie.

## 2. Matériel

- Erlenmeyer ;
- Spatule ;
- Barreau aimanté.

## 3. Consommable

- Papier d'aluminium

## 4. Réactif

- Eau distillée
- Milieux de cultures déshydratés (voir tableau ci-dessous).

## 5. Mode Opératoire

- Stériliser d'abord un erlenmeyer de la contenance souhaitée.
- Ajuster à la quantité souhaitée l'erlenmeyer avec de l'eau distillée et ajouter le barreau aimanté.
- Peser puis insérer la poudre déshydratée du milieu désiré dans l'erlenmeyer : Le rapport quantité / poids est noté sur chaque boîte ainsi que sur le tableau ci-dessous.
- Porter le tout à ébullition sur une plaque chauffante avec l'agitateur jusqu'à ébullition

La nécessité de l'autoclavage est notée sur les boîtes et sur le tableau ci-dessous.

| Milieu                           | Quantité de poudre pour <b>300 Millilitres</b> d'eau | Quantité de poudre pour <b>1 litre</b> d'eau | Autoclavage                                 |
|----------------------------------|--|--|---|
| Bouillon Cœur / Cerveille        | 11,10 g  | 37 g   | 15 mn à 120°C                               |
| Müeller Hinton                   | 10,50 g  | 35g  | 15 mn à 121°C                               |
| Chapman                          | 33,30 g  | 111 g  | 15 mn à 120°C                               |
| UriSelect 4                      | 17,04 g  | 56,8 g                                       | 15 mn à 120°C                               |
| Drigalsky                        | 14,70 g  | 49 g   | 15 mn à 115°C                               |
| Hektoen                          | 22,50 g  | 75 g   | Non : Bain marie (45-50°C) jusqu'au coulage |
| Gélose au sang Choco (Columbia)  | 11,70 g  | 39 g   | 15 mn à 120°C                               |
| Gélose saboureau Chloramphénicol | 13,65 g  | 45,5 g                                       | 15 mn à 120°C                               |

## 6. Hygiène et sécurité

### 6.1. Evaluation des risques

|                | Indice | Degré de gravité            |
|----------------|--------|-----------------------------|
| <b>Gravité</b> | 1      | Très peu grave              |
|                | 2      | Peu grave                   |
|                | 3      | Grave                       |
|                | 4      | Très grave                  |
|                | 5      | Excessivement grave- Mortel |

| Type de risque            | Circonstances                                     | Localité                     | Risque                                     | En cause  | Gravité | Moyen(s) de prévention   |
|---------------------------|---|------------------------------|--|---|---------|--|
| Infectieux                | Stériliser la verrerie dans l'autoclave           | Salle des milieux de culture | Contamination                              | Manutention sans gants                                    | 2       | Mettre des gants lors du déplacement des objets et bien se laver les mains après.                    |
| Infectieux                | Préparation de milieu                             | Salle des milieux de culture | Contamination des milieux = résultats faux | Salle insalubre   | 2       | Nettoyer le local afin que toute contamination soit au maximum évitée                                |
| Electrique                | Onduleur dans une pièce humide et sale            | Salle des milieux de culture | Court-circuit                              | Poussière et humidité                                     | 3       | Aérer et nettoyer régulièrement  |
| Machinerie                | Panne autoclave                                   | Salle des milieux de culture | Ne pas pouvoir stériliser des matériaux    | Dysfonctionnement de l'appareil / mauvais entretien       | 3       | Bien entretenir les machines / avoir des pièces de rechange  |
| Machinerie                | Panne plaques chauffantes                         | Salle des milieux de culture | Ne plus pouvoir préparer les milieux       | Dysfonctionnement de l'appareil                           | 3       | Avoir une plaque de rechange disponible  |
| Chute d'objets / Produits | Chute d'objets lourds: casque de moto / verrerie  | Salle des milieux de culture | Blessure, casse                            | Objets cassant en hauteur, objets qui n'ont pas à être là | 3       | Mettre ailleurs les objets qui n'ont pas à être là et essayer de ranger la verrerie sur la paillasse |
| Chute d'objets / Produits | Chute des pots contenant les poudres déshydratées | Salle des milieux de culture | Blessure, casse                            | Pièce humide, étagères en mauvais état                    | 2       | Vérifier les étagères annuellement   |

## **6.2. Nettoyage de la salle**

La salle doit être aérée puis nettoyée hebdomadairement afin de garantir une atmosphère la moins chargée possible en poussières.

## **6.3. Evacuation des eaux usées**

L'évacuation des eaux usées se fait par l'évacuation au sol, situé sous le lavabo (autoclave). Il faut bien faire attention à mettre le tuyau d'évacuation, dans le trou afin d'éviter au maximum les projections d'eau et /ou inondation dans la salle

## **9. Archivage**

L'archivage de la procédure se fera lors de toute modification faite sur la préparation des milieux de culture (ajout ou retrait de milieux de la liste, arrêt des préparations, changement de méthode).

## Annexe 14 : MODE OPERATOIRE DE LA TECHNIQUE DE SOUCHOTHEQUE

|                           |                   |                            |     |              |
|---------------------------|-------------------|----------------------------|-----|--------------|
| Rédigé le:                | 22/02/2013        | Par : Nana Kadidia KEITA   | NK  | Visa :       |
| Vérifié le:               | 22/02/2013        | Par : Judicaël OUEDRAOGO   | JO  | Visa :       |
| Approuvé le:              | 22/02/2013        | Par : Dr Bréhima TRAORE    | BT  | Visa :       |
| Modifié le:               | 22/02/2016        | Par : Dr Lassina TIMBINE   | LT  | Visa :       |
| Vérifié le :              | 22/02/2017        | Par : Judicaël OUEDRAOGO   | JO  | Visa :       |
| Approuvé le:              | 25/02/2017        | Par : Dr Madiné TALL TOURE | MTT | Visa :       |
| Mise en application :     | 22/02/2016        |                            |     | Version N° 2 |
| Date de revue :           | 22/02/2018        |                            |     |              |
| Objet de la modification: | Révision annuelle |                            |     |              |
| Archivé le :              |                   |                            |     |              |

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires :       - Classeur Assurance Qualité  
                          - Dossier commun sur le serveur

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P:

MO:

D:

E:

### I – Buts

Décrire le mode opératoire de la technique de souchothèque.

### II - Domaines et personnels concernés

Le secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utilisé cette technique.

### III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

### IV – Références

### V – Contenu

# MODE OPERATOIRE DE LA TECHNIQUE DE SOUCHOTHEQUE

## 1. Principe

Le souchothèque est un moyen permettant de conserver les souches bactériennes. La température de conservation à longue durée pour les bouillons glycélinés est de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pour la conservation à température ambiante la culture se fait en gélose profonde dans des tubes à hémolyse sellés.

## 2. Matériel

- Portoir tube
- Tube à hémolyse
- Micropipettes
- Embouts
- Cryotubes
- Tubes à vis
- Marqueur
- Congélateur ( $-80^{\circ}\text{C}$ )

## 3. Réactif

- Glycérol
- Milieu Müller Hinton ou BCC ou TCS

## 4. Nature du prélèvement

Souche pure des bactéries.

## 5. Enregistrement

Cahier de souchothèque et fichier électronique.

## **6. Technique**

### **6.1. Conservation longue durée**

- Prendre un tube à hémolyse sur lequel on portera le numéro d'identification du patient et le nom de la bactérie à soucher ;
- Prendre le milieu Müller Hinton (MH) et remplir le tube à hémolyse jusqu'à moitié ;
- Prélever à l'aide d'une hanse quelques colonies isolées à partir de la purification qu'on introduira dans le MH, bien mélanger ;
- Mettre une étiquette portant le numéro de la souche correspondant aux trois 1ère lettres et chiffres du CODAT plus deux lettres de la souche plus le numéro d'ordre ; ex : W04ECO001 (1er E. coli souche en Avril 2012) ;
- Prendre soin de porter l'enregistrement dans un classeur prévu à cet effet ;
- Mesurer 800µl de la suspension déjà préparée, mélanger avec 200µl de glycérol puis agiter au vortex repartir dans les Cryotubes et conserver à -80°C.
- Préparer un bouillon de Cœur Cerveille mélanger avec du glycérol à 15% répartir le mélange dans des Cryotubes à vis.
- Prendre les colonies d'une culture pure de 24heures de la souche à conserver isolée sur MH par raclage à l'aide d'écouvillon puis plonger l'écouvillon dans le bouillon ; triturer légèrement sur les parois des Cryotubes et conserver à -80°C.
- Ensemencer en culture profonde la souche dans du MH solide en tube, celer le tube à la flamme et conserver à la température ambiante.

### **6.2. Conservation courte durée**

Elle consiste à effectuer des repiquages en milieu gélosé en tube et conservation à l'obscurité à la température ambiante.

## **7. Application des contrôles de qualité en bactériologie à partir des souches de référence**

Pour cette activité il est nécessaire de rendre les souches de référence disponibles les souches de référence.

## **8. Mise en place des évaluations externes de la qualité en bactériologie**

Pour cette activité il y a lieu de choisir des laboratoires de référence soit à Lyon ou dans autres pays où le plateau technique est plus élevé.

**NB :** deux thèmes de recherche sur les résistances bactériennes aux antibiotiques.

## **9. Gestion des déchets**

Les objets souillés sont éliminés dans la poubelle jaune (contaminant).



## **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 des actes criminels.**

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

**Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.**

**Je le jure.**