

MINISTRE DE L'EDUCATION NATIONALE,
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES DES TECHNIQUES
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO



REPUBLIQUE DU MALI

Un Peuple _ Un but _ Une foi

FACULTE DE PHARMACIE



Année Universitaire : 2019-2020

N° :/2020

**CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DE LA RESISTANCE
AUX ANTIBIOTIQUES DES SOUCHES DE *Salmonella spp*
ISOLEES CHEZ LES HUMAINS, LES ANIMAUX ET DANS
L'ENVIRONNEMENT AU LABORATOIRE RODOLPHE
MERIEUX DE BAMAKO DE JANVIER A DECEMBRE 2019**

Thèse présentée et soutenue publiquement le/...../ 2020 devant la

Faculté de Pharmacie par :

Mme SYLLA HAWA

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'Etat)

Jury

Président	:	Professeur Daouda K MINTA
Membres	:	Docteur Ibréhima GUINDO Docteur Mohamed AG BARAIKA
Co-Directeur	:	Docteur Lassina TIMBINE
Directeur	:	Professeur Ag Bourèma KOURIBA

DEDICACES

Je dédie ce travail

- **A mon père Sékou Sylla**

Quoi te dire papa ! Tu n'as ménagé aucun effort pour que ce jour puisse arriver. Dans la dignité, tu as su transmettre à tes enfants le respect, l'islam, l'amour du prochain, la simplicité, le goût de l'érudition, et le sens de l'abnégation au travail. Papa ta patience et dévouement pour la famille constituent un exemple pour tous.

Je t'aime papa, que le tout puissant **ALLAH** t'accorde une longue vie et santé pour nous. **Amen.**

- **A ma mère Assétou Doucouré**

Extraordinaire maman, les mots ne suffisent pas pour exprimer ce que tu représentes pour moi. Tu as été un des piliers très important dans ma vie et c'est grâce à toi que j'ai été la 1^{ère} à maitre pied à l'école française de toute notre lignée paternelle. Tu as été pour moi le long de mes études le plus grand symbole d'amour, de dévouement qui n'ont ni cessé ni diminuer. Ma princesse, tu m'as élevée dans le sens du bienfait, merci pour ton amour inconditionnel, je t'aime et pour toujours. Que **Dieu** t'accorde longue vie et de santé afin que je puisse à mon tour te combler.

- **A ma mère Mamou Makadji**

Mère exemplaire, que de larmes versées ! Que de souffrances ! Que de prières élevées vers les cieux ! Que de sacrifices ! Tu peux sécher tes larmes et dire Amen car Dieu t'a exhaussée. Maman tu as toujours su aimer et partager dans la discrétion. Aucun mot ne saurait traduire notre profond amour pour toi. Mère, je t'aime, que le tout puissant **Allah** te garde aussi longtemps que possible et en bonne santé pour nous **Amen**

- **A mon cher mari Cheick Tambadou**

Très cher Mari responsable, exemplaire et extraordinaire. C'est grâce à ta compréhension, ton encouragement, tes conseils, ta confiance, surtout ton soutien et tes bénédictions durant toutes ses longues années que j'ai pu en arriver ici. Malgré les contextes de notre société vis-à-vis d'une femme soniké tu m'as toujours aidée sans prendre en compte les critiques d'autrui. Tu as été et tu es pour moi un mari, un frère, un ami et un complice. Merci pour l'amour que tu as su réserver pour moi. Que le tout puissant **Allah** bénisse notre union et qu'il nous donne ce qu'on a tant souhaité **Amen.**

- **A mes enfants Kadidiatou et Mohamed (les jumeaux) et Aïcha**

Mes trésors, vous êtes les plus beaux cadeaux que **Dieu** m'a donnée en 1^{ère} année de pharmacie et vous m'avez apportée beaucoup de chance jusqu'à maintenant. Vous avez passé des nuits sans chaleur maternelle, vous avez partagé ma peine. Puisse ce travail vous consoler et vous inspirer dans la réussite de votre vie. Qu'**Allah** vous donne une longue vie pleine de bonheur.

- **A mes frères et sœurs (Mariam, Matougouné, Sogona, Hata, Abdoulaye, Assan, Maman jolie, Coumba, Ibrahim, Ami, Mahamoud et Djibril)**

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. Que **Dieu** puisse nous accorder longue vie, santé et beaucoup de succès. **Amen**

- **A mon grand-père feu Djibril Doucouré**

Ta mort ma vraiment touché, le temps nous a manqué pour que tu puisses voir ce jour si important pour nous tous. Mais je vais retenir de toi une phrase « Dans la vie fait ce que tu aimes, rien n'est impossible et reste toujours courageuse ». Mon chéri tu resteras toujours gravé dans mon cœur. Que la terre te soit légère, que **Dieu** t'accepte dans son paradis. **Amen**

Mention spéciale

- **A mon cher pays le Mali**
- **A tout le corps professoral de la Faculté de Pharmacie (FAPH), de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS), a tous mes enseignants de l'école fondamentale de Daoudabougou et du lycée Michel Allaire de Daoudabougou, particulièrement à M. Harouna Sangaré et M. Sadio Traoré**

Chers maîtres votre métier ne sera jamais rémunéré à sa juste valeur, car le don de partager du savoir est une richesse innée qui n'a juste pas de prix, alors merci pour votre abnégation, vos conseils et la bonne formation que nous avons reçue de vous.

- **Au Centre d'Infectiologie Charles Mérieux**

Pour le soutien technique dont nous avons bénéficié pour la réalisation de ce travail.

- **A M. Judicaël Ouédraogo**

Pour votre soutien technique, votre gentillesse et votre disponibilité. Accepter ici l'expression de notre sincère reconnaissance.

- **A Docteur Lassina Gadi Timbiné**

Votre simplicité (celle des grands), votre humanisme, votre gentillesse et votre sens de partage sorte hors du commun. J'admire en vous la cordialité, la disponibilité, mais aussi et surtout la compétence. Ce travail est le fruit de votre soutien et de vos multitudes conseils. Merci infiniment et trouvez ici notre sincère reconnaissance. Qu'Allah vous préserve et vous prête longue vie au service de tous.

- **Au Prof Kouriba**

Merci de nous avoir acceptée dans votre service à bras ouverts et de tout l'effort que vous avez fourni pour le bon déroulement de ce travail. Votre simplicité, votre disponibilité, votre rigueur dans le bon travail, votre qualité scientifique font de vous un enseignant de qualité appréciée non seulement par vos élèves et étudiants mais aussi par vos pairs. Cher maître que Dieu vous prête encore longue vie au service de tous.

REMERCIEMENT

- **A Dieu le tout puissant ALLAH**

L'Unique, le Parfait, le Sage, l'Omnipotent, l'Omniprésent, le Miséricordieux par qui et pour qui nous sommes et en qui nous serons.

Merci infiniment de m'avoir donnée la vie, la santé, le bonheur, et de me guider sur le bon chemin. C'est par votre grâce que suis arrivée à ce niveau aujourd'hui.

- **Au Prophète Mohamed Rasouloulah (paix et bénédictions sur lui)**

Tu es le Prophète le plus sollicité, le plus aimé,

Recours sera vers toi quand toute l'humanité sera face aux dures épreuves. Reçois ma reconnaissance pour l'Islam, prophète béni. Nous te témoignons notre respect et notre gratitude pour tout ce que tu as fait pour le bien de l'humanité. Sauve-moi le jour où toutes les âmes seront affaiblies. Gloire à toi, le serviteur d'**Allah** et des autres créatures

- **A la famille Sylla, Makadji et Doucouré (mes grands-pères, grand-mères, oncles, tantes, frères et sœurs)**

Que ce travail soit le gage de mon amour et de mon affection indéfectible, qu'il puisse vous encourager à vous entraider les uns et 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. Je n'oublierais jamais tout l'amour, l'affection, et les conseils que vous m'avez réservés et je compte toujours sur vous. Ce travail est aussi le vôtre. Recevez mes sincères remerciements.

- **A ma belle-mère Kadidiatou Diagouraga**

Maman je suis fière d'être ta belle fille et merci pour ton amour, ton soutien et tes bénédictions. Je t'aime, que le tout puissant **Allah** te garde aussi longtemps que possible et en bonne santé pour nous. **Amen**

- **A la famille Tambadou**

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

- **A mes chères amies (Oumou Diarra, Coumba Sangaré, Abibah Diakité)**

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. Merci et Qu'**Allah** renforce notre union et qu'il face de nous des bons médecins et pharmaciennes pour la nation.

- **A mes amis (es) et camarades d'étude : Mamadou Sidibé, Aguibou Diallo, Mamadou Togola, Moussa Bah, Seydou Zié, Féno D, B Diombera, Mariam B, Marie O T, Cristine O, Bakaina D, Koumba D, Diata D**

Que Dieu vous paie le soutien constant durant notre formation. Recevez mes sincères reconnaissances et remerciements.

- **A la famille Tessouké au village de point G**

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

- **Au personnels et stagiaires du CICM**

Votre disponibilité, votre amour du travail bien fait, votre esprit scientifique, votre compétence, votre simplicité, m'ont émerveillé durant mon séjour au laboratoire. Je vous suis très reconnaissant pour les connaissances que patiemment et avec dévouement vous m'avez transmise. Merci pour vos contributions à la réalisation de ce travail.

- **A la pharmacie Carrefour de Magnabougou et pharmacie Garalo**

Acceptez avec plaisir mes remerciements les plus sincères pour tout ce que j'ai appris avec vous, et aussi pour vos encouragements interminables.

- **A la 11^{ème} promotion du numerus clausus (promotion feu Moussa Arama) et tous les étudiants de la FAPH et FMOS**

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

HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et Président du jury,

Professeur Daouda K MINTA

Maitre de conférences agrégé de Maladies Infectieuses et Tropicales

- + Directeur du centre d'excellence de lutte contre le VIH**
- + Chargé de cours de parasitologie et de thérapeutique à la FMOS**
- + Chercheur au DEAP/MRTC/FMOS-Mali Vice-président de la Société Africaine de Pathologies Infectieuses.**

Cher Maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples occupations. Nous avons admiré vos qualités scientifiques, pédagogiques et humaines tout au long de notre formation.

Veillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

A notre Maître et Juge,

Docteur Ibréhima GUINDO

✚ **Pharmacien Microbiologiste,**

✚ **Chef de département laboratoire et de recherche biomédicale à l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP),**

✚ **Maître-Assistant en Bactériologie -Virologie à la Faculté de Pharmacie.**

Cher Maître,

Merci d'avoir accepté de juger ce travail malgré votre agenda chargé. Vos qualités humaines, scientifiques et pédagogiques font de vous un Maître exemplaire.

Merci pour votre abnégation.

A notre Maître et Juge,

Docteur Mohamed AG BARAIKA

✚ **Pharmacien Microbiologiste,**

✚ **Maître-Assistant en Bactériologie -Virologie à la Faculté de Pharmacie,**

✚ **Enseignant-chercheur au Centre de Recherche et de Lutte contre la Drépanocytose (CRLD).**

Cher Maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail. Nous avons été impressionnés par votre abord facile, votre sympathie mais surtout votre pédagogie.

Recevez cher Maître notre profonde gratitude.

A notre Maître et Co-directeur de thèse,

Docteur Lassina Gadi TIMBINE

 **Pharmacien Microbiologiste,**

 **Directeur du Laboratoire Rodolphe MERIEUX (LRM),**

 **Chercheur au Centre d'Infectiologie Charles MERIEUX (CICM).**

Cher Maître,

Merci de nous avoir accueillis dans votre laboratoire les bras ouverts, vous avez minutieusement suivi ce travail du début jusqu'à la fin. Votre disponibilité, votre générosité, votre rigueur scientifique ont forcé notre admiration.

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

**A notre Maître et Directeur de thèse,
Professeur Agrégé Bourèma KOURIBA**

- ✚ Maître de Conférences Agrégé en Immunologie à la Faculté de Pharmacie,**
- ✚ Chef de l'Unité d'Immunologie Cellulaire et Moléculaire du MRTC/DEAP,**
- ✚ Directeur Général du Centre d'Infectiologie Charles MERIEUX (CICM).**

Cher Maître,

Nous vous remercions d'avoir accepté de diriger ce travail. Nous avons été séduits par votre pédagogie, votre esprit critique et nous sommes fiers de l'enseignement de qualité que vous nous avez donné.

Puisse Dieu vous donner une longue vie.

SIGLES ET ABREVIATIONS

- = Négative

+ = Positive

ADN = Acide désoxyribonucléique

Ag H = Antigène flagellaire

Ag O = Antigène somatique

AKN = Amikacine

AMC = Amoxicilline + Acide clavulanique

AMX = Amoxicilline

Api 20E = Index des profils analytiques des 20 caractères des entérobactéries

ATB = Antibiogramme

BAI = Bureau of animal industry

BAMS = Bachelor de biologie médicale appliquée

CA-SFM = Comité d'antibiogramme de la société française de microbiologie

CAZ = Ceftazidime

CICM = Centre infectiologie Charle Mérieux

CIP = Ciprofloxacine

CTX = Cefotaxime

DCLS = Desoxycholate citrate lactose saccharose

F T = Fièvre typhoïde

FOX = Cefoxitine

FSF = Fosfomycine

FTN = Nitrofurantoin

GME = Gentamicine

H₂S = Sulfure d'hydrogène

H = Hektoen

IMP = Imipenème

KCN = Cyanure de potassium

LPS = Lipopolysaccharide

LRM = Laboratoire Rodolphe Mérieux

MLS = Macrolide lincosamide streptogramine

NAL = Acide nalidixique

NBG = Novobiocine vert brillant glucosé

OMS = Organisation Mondiale de la Santé

ONPG = Orthonitrophényl- β -galactoside

pH = Potentiel d'hydrogène

PLP = Protéine liant les polypeptides

R = Resistance

RAM ou **AMR** = Resistance aux antimicrobien

S. Typhi = *Salmonella enterica* sous espèce enterica serovar Typhi

S. Typhimirium = *Salmonella enterica* sous espèce enterica serovar Typhimirium

SS = *Salmonella -Shigella*

SXT = Sulfamethoxazole-trimetoprim

TIAC = Toxi-infection alimentaire collective

TIC = Ticarcilline

TMN = Tobramycine

Vi PSC = Virulence avec polysaccharide capsulaire

XLT4 = Xylose lysine terbitol '4

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Entérobactéries colonisant habituellement l'homme et responsables d'infections (16).	9
Tableau II: Formules antigéniques des sérotypes de <i>salmonella</i> les plus fréquents (31).....	18
Tableau III: Les six sous-espèces de l'espèce <i>Salmonella enterica</i> peuvent également être identifiées par leurs caractères biochimiques (31).	20
Tableau IV : Aspects des colonies et caractéristiques des milieux utilisés pour isolement de <i>Salmonella</i> (12).	23
Tableau V: Classification des antibiotiques selon leurs sites d'action	30
Tableau VI : Fréquence d'isolement des souches de <i>Salmonella</i> selon leur origine de prélèvement.	56
Tableau VII : Fréquence d'isolement des souches de <i>Salmonella</i> selon les types de prélèvement humains.	57
Tableau VIII : Fréquence d'isolement des souches de <i>Salmonella</i> selon les types de prélèvement d'animaux.....	58
Tableau IX : Fréquence d'isolement des souches de <i>Salmonella</i> dans l'environnement.	59
Tableau X : Fréquence de la résistance aux antibiotiques des 25 souches isolées chez les humains.	60
Tableau XI : Fréquence de la résistance aux antibiotiques des 8 de <i>Salmonella</i> souches isolées chez les animaux.	61
Tableau XII: Fréquence de la résistance aux antibiotiques des 4 de <i>Salmonella</i> souches isolées dans l'environnement.	62

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure antigénique de la paroi des Enterobacteriaceae (12)	7
Figure 2: Coupe de Salmonelle (26).	15
Figure 3: <i>Salmonella</i> Typhimurium, en rouge, sur une culture de cellules humaines observée au microscope électronique [29].	16
Figure 4 : <i>Salmonella</i> Typhi en microscope optique [30].	16
Figure 5 : Colonies noires bactériennes de l'espèce <i>Salmonella</i> sur gélose <i>Salmonella-Shigella</i> (gélose SS) (32).	24
Figure 6 : Les colonies de <i>salmonella</i> sur la gélose Hektoen (32).	24
Figure 7 : Sites et modes d'action des différentes classes d'antibiotiques	29
Figure 8 : Mécanisme de dissémination des plasmides	34
Figure 9 : Image des pots contenant des selles des patients.....	39
Figure 10 : Les colonies de <i>salmonella</i> sur Hektoen (à gauche) et sur Uriselect4 (à droite) isolées à partir des selles au LRM (photo prise le 15/07/2019)	42
Figure 11 : Caractères biochimiques de <i>Salmonella</i> isolée dans les prélèvements de mouche (Révéls à l'aide de la galerie Api 20 ^E).....	43
Figure 12 : Automate mini Api pour la lecture de galerie (Photo prise au LRM le 04/10/2019).	43
Figure 13 : Automate VITEK 2 Compact (photo prise au LRM le 04/10/2019).....	45
Figure 14 : Antibiogramme d'un échantillon de mouche écrasé au LRM (photo prise le 16/10/2019)	48
Figure 15 : Méthodologie de travail de notre étude	48
Figure 16 : Prélèvement d'intestin de poisson (gauche) et des fientes de volaille.....	51
Figure 17 : Prélèvement des mouches (à gauche) et des intestins de poulet (à droite) au marché de Dabanani.	51
Figure 18 : Prélèvement d'eau de puits à Bolibana (photos présent le 21/08/2019)	51
Figure 19 : Prélèvement des eaux du fleuve Niger	52
Figure 20 : Prélèvement d'eau de canalisation de l'hôpital de point G (à gauche) et d'eau de canalisation d'abattoir de Sabalibougou koura (à droite).....	52
Figure 21 : Prélèvement des sols contaminé par les déchets humain au centre émetteur de Kati	52

Figure 22 : Prélèvement des sols de champs à sébénicoro et du jardin potager à woyowayanko2
.....53

Figure 23 : La fréquence des souches de *Salmonella* isolées chez l’homme par rapport au sexe.56

Figure 24 : Répartition des souches de *Salmonella* isolées selon les tranches d’âge des patients.
.....57

Figure 25 : Fréquence d’isolement de *Salmonella* chez les patients selon le mois.....58

Figure 26 : Répartition des taux de résistance des souches de *Salmonella* aux antibiotiques testés isolées dans les trois secteurs.63

Figure 27 : Fréquence des souches multi résistantes isolées selon leurs origines de prélèvement
.....63

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	2
2. OBJECTIFS	4
2.1. Objectif général.....	5
2.2. Objectifs spécifiques :.....	5
3. GENERALITES :	7
3.1. Bactéries.....	7
3.2. Les entérobactéries :	7
3.3. <i>Salmonella</i>	10
3.3.1. Définition	10
3.3.4. Habitat.....	13
3.3.5. Pouvoir pathogène :	13
3.3.6. Virulence :.....	14
3.3.7. Caractères bactériologiques :	15
3.3.6. Diagnostic biologique :	24
3.4. LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DES SALMONELLES :	28
3.4.1. Définition d'un antibiotique :	28
3.4.2. Sites et modes d'action des antibiotiques :	28
3.4.3. Classification des antibiotiques :	29
3.4.4. Définition de la résistance bactérienne aux antibiotiques :	31
3.4.5. Types de résistance	31
3.4.6. Principaux mécanismes de la résistance des bactéries aux antibiotiques	31
3.5. DISSEMINATION DES DETERMINANTS GENETIQUES DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES :	32
3.5.1. Chromosome :	32
3.5.2. Plasmides	32
4. Méthodologie	36
4.1. Cadre de l'étude	37
4.2. Type d'étude et Période d'étude	38
4.3. Population d'étude	38
4.3.1. Critère d'inclusion	38

4.3.2. Critère de non-inclusion.....	38
4.4. Echantillonnage	38
4.5. Collecte des données.....	38
4.6. Méthodes bactériologiques	39
4.6.1. Recherche des souches de <i>Salmonella</i> spp d'origine humaine.....	39
4.6.1.1.1. Prélèvement.....	39
4.6.1.1.2. Examen macroscopique.....	39
4.6.1.1.3. Examen microscopique	40
4.6.1.1.4. Culture.....	41
4.6.1.1.5. Isolement et purification des souches.....	41
4.6.1.1.6. Identification	42
□ La lecture turbinéphéléométrique	43
4.6.1.1.7. Test de sensibilité aux antibiotiques par la méthode de diffusion sur disques d'antibiotiques.....	47
4.7. Variables étudiées	53
4.8. Aspect bioéthique :	54
4.9. Analyses et traitement des données	54
5. RESULTATS.....	55
5.1. Résultats globaux :.....	56
5.2. Résultats descriptifs dans les prélèvements humains	56
5.2.1. Répartition des 25 souches de <i>salmonella</i> isolées chez l'homme	56
5.2.2. Répartition des 8 souches de <i>Salmonella</i> isolées chez les animaux	58
5.2.3. Répartition des 4 souches de <i>Salmonella</i> isolées dans l'environnement	59
5.3. Profils de résistance des souches aux principales familles d'antibiotiques testés	60
5.3.1. Profils de résistance aux antibiotiques testés sur les 25 souches isolées chez les humains..	60
5.3.2. Profit de résistance aux antibiotiques testés sur les 8 souches de <i>Salmonella</i> isolées chez les animaux.....	61
La résistance les plus élevées ont été observées pour la co-trimoxazole (75%), l'acide nalidixique (50%), la ciprofloxacine (50%) et la norfloxacine (50%).	61
5.3.3. Profit de résistance aux antibiotiques testés sur les 4 souches de <i>Salmonella</i> isolées dans l'environnement	62

5.4. Souches multi résistantes	62
5.5. Résultats comparatifs de la résistance des souches de <i>Salmonella</i> isolées aux antibiotiques testés selon les trois secteurs	63
6. Discussion	64
6.1. Méthodologie	65
6.2. Fréquence	65
6.2.1. Données épidémiologiques des souches de <i>Salmonella</i> isolées chez l'Homme.....	65
6.2.2. Isolement de <i>Salmonella</i> chez les animaux	65
6.2.3. Isolement de <i>Salmonella</i> dans l'environnement	66
6.2.4. Isolement de <i>Salmonella</i> selon leurs origines.....	66
6.3. Résistance aux antibiotiques des souches bactériennes isolées de notre étude	66
7. Conclusion et recommandations	68
1. Principe.....	81
2. Mode opératoire	81
3. Résultats	83
4. Gestion des déchets	83
1.1. La lecture turbidimétrique.....	85
1.2. La lecture colorimétrique	85
2. Mise en route	86
3. Procédure d'utilisation	86
3.1. Description du logiciel	86
3.1. Réalisation d'un test	87
4. Arrêt du Mini Api.....	88
5. Gestion des documents.....	88
1. Principe.....	90
2. Matériel	90
3. Consommable.....	90
4. Réactif	90
6. Contrôle de qualité	91
7. Technique	91
8. Résultat.....	91

Principe.....	93
Matériel.	93
Condition de stockage	94
Nature de l'échantillon	94
Contrôle de qualité	94
Réalisation du test	94
Résultat.....	95
MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE DES URINES	97
1. Principe.....	97
2. Matériel	97
3. Consommables	97
5. Etape pré analytique	98
6. Analytique	98
7. Post analytique	108
1. But....	110
2. Principe.....	110
4. Consommable.....	111
6.1. Enregistrement	111
7. Etape analytique	111
7.2. Incubation.....	113
7.3. Lecture.....	113
7.4. Antibiogramme.....	113
7.6. Validation technique/ Critères de repasse	114
8. Etape post analytique	114
8.1. Validation biologique.....	114
8.3. Gestion des déchets	114
8.4. Archivage	115
MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN	116
1. Principe.....	116
3. Consommables	117
5. Etape pré analytique	117

5.2. Localisation	117
6. Etape analytique	118
6.1. Protocole de l'analyse	118
6.2. Validation technique/ Critères de repasse	120
7. Etape post analytique	121
1.2 7.1. Validation biologique	121
7.3. Gestion des déchets	121
7.4. Archivage des données	121

1. INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

Salmonella spp sont des bactéries pathogènes à Gram négatif, en forme de bâtonnet, mobiles appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. *Salmonella enterica* sérovar Typhi (*S. Typhi*) est responsable de la fièvre typhoïde chez l'homme, avec une charge mondiale annuelle d'environ 16 millions de cas, entraînant 600 000 décès (1). Les salmonelloses sont les principales causes des toxi-infections alimentaires collectives chez l'homme. On estime à 93,8 millions cas de gastro-entérites dues aux salmonelles (2). Les Salmonelles sont des bactéries qui sont largement répandues à travers le monde. Elles sont en général considérées comme pathogènes bien que leur virulence et leur pouvoir pathogène varient énormément (3). La fièvre typhoïde (FT) reste encore aujourd'hui un problème majeur de santé publique dans les pays en voie de développement contrairement aux pays industrialisés. Ainsi, dans les pays en développement on note 150 à 1000 cas par an pour 100 000 habitants. En 2002 par exemple, elle a été la cause d'hospitalisation de 408837 cas en Afrique (4). Les salmonelles qui peuvent être transmises des animaux domestiques à l'homme provoquent une gastro-entérite et constituent un problème sérieux pour l'industrie alimentaire. Les salmonelles peuvent provoquer une gastro-entérite, une fièvre typhoïde, un avortement et une bactériémie, selon le sérovar et l'hôte. (1). La fièvre typhoïde et paratyphoïde continue d'être une cause importante de morbidité et de mortalité, en particulier chez les enfants et les adolescents du centre-sud et de l'Asie du Sud-est, où la fièvre entérique est associée à un mauvais assainissement et à des aliments et de l'eau insalubres (5). Il est communément admis que les animaux peuvent être des réservoirs de bactéries pathogènes pour l'homme et résistantes aux antibiotiques. Les voies de contamination de l'homme à partir des animaux par contact direct ou via la chaîne alimentaire sont assez bien documentées. Les effluents hospitaliers peuvent constituer plusieurs sources de rejet d'éléments pathogènes de l'hôpital. Les effluents domestiques sont constitués des eaux grises et des eaux « vannes » (6). Les hôtes naturels de *Salmonella* sont la population humaine, le bétail, les animaux domestiques, ainsi que les animaux sauvages, y compris les oiseaux. Dans la mesure où l'eau est un vecteur d'infection reconnu, les Salmonelles peuvent être présentes dans les eaux usées agricoles et domestiques, les eaux douces, y compris les eaux destinées à la consommation humaine et les eaux souterraines, ainsi que dans les eaux de mer (3). Le recyclage en agriculture de produits résiduels organiques comme amendement des sols peut conduire à une contamination des sols par les *Salmonella*. Par ailleurs, les sols pourraient être la source de nouvelles propriétés de virulence et de résistance aux antibiotiques.

Ainsi, l'utilisation d'antibiotiques en agriculture, aquaculture et horticulture exerce une pression de sélection susceptible d'induire des résistances chez les bactéries pathogènes (7). Sur le plan international, on s'inquiète de plus en plus de la résistance aux antimicrobiens, 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 d'ici 2050. Malgré la menace que représente par l'RAM, l'OMS et le récent rapport O'Neill décrivent des lacunes importantes dans la surveillance, la méthodologie standard et le partage de données. Le rapport 2014 de l'OMS a identifié l'Afrique est une région sans système de surveillance RAM. Ce manque de données de qualité est problématique, conduisant souvent à des directives de traitement qui ne sont pas adaptées à la situation locale (8).

Les résultats d'une étude réalisée au Sénégal sur la viande de poulet de chair ont montré que sur 93 souches de *Salmonella spp* isolée et analysées quant à leur résistance à 16 antibiotiques, 79,56% souches ont été résistantes à un antibiotique ou plus, 15 sérotypes multi résistants (entre 2 et 5 antibiotiques) ont été identifiés (9). Au Mali, selon une étude réalisée au LRM en 2017 a montré que sur 54 souches de *Salmonella* isolées, 31,91% étaient résistant à l'acide nalidixique, 20,98% à la tobramycine, 18,51% à l'amoxicilline et 13,20% au co-trimoxazole (2). Au Mali, à l'instar des autres pays d'Afrique les études sur la résistance aux antibiotiques du genre *Salmonella* sont peu documentées surtout celles rapportant sur la relation de cette résistance entre les humains, les animaux et l'environnement. Pour combler cette insuffisance, nous avons entrepris ce présent travail sur la caractérisation des souches de *Salmonella* multi résistante isolées chez les humains, les animaux et dans l'environnement.

2.OBJECTIFS

2.1. Objectif général

Etudier les phénotypes de résistances aux antibiotiques des souches de *Salmonella spp* isolées chez les humains, les animaux et dans l'environnement au Laboratoire Rodolphe Mérieux.

2.2. Objectifs spécifiques :

- 1) Déterminer la fréquence d'isolement des souches de *Salmonella spp* isolées chez les humains, les animaux et dans l'environnement au Laboratoire Rodolphe Mérieux.
- 2) Déterminer le profil de résistance aux antibiotiques des souches de *Salmonella* isolées chez les humains, les animaux et dans l'environnement au Laboratoire Rodolphe Mérieux.
- 3) Comparer les souches de *Salmonella* multi résistante issus des trois secteurs.

3. GENERALITES

3. GENERALITES :

3.1. Bactéries :

Micro-organisme unicellulaire le plus souvent dépourvu de chlorophylle, visible seulement au microscope, se reproduisant par scissiparité et dont les deux principales formes sont les microcoques et les bacilles qui vivent dans tous les types d'habitats connus (10).

3.2. Les entérobactéries :

Ce sont Bacilles Gram (-), de dimension moyenne (coccobacille, souvent polymorphe), Oxydase négative, catalase positive (rares exceptions), non exigeants (culture facile), immobiles ou mobiles par ciliature péritriche (très rares exceptions : *Plesiomonas*, ciliature polaire), fermente le glucose (avec ou sans production de gaz), aéro-anaérobies facultatifs (capables de pousser en présence ou en absence de dioxygène), nitrate réductase (+) (capables de réduire les nitrates en nitrites), non sporulés et certains sont thermo dépendants et ne poussent pas à 37°C tels que *Hafnia alvei*, *Yersinia enterocolitica*... (11).

Structure :

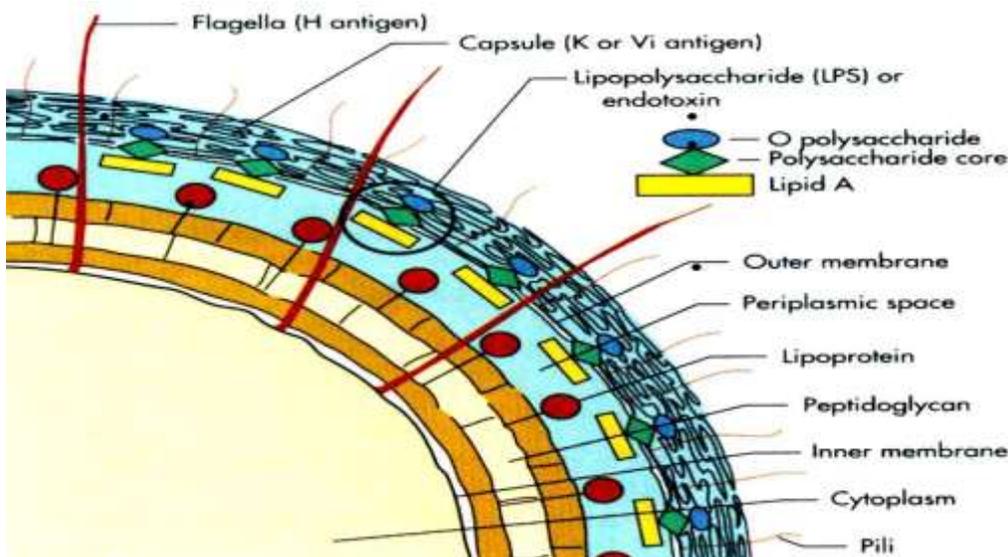


Figure 1: Structure antigénique de la paroi des Enterobacteriaceae (12).

La naissance de la famille des entérobactéries se situe dans les années 1937 lorsque Otto Rahn proposa le genre *entérobacter* pour regrouper des micro-organismes présentant des propriétés biochimiques et morphologiques communes et parmi lesquelles on trouvait déjà des noms tels que *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, ou *Shigella* (12).

Les entérobactéries sont une famille très hétérogène pour ce qui est de leur pathogénie et de leur écologie. Les espèces qui composent cette famille sont en effet soit parasites (*Shigella*, *Yersinia pestis*), soit commensales (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella sp*), soit encore saprophytes (*Serratia sp*, *Enterobacter sp*) (13). Cette famille est hétérogène car elle se compose d'environ 30 genres de bactéries et de plus de 100 espèces. Cependant, tous ces germes ont en commun leur localisation préférentielle au niveau du système digestif. Certains faisant d'ailleurs partie de la flore normale bien qu'ils soient également présents dans l'environnement. Les entérobactéries constituent plus de 80% des germes isolés en laboratoire : *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella* et *Yersinia* sont les bâtonnets les plus souvent retrouvés. Les entérobactéries sont largement retrouvées sur les plantes et dans le sol, l'eau et le tube digestif de l'homme et des animaux d'où leur nom. Ce caractère ubiquitaire n'est cependant pas général puis que quelques espèces occupent des niches écologiques précises. Par exemple, *salmonella typhi* responsable de la fièvre typhoïde, n'est retrouvée que chez l'homme (12).

Les entérobactéries sont responsables de deux grands types de manifestations pathologiques : pathologie spécifique telle la fièvre typhoïde avec *Salmonella Typhi* ou d'une pathologie opportuniste notamment dans le cadre d'infections nosocomiales. Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent aux genres *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *yersinia*. D'autres genres peuvent être isolés rarement ou exceptionnellement chez l'homme: *Cedencea*, *Ewingella*, *Erwinia*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Pantoea*, *Rahnella*, *Tatumella*, *Yokenella* (14).

Tableau I: Entérobactéries colonisant habituellement l'homme et responsables d'infections (16).

<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> (groupe A)
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Klebsiella ozaenae</i>	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Morganella morganii</i> subsp.	<i>Shigella flexneri</i> (groupe B)
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>morganii</i>	<i>Shigella boydii</i> (groupe C)
Groupe <i>Enterobacter</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Shigella sonnei</i> (groupe D)
<i>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>Yersinia</i> subsp. <i>enterocolitica</i>
<i>Enterobacter amnigenus</i>	<i>Providencia stuartii</i>	<i>Yersinia intermedia</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Salmonella</i> , tous les sérotypes	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
(<i>cancerogenous</i>) <i>taylorae</i>		
<i>Escherichia coli</i>		

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'enzyme (15).

Les entérobactéries ont une résistance naturelle aux antibiotiques suivants : pénicilline G, oxacilline, MLS, acide fusidique, glycopeptides, oxazolidinones. Les entérobactéries ont une sensibilité naturelle aux antibiotiques suivants: β -lactamines, aminosides, quinolones, sulfamides, tétracyclines, chloramphénicol, colistine et fosfomycine (16). Depuis le début des années 60, nous assistons à une augmentation du nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques, surtout en milieu hospitalier, et à l'émergence de nouvelles résistances. Il s'agit d'un problème de santé publique extrêmement préoccupant, dont aucun pays du monde n'est épargné, bien que les souches résistantes soient souvent différentes d'un pays à l'autre(17).

3.3. *Salmonella*

3.3.1. Définition

Les salmonelles possèdent les caractères de définition des entérobactéries, présent dans l'intestin animal et humain, dont le pouvoir pathogène spécifique (typhoïde), ou non spécifique (infections digestives). Elles provoquent chez l'espèce humaine des maladies telles que la fièvre typhoïde, la fièvre paratyphoïde appelé salmonellose majeure ; elle aussi une des principales causes de toxoinfection alimentaire collective (TIAC) appelé salmonellose mineure.

3.3.2. Historique

La fièvre typhoïde, la plus grave des salmonelloses humaines, a constitué un modèle dans l'étude des maladies infectieuses. En 1813 par Petit et Serres, Bretonneau, elle fut individualisée avant l'ère bactériologique sur la base des signes cliniques et des lésions ulcéreuses de l'intestin(2). En 1820, cette maladie a été décrite par Bretonneau qui l'appelait dothiéntherie (18). En 1868, Pettenkoffer 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. En 1884, Gaffky réalise la première culture du bacille (*Salmonella* Typhi) et le genre est découvert par Théobald SMITH. 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(2). En 1900, le nom de *Salmonella* a été donné par Lignières à ce groupe bactérien. Ce nom fut choisi en l'honneur de Daniel Elmer Salmon vétérinaire américain dont la contribution à l'étude de ses bactéries fut majeure(18). En 1918, l'étude séparée des antigènes somatiques O, flagellaires H, et de capsulaire (Vi) date des travaux de Weil, Félix, et Mitzemacher(2). En 1930, Kaufman et White proposent une classification des bactéries basée sur les caractères antigéniques O et H. En 1935, Reilly, montre le rôle du système nerveux neurovégétatif dans la pathogénie de la fièvre typhoïde. En 1947, découverte du Chloramphénicol (à partir de *Streptomyces venezuelae*) par Waksman et ses applications thérapeutiques dans les Salmonelloses (18).

3.3.3. Taxonomie et Nomenclature

Les salmonelles ont été nommées ainsi en l'honneur du vétérinaire américain Daniel Elmer Salmon (1850-1914) même si l'homme qui a découvert le genre était Théobald Smith, qui travailla sous la direction de Salmon au Bureau of Animal Industry (BAI) dès 1884.

D'après les travaux récents de taxonomie, en particulier par hybridation de l'ADN, le genre *Salmonella* comporte deux espèces (*bongori* et *enterica*), la principale (longtemps considérée comme la seule), *Salmonella enterica* comprend six sous-espèces, dont la plus fréquente est *Salmonella enterica* subspecies *enterica*, elles-mêmes divisées en de nombreux sérovars: Enteritidis, Derby, Hadar, Infantis, Paratyphi, Typhi, Typhimurium, Virchow, etc. Actuellement plus de 2 600 sérovars (ou sérotypes) sont décrits (19). Les hybridations ADN-ADN ont démontré que toutes les souches de salmonelles appartenaient à deux espèces : *Salmonella enterica* ou *Salmonella choleraesuis* (la plus fréquente), *Salmonella bongori* (très rare). *Salmonella enterica* subspecies *Enterica* présente 99% des souches de *Salmonella* isolées chez l'homme. L'espèce *Salmonella enterica* est subdivisée en six sous-espèces :

I, *Salmonella enterica* subspecies **enterica**.

II, *Salmonella enterica* subspecies **salamae**.

IIIa, *Salmonella enterica* subspecies **arizonae**.

IIIb, *Salmonella enterica* subspecies **diarizonae**.

V, *Salmonella enterica* subspecies **houtenae**.

VI, *Salmonella enterica* subspecies **indica**.

Chacune de ces sous-espèces se divise en sérotypes (ou sérovars) définis par les antigènes O (LPS), H (flagelle) et Vi (capsule). Les sérotypes les plus anciens désignés par la nature de leur pouvoir pathogène (exemples: *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Enteritidis etc.), les sérotypes les plus récemment reconnus sont désignés par le nom du lieu géographique où ils ont été isolés (exemples: *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Panama, *Salmonella* Wien etc la sous-espèce *Salmonella enterica* subspecies *enterica* représente la très grande majorité des souches isolées chez l'homme et les animaux à sang chaud; les autres sous-espèces étant rencontrées principalement chez les animaux à sang froid. Au sein de cette sous-espèce plus de 1400 sérovars sont individualisés. Quatre de ces sérovars correspondent au *Salmonelles* dites « majeurs »

strictement humains (Typhi, Paratyphi A, et Paratyphi C) responsables des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes. Les autres sont d'origine animale, pouvant se retrouver dans la flore digestive de l'homme en portage asymptomatique ou être responsables de diarrhées bénignes en l'absence de facteur prédisposant à l'infection systémique (immunodépression, drépanocytose, etc.). La plupart de ces sérovars «mineurs» sont désignés par des noms géographiques (Wien, Dublin, etc.)(14).

Au sein de 2 espèces, *Salmonella bongori* et *Salmonella enterica*, on a identifié jusqu'à présent plus de 2500 sérotypes ou sérovars différents. Ce sont des bactéries omniprésentes et résistantes, qui peuvent survivre pendant plusieurs semaines dans un environnement sec et plusieurs mois dans l'eau. Bien que tous les sérotypes puissent être pathogènes pour l'être humain, quelques-uns d'entre eux sont spécifiques et adaptés à une seule ou à quelques espèces animales seulement, par exemple *Salmonella enterica* sérotype Dublin chez les bovins et *Salmonella enterica* sérotype Cholerasuis chez le porc. Lorsque ces sérotypes particuliers provoquent une affection chez l'être humain, elle prend souvent un caractère invasif et peut mettre la vie du sujet en danger. On retrouve cependant la plupart des sérotypes dans une grande variété d'hôtes. En général, ces sérotypes provoquent des gastro-entérites le plus souvent sans complications et ne nécessitant aucun traitement, mais la maladie peut être grave chez les plus jeunes, les personnes âgées et les patients dont les défenses immunitaires sont affaiblies. On trouve dans ce groupe *Salmonella enterica* sérotype Enteritidis et *Salmonella enterica* sérotype Typhimurium, les 2 principaux sérotypes de salmonellose transmise de l'animal à l'homme dans la plupart des régions du monde (20). A l'exception de quelques sérovars ayant acquis une spécificité d'espèce, il faut considérer tous les sérovars comme potentiellement dangereux. Les salmonelloses sont classées en deux catégories : -les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes dues à des sérovars strictement humains, *S. Typhi*, Paratyphi A. -les toxi-infections alimentaires et gastro-entérites du nourrisson, dues à des sérovars ubiquitaires, donc pouvant transiter chez l'homme et l'animal. Les aliments incriminés sont les viandes et les produits camés, volailles et produits dérivés, œufs et ovo produits(9). Afin de simplifier la dénomination des sérovars de Salmonelle, il est usuel de juxtaposer le nom du sérovar à celui du genre *Salmonella*. Nous dirons donc «*Salmonella Typhi*» pour «*Salmonella enterica* subspecies Enterica sérovar Typhi»(14).

3.3.4. Habitat

L'habitat naturel des espèces se trouve normalement dans les intestins de tout type d'animal homéotherme (y compris les humains) (21). Quelques sérovars sont spécifiquement humains: Typhi et Paratyphi, et d'autres ne se rencontrent que chez l'animal (22). De même, les Salmonelles peuvent se retrouver sur des poissons plus très frais. Dans la majorité des cas, un défaut dans la chaîne du froid est à mettre en cause (23). Les Salmonelles peuvent survivre plusieurs semaines en milieu sec et plusieurs mois dans l'eau. Elles se retrouvent donc fréquemment dans les milieux aquatiques pollués, la contamination par les excréments d'animaux porteurs étant très importante. Les vertébrés aquatiques, notamment les oiseaux (Anatidés) et les reptiles (Chéloniens) sont d'importants vecteurs de salmonelles. Les volailles, les bovins et les ovins étant des animaux fréquemment contaminants, les salmonelles peuvent se retrouver dans les aliments, notamment les viandes, le lait ou les œufs (19). Elles peuvent être disséminées dans l'environnement par les excréta. Elles ne peuvent pas s'y multiplier de manière significative mais peuvent survivre dans le sol pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois si les conditions de température, de pH et d'humidité sont favorables (18). *Salmonella enterica* (cause d'intoxication alimentaire commune) est l'une des bactéries plus importantes trouvées sur les mouches. Une équipe de chercheurs des États-Unis, du Singapour, du Brésil et d'Allemagne ont montré que les mouches domestiques et les mouches bleues peuvent transporter une variété bien plus large de bactéries. Une des découvertes clés, c'est que les mouches contaminent principalement par contact avec une surface. Des centaines d'espèces de bactéries retrouvées sur les mouches, certaines de ces bactéries sont connues pour transmettre des maladies à l'homme, notamment des infections nosocomiales (attrapées dans des établissements de santé), ou en contaminant des denrées (24).

3.3.5. Pouvoir pathogène :

Les caractéristiques essentielles de la pathogénie des Salmonelles sont leur capacité à entrer dans les cellules-hôtes et y demeurer comme parasite intracellulaire facultatif (25). Les germes pénètrent, même en nombre restreint, par voie digestive et après une incubation assez longue (jusqu'à 3 semaines) traversent la muqueuse intestinale et envahissent le tissu lymphoïde intestinal (plaques de Peyer). De là, le germe passe dans les ganglions lymphatiques mésentériques puis dans la lymphe et enfin dans la circulation sanguine, ce qui détermine un état bactériémique (19). Les symptômes apparaissent environ 24 - 48 h après digestion de l'aliment

contaminé et se traduisent par des nausées, des vomissements, des maux de tête et des diarrhées (22). La bactériémie avec sepsis n'est pas une complication accidentelle mais s'inscrit dans l'évolution normale de la maladie. Par ailleurs, les plaques de Peyer peuvent s'ulcérer et entraîner une perforation intestinale et une péritonite. Le malade guéri peut rester porteur de germes pendant des mois ou des années, les bactéries persistant surtout dans les voies biliaires. La libération d'endotoxine joue un rôle important dans la pathogénie de la maladie, d'où le danger de l'administration d'une forte dose d'antibiotique qui risque de provoquer une lyse massive des bactéries (19). Les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes, maladies très sévères qui s'accompagnent dans 90% des cas d'une hospitalisation des patients, dues à des sérovars strictement humains : *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A.* et, à un degré moindre, *S. paratyphi B.* Les Salmonelles hébergent fréquemment des plasmides porteurs de facteurs de résistance aux antibiotiques (22). Il est différent pour les Salmonelles majeures (que l'on ne trouve que chez l'homme) et les Salmonelles mineures (ubiquistes). *Salmonella* majeures (*Salmonella Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B*, *S. Paratyphi C*) respectivement responsables des fièvres typhoïdes et paratyphoïdiques. La transmission se fait par les selles des malades. Après infection, l'hémoculture devient positive avant la coproculture (passage dans le sang, puis retour dans l'intestin grêle). Les Salmonelles mineures, sont responsables de gastroentérites (bactéries entéropathogènes invasives). Ces germes sont portés par l'homme et l'animal. Les salmonelles mineures sont impliquées dans 30 à 60 % des infections alimentaires. Un manque d'hygiène est très souvent à l'origine de la transmission (26).

3.3.6. Virulence :

Elle dépend des souches et des conditions. Des Salmonelles dites «hyper virulentes», sources potentielles de maladies émergentes ont été observées en 2011-2012 en Californie (Santa Barbara) sur des animaux d'élevage. Ce sont des souches particulièrement résistantes, à propagation inhabituellement rapide, résistantes aux vaccins existants (en 2012) et qui entrent dans l'organisme et deviennent inhabituellement virulentes, puis reprennent un comportement plus normal quand elles retournent dans l'environnement, où elles sont alors moins détectables (19).

3.3.7. Caractères bactériologiques :

Le genre *Salmonella* possède des caractères généraux, des caractères différentiels intrinsèques et une paroi identique à celle des Entérobactéries dont une partie comportant essentiellement les Lipopolysacharides, les antigènes flagellaires et le peptidoglycane.

3.3.7.1. Structure :

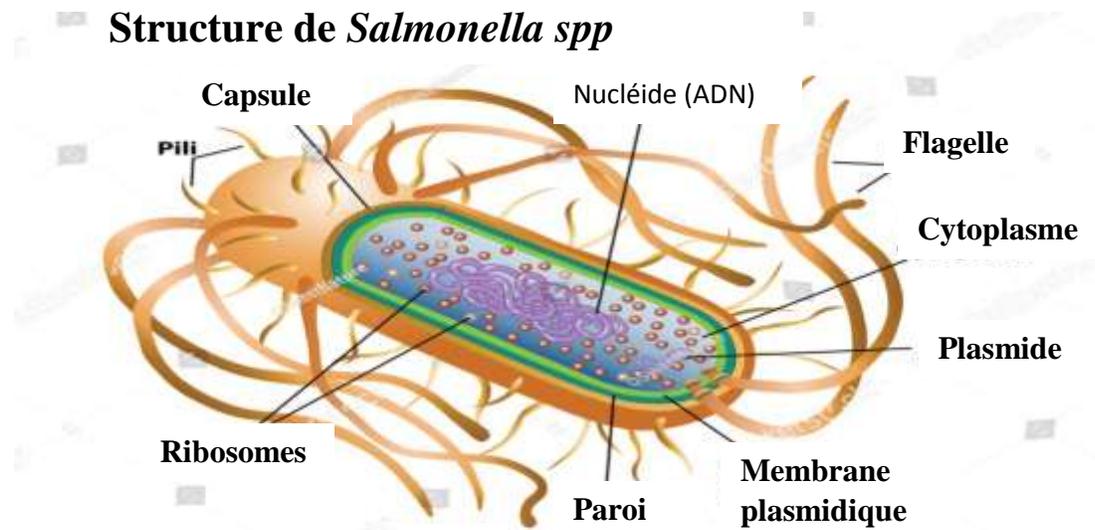


Figure 2: Coupe de Salmonelle (26).

3.3.7.2. Morphologie et Coloration :

En microscopie optique, elles apparaissent comme des bâtonnets à Gram négatif de 0,3 μm à 1 μm de large et longs de 1 à 6 μm , mobiles grâce à une ciliature péritriche (à l'exception du sérovar Gallinarum-Pullorum). Les salmonelles sont des bactéries mésophiles se développant à des températures comprises entre 5,2°C et 47°C et de manière optimale entre 35 et 37°C, à des pH compris entre 4,5 et 9, avec une activité en eau supérieur à 0,93 (27).(voir figure 3et 4)

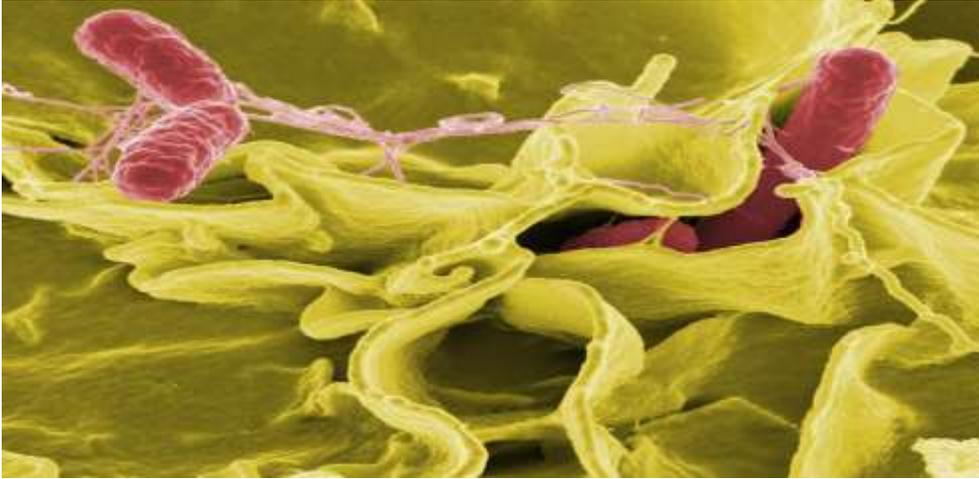


Figure 3: *Salmonella Typhimurium*, en rouge, sur une culture de cellules humaines observée au microscope électronique [29].



Figure 4 : *Salmonella Typhi* en microscope optique [30].

3.3.7.3. Caractère antigénique :

Comme toutes les entérobactéries, les Salmonelles possèdent potentiellement trois types d'antigènes présentant un intérêt diagnostique : les antigènes somatiques (Ag O), les antigènes flagellaires (Ag H) et les antigènes de surface ou de virulence (Ag Vi).

- Antigène somatique (Ag O) :

L'antigène O est un antigène de la paroi. Ils sont portés par les chaînes spécifiques du lipopolysaccharide (LPS) et possède des propriétés immunisantes. C'est un complexe contenant une protéine, un polysaccharide et un composé phospholipidique. On distingue 67 groupes O dont

des antigènes O majeurs et des antigènes O mineurs selon la nature des sucres entrant dans la constitution des unités oligosaccharidiques du polysaccharide. Les antigènes O sont formés d'une fraction lipidique appelée lipide A qui est responsable des effets toxiques de la partie basale et du polysaccharide (support de la spécificité). L'antigène somatique est stable; il résiste à l'alcool et au phénol pendant deux heures et demie à la température de 100°C(28). La délétion par mutation de l'antigène O entraîne une perte partielle ou totale du pouvoir pathogène.

- **Antigène flagellaire (Ag H) :**

C'est un polymère de flagelline (protéine de structure des flagelles). Cet antigène est thermolabile, détruit par la chaleur à 100°C, par l'action de l'alcool et par les ferments protéolytiques. Il résiste au formol et perd son agglutinabilité par les anticorps en présence d'alcool et d'acide phénique. Son développement optimum s'obtient sur les milieux liquides après un séjour de 8 heures à 37°C (Dumas, 1958). La grande majorité des sérovars possèdent deux systèmes génétiques et peut exprimer alternativement deux spécificités différentes pour leur antigène flagellaire. On dit que les antigènes flagellaires de *Salmonella* sont diphasiques(28). Les flagelles existent alors sous deux formes antigéniques qualifiées de phase 1 et de phase 2. Pour une cellule bactérienne donnée, un seul des deux gènes s'exprime et les flagelles seront soit en phase 1 soit en phase 2 (2).

- **Antigène de virulence (Ag Vi) :**

C'est un antigène de l'enveloppe, il a été identifié chez trois types de sérovars: Typhi, Paratyphi C et Dublin mais toutes les souches de ces sérovars ne possèdent pas forcément cet antigène. Cet antigène est considéré comme un antigène de surface, il est distinct de l'antigène somatique et de l'antigène flagellaire. L'antigène Vi rend les germes inagglutinables par les anticorps O quand il est abondant. Il ne se développe pas si les cultures sont effectuées au-dessous de 25°C et au-dessus de 40°C. Un chauffage à 100°C pendant dix minutes le détruit et les germes deviennent agglutinables par les anticorps O. Il est de nature glucidolipidopolypeptidique. A côté de ces antigènes il existe dans le genre *Salmonella*, des structures protéiques de surface: les pilis qui se différencient en pilis communs (intervenant dans l'hémagglutination mannose dépendante) et en pilis sexuels (intervenant dans la conjugaison bactérienne) et dont la présence est codée par des plasmides(28). Les formules antigéniques complètes de toute les *Salmonelles* sont répertoriées dans le schéma de Kaufmann-White....

Tableau II: Formules antigéniques des sérotypes de *salmonella* les plus fréquents (31).

Groupe	Nom usuel	Antigènes O	Antigènes H	
			Phase 1	Phase 2
B	Paratyphi B	1, 4, [5], 12	b	1, 2
	Wien	1,4, 12, 27	b	1, w
	Stanley	1,4, [5], 12, 27	d	1, 2
	Duisburg	1,4, 12, 27	d	e, n, z15
	Saintpaul	1,4, [5], 12, 27	e, h	1, 2
	Reading	1,4, [5], 12	e, h	1, 5
	Chester	1,4, [5], 12	e, h	e, n, x
	Derby	1,4, [5], 12	f, g	[1, 2]
	Agona	1,4, 12	f, g, s	-
	Typhimurium	1,4, [5], 12	i	1, 2
	Brandenburg	1,4, [5], 12	i, v	e, n, z15
	Heidelberg	1,4, 12	r	1, 2
	Coeln	4, [5], 12	y	1,2
	Essen	4, 12	g, m	-
	Abortusovis		c	1, 6
C1	Paratyphi C	6, 7 [Vi]	c	1,5
	Choleraesuis	6, 7	c	1, 5
	Isangi	6,7	d	1, 5
	Livingstone	6, 7	d	1, w
	Eimsbuttel	6, 7, 14	d	1, w
	Montevideo	6, 7	g, m, s	-
	Oranienburg	6, 7	m, t	-
	Thompson	6,7	k	1, 5

	Infantis	6,7	r	1,5
C2	Muenchen	6, 8	d	
	Manhattan	6, 8	d	
	Newport	6, 8	e, h	
	Blockley	6,8	k	
	Lichtfeld	6,8	l, v	
	Bovismorbificans	6,8	r	
D	Typhi	9, 12 [Vi]	d	-
	Enteretidis	1, 9, 12	g, m	-
	Dublin	1,9,12	g, p	-
	Gallinarum (volailles)	1, 9, 12 1, 9, 12	- l, v	- 1, 5
	Panama	[9], 46	d	1, 7
	Strasbourg			
E1	Muenster	3,10	e, h	1, 5
	Anatum	3, 10	e, h	1, 6
	Meleagridi	3, 10	e, h	1, w
	London	3,10	l, v	1, 6
	Give	3, 10, [15]	l, v	1, 7
E4	Senftenberg	1, 3, 19	g, [s], t	-
G	Kedougou	1, 13, 23	i	1, w
	Worthington	1, 13, 23	z	1, 5
A	Paratyphi (Afrique, Asie)	A 1, 2, 12	a	-

3.3.5.3. Caractères biochimiques :

Ce sont bacilles à Gram négatifs, mobiles (ciliature péritriche), aéro-anaérobies facultatifs, oxydase (-), nitrate réductase (+), fermentative du glucose, lactose (-), H₂S (+), uréase (-), tryptophane désaminase (+), utilisant la voie des acides mixtes, indole(-), ne possédant pas la bêta-galactosidase, à forte contagiosité, responsables de gastro-entérites, toxi-infections alimentaires et des fièvres typhoïde et paratyphoïde (*S. typhi* et *S. paratyphi*) (29). 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*.

Tableau III: Les six sous-espèces de l'espèce *Salmonella enterica* peuvent également être identifiées par leurs caractères biochimiques (31).

Habitat	<i>Salmonella enterica</i> sous-espèce						<i>S.bongori</i>
	Homme animaux à sang chaud	Animaux à sang froid environnement					
Caractères Biochimiques	enterica	salamae	arizonae	Diarizonae	Houteanae	Indica	
ONPG	-	-	+	+	-	D	+
Gélatinase	-	+	+	+	+	+	-
β-glucuronidase	D	d	-	+	-	D	-
α-glutamyl transférase	D	+	-	+	+	+	+
Culture sur KCN	-	-	-	-	+	-	+
Dulcitol (fermentation)	+	+	-	-	-	D	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
L(+) Tartrate	+	-	-	-	-	-	-
Salicine	-	-	-	-	+	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	-
Lyse par le phage O1	+	+	-	+	-	+	+

D : variable selon les souches.

3.3.5.4. Caractères cultureux :

L'isolement et la caractérisation des salmonelles se fait en 4 étapes pré-enrichissement (afin de revivifier les souches), enrichissement sur milieu sélectif (afin de favoriser la multiplication des salmonelles au détriment de la flore compétitrice), isolement en boîte de Pétri sur milieu sélectif et enfin identification sur gélose triple sucre. La méthode est adaptée en fonction de la matrice à examiner (aliment, échantillon environnemental, etc.) et fait l'objet de normes en constante évolution (30).

- Les milieux de pré-enrichissement :

Des études ont montré l'utilité d'un pré-enrichissement de l'échantillon de 18 à 24 heures et l'inoculation ultérieure dans un bouillon d'enrichissement rappaport-vassiliadis. L'eau peptonnée tamponnée est le milieu de choix ou le bouillon universel pour ce pré-enrichissement. Il a été démontré que le pré-enrichissement était important pour la culture d'échantillons secs, d'échantillons dans lesquels les salmonelles sont potentiellement endommagées, d'échantillons ayant peut-être déjà été désinfectés, et d'échantillons fécaux et environnementaux dans lesquels un faible nombre de salmonelles est largement inférieur à celui d'autres bactéries entériques. Le pré-enrichissement permet aux salmonelles (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 (31).

- 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. 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 (2).

- **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 (H₂S). 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 Hecktoen, Ramback, etc.

Tableau IV : Aspects des colonies et caractéristiques des milieux utilisés pour isolement de *Salmonella* (12).

Milieux	NBG	Rambach	Frigals ki	SS	DCLS	Hektoen	XLT4
Sucre fermentés ou substrats métabolisés	-	Propylène glycol	Lactose	Lactose	Lactose Saccharose	Lactose Saccharose Salicine	Lactose Saccharose xylose
Aspect des colonies (24h 37°C) Diamètres	Verdâtres Translucides Centre noir 1-3mm	Rouges fuchsia (Sauf Typhi et Paratyphi incolores 0.5-2mm	Bleu-vert 2-3mm	Incolore (centre noir) 1-2mm	Incolore, légèrement rosées 0.5-2mm	Vert-bleuâtre, centre noir 2-3mm	Noir avec centre noir sur fond violet 2mm
Détection production H ₂ S	+	-	-	+	-	+	+



Figure 5 : Colonies noires bactériennes de l'espèce *Salmonella* sur gélose *Salmonella-Shigella* (gélose SS) (32).



Figure 6 : Les colonies *de salmonella* sur la gélose Hektoen (32).

3.3.6. Diagnostic biologique :

3.3.6.1. Diagnostic direct :

Il se repose sur l'isolement et l'identification de l'agent pathogène. L'isolement se fait soit à partir du sang (hémoculture) pour les salmonelloses donnant une phase septicémique, soit à partir des selles (coproculture). Cela permet sa caractérisation précise pour une enquête épidémiologique et l'étude de sa sensibilité aux antibiotiques.

3.3.6.2. Diagnostic indirect

Le sérodiagnostic de Widal et Félix n'est utile que pour le diagnostic tardif des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes. Diagnostic indirect par recherche dans le sérum du patient des agglutinines correspondant à la bactérie en cause. Cette recherche est habituellement limitée au diagnostic des fièvres typho-paratyphoïdiques. Le titre des agglutinines O et H, leur coexistence et leur évolution permettent d'établir un diagnostic de probabilité; seul l'isolement de la bactérie autorise un diagnostic de certitude.

- 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.

- Résultats normaux

Les agglutinines O apparaissent vers le 8^e jour de la maladie et les agglutinines H vers les 10-12^e 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 $T_0 = 1/200$ $T_H = 1/800$). 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.

- 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.

- 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. Un résultat négatif ne veut pas dire absence de fièvres typhoïdes ou paratyphoïdes.

3.3.7. TRAITEMENT :

Les antibiotiques utilisés contre les salmonelles pour le traitement des fièvres typhoïdes : thiamphénicol, ampicilline, triméthoprime-sulfaméthoxazole par voie orale. Ceftriaxone et fluoroquinolones ont une excellente activité et réduisent le temps de traitement.

3.3.7.1. Curatif :

-phénicolés, amoxicilline, cotrimoxazol : 15 jours

-ceftriaxone 75 mg/Kg sans dépasser 4g : 5-10 jours

-fluoroquinolone= Ofloxacin 200mg x 2/jours, où

Ciprofloxacine 500mg x 2/jours

-azitromycine 500mg/jour en une prise

-Corticoïdes 1mg/Kg/jour + ATB (si forme compliquées)

- Le choix de l'antibiotique doit être déterminé par un antibiogramme.

3.3.7.2. Préventif :

Les salmonelles sont des pathogènes zoonotiques alimentaires majeurs, que l'homme acquière à partir d'une multitude de réservoirs, animaux principalement, et par différentes voies de transmission. Le contrôle et la lutte contre ces infections ont fait l'objet de nombreux efforts, Il existe ainsi des mesures de contrôle et de prévention potentielles à chaque point de

la chaîne alimentaire. Il consiste à agir de façon coordonnée à toutes les étapes de la transmission des salmonelles, de la fourche à la fourchette. Cela suppose l'implication de l'ensemble des acteurs, institutions nationales voire supra-nationales (Commission Européenne), professionnels (éleveurs, abatteurs, industrie agro-alimentaire, distributeurs), mais également consommateurs, et la mise en place d'une réglementation adaptée.

Actuellement, deux (2) vaccins sont disponibles pour la prévention de la fièvre typhoïde. Le vaccin Ty21a est un vaccin oral vivant atténué et qui est disponible sous forme de capsule, buvable et son utilisation est autorisée aux États-Unis pour les enfants de 6 ans et moins et pour les enfants de 2 ans et moins. Et le vaccin Typhim-Vi est une solution injectable d'antigène Vi (virulence) préparée à partir de polysaccharide capsulaire de la souche TY2 (ViPSC) de *Salmonella* Typhi. Le vaccin est fabriqué par Sanofi Pasteur distribué sous le nom commercial de Typhim- Vi (MC). Chaque dose unitaire contient 0,5µg de polysaccharide qui induit une réponse immunitaire humorale et confère une protection contre l'infection. Des essais cas- témoin ont démontré que la réponse sérologique au vaccin était corrélée à l'efficacité de la protection. La dose administrée est la même pour les adultes et les enfants. Le fabricant ne recommande pas ce vaccin pour les enfants de moins de deux ans. L'efficacité du vaccin anti-Vi par voie parentérale a récemment été confirmée chez les jeunes enfants et la protection des voisins non vaccinés des vaccinés contre Vi a été démontrée. La posologie recommandée pour le vaccin Typhim- Vi consiste en une dose unique de 0.5ml injectée par voie intramusculaire. Le Ty21a et le vaccin parentéral contre le Vi repose sur l'antigène de *S. Typhi* Vi (tableau 1). Un nouveau vaccin conjugué en cours de développement, Vi-rEPA, comprend l'antigène Vi lié à une protéine recombinante non toxique et identique sur le plan antigénique à l'exotoxine de *Pseudomonas aeruginosa*. Il s'est avéré sûr et immunogène chez les enfants âgés de 2 à 5 ans, en fournissant efficacité protectrice de 91,5%. Malgré certains efforts préliminaires, il n'existe actuellement aucun vaccin homologué contre *S. Paratyphi*, ce qui est préoccupant, étant donné les preuves de l'émergence de cet agent pathogène.

3.4. LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DES SALMONELLES :

3.4.1. Définition d'un antibiotique :

Un antibiotique est une substance naturelle ou synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries. Dans le premier cas, on parle d'antibiotique bactéricide et dans le second cas d'antibiotique bactériostatique. Un antibiotique peut être à la fois bactéricide et bactériostatique, tout dépendant de sa dose. Cependant, seul un petit nombre des antibiotiques naturels est utilisable en thérapeutique humaine, pour des raisons de disponibilité dans l'organisme ou d'effets indésirables. Un grand nombre de molécules aujourd'hui sur le marché sont des molécules de synthèse, dérivées ou non d'antibiotiques naturels, en particulier pour contourner les problèmes de résistance (32).

3.4.2. Sites et modes d'action des antibiotiques :

La connaissance du mode d'action des antibiotiques est nécessaire à la compréhension des mécanismes de résistance. Schématiquement, les antibiotiques agissent sur les bactéries au niveau de cibles spécifiques soit d'un antibiotique, soit d'une famille d'antibiotiques. L'interaction de l'antibiotique avec sa cible a pour effet de perturber la formation des enveloppes cellulaires (paroi, membrane cytoplasmique) ou encore d'inhiber certains processus métaboliques bactériens (synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques).

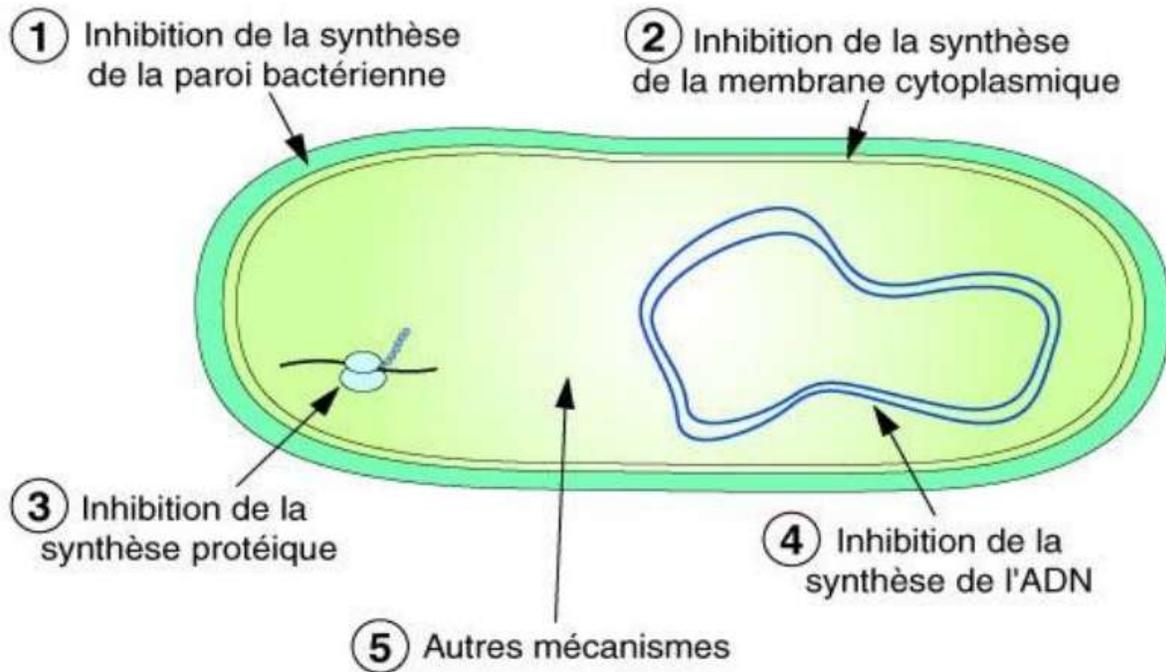


Figure 7 : Sites et modes d'action des différentes classes d'antibiotiques

3.4.3. Classification des antibiotiques :

Il existe un grand nombre de familles d'antibiotiques. Leur classification se fait selon leur origine (biologique, hémi synthétique ou synthétique) leur structure chimique (dont découlent des mécanismes d'action semblable et des spectres comparables) et enfin leur mode/mécanisme/site d'action. Une classification basée sur le site d'action dans la bactérie ou sur le processus physiologique visé a été retenue en raison de son intérêt bactériologique (Tableau I). A l'intérieur de chacun de ces groupes (tableau I), la classification par famille est fondée sur la structure chimique des différentes molécules. Et à chaque famille correspond un mécanisme moléculaire spécifique.

Tableau V: Classification des antibiotiques selon leurs sites d'action

Sites d'action des antibiotiques	Familles d'antibiotiques	Antibiotiques (exemples)
Paroi bactérienne	<p>β-lactamines</p> <p>Glycopeptides</p> <p>Fosfomycines</p>	<p>Pénicillines (Pénicillines G)</p> <p>Céphalosporines (Céfalotine)</p> <p>Monobactames (Aztréonam)</p> <p>Vancomycine</p> <p>Fosfocine</p>
Membrane cytoplasmique	<p>Polymixines</p> <p>Gramicidines et Tyrocidines</p>	<p>Colistine</p> <p>Bacitracine ;</p> <p>Tyrothricine</p>
Ribosome	<p>Aminosides (SU 30S du ribosome)</p> <p>Cyclines (SU 30S)</p> <p>Macrolides-Lincosamines-Synergistines (SU 50S)</p> <p>Phénicols (SU 50S)</p> <p>Acide Fusidique (SU 50S)</p> <p>Oxazolidinones (SU 50S)</p>	<p>Gentamycine</p> <p>Tétracyclines, Doxycycline, Minocycline</p> <p>Erythromycine, Lincomycine</p> <p>Virginiamycine</p> <p>Chloramphénicol</p> <p>Fucidine</p> <p>Linézolidine</p>
ARN-polymérase ADN	<p>Rifampicine</p> <p>Quinolones Fluoroquinolones</p>	<p>Rifamycine</p> <p>Acide Nalidixique</p> <p>Ciprofloxacine</p>
Acide folique	<p>Produits Nitrés</p> <p>Sulfamides</p> <p>Triméthoprime</p>	<p>Nitroxoline</p> <p>Sulfadiazine</p> <p>Triméthoprime</p>

Pour échapper à l'action létale des antibiotiques, les bactéries ont développé de très nombreux mécanismes biochimiques de résistance, associés à une ingéniosité génétique pour les acquérir et les diffuser.

3.4.4. Définition de la résistance bactérienne aux antibiotiques :

La résistance aux agents antimicrobiens est définie comme la capacité d'un micro-organisme à résister à l'action inhibitrice d'antibiotiques auxquels ils étaient jusque-là sensibles (OMS 2013).

3.4.5. Types de résistance

La résistance bactérienne aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise

- **Résistance naturelle**

C'est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. C'est l'expression d'une propriété innée reflétant l'empêchement d'accéder à la cible ou l'absence de la cible. Elle est stable, transmise à la descendance (elle a pour support génétique le chromosome bactérien). La résistance naturelle définit le phénotype « sauvage » (Lagrange 1987).

- **La résistance acquise**

Elle n'apparaît que chez certaines souches d'une espèce donnée normalement sensible. Elle résulte de l'emploi thérapeutique des antibiotiques. La résistance acquise peut être due à des mutations affectant les gènes présents sur le chromosome bactérien ou à l'acquisition de gènes étrangers, véhiculés par des éléments génétiques mobiles transférables d'une bactérie à l'autre (plasmide, transposons, intégrons). Elle est le plus souvent instable et définit le phénotype résistant « anormal » (Lagrange 1987).

3.4.6. Principaux mécanismes de la résistance des bactéries aux antibiotiques

Quatre principaux mécanismes sont impliqués dans la résistance des bactéries aux antibiotiques :

- **Diminution de la perméabilité membranaire**

Non pénétration de l'antibiotique dans la bactérie par diminution de la perméabilité membranaire ; Ce mécanisme rend compte soit de la résistance naturelle pour les antibiotiques hydrophobes et les bacilles à Gram négatif (Entérobactéries), soit par acquisition des porines. C'est ainsi que E. coli peut acquérir des porines OmpF lui

permettant d'induire une résistance croisée aux quinolones, bêtalactamines, chloramphénicol, tétracyclines. De même *Pseudomonas aeruginosa* peut avoir des résistances isolées aux carbapénèmes par acquisition des porines OprD2.

- **Mutation ou modification enzymatique**

Altération de la cible de l'antibiotique, les bactéries peuvent être résistantes aux antibiotiques par suite d'une mutation ou une modification des enzymes cibles.

- **Inactivation enzymatique de l'antibiotique**

La stratégie vise à détruire ou modifier l'antibiotique afin qu'il devienne inactif, qui peut être hydrolysé (pénicillinase, céphalosporinase pour les β -lactamines) ou modifié dans sa structure chimique (acétylase, adénylase, phosphorylase pour les aminosides)

- **Efflux actif**

La bactérie peut produire une protéine membranaire, la pompe à efflux, qui permet l'exportation de l'antibiotique hors de la bactérie grâce à un canal. La pompe permet une sortie d'antibiotique plus rapide que l'entrée. Ainsi, la concentration intracellulaire d'antibiotique demeure à un niveau faible et inefficace (Walsh 2000).

3.5. DISSEMINATION DES DETERMINANTS GENETIQUES DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES :

Une bactérie peut acquérir une résistance aux antibiotiques par deux grands mécanismes génétiques. L'un a pour support le chromosome et définit une résistance chromosomique, l'autre a pour support les éléments génétiques mobiles (plasmides ou les éléments transposables, les intégrons ou l'élément SXT (*V. cholerae*) et définissent une résistance extra-chromosomique.

3.5.1. Chromosome :

La résistance induite par le chromosome bactérien peut être due à une mutation. Elle a un caractère héréditaire (transmission sur un mode vertical de bactéries-mères à bactéries-filles).

3.5.2. Plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN bicaténares, circulaires, extra chromosomiques (Courvalin 1994). Ils possèdent une origine de répllication, un site régulateur du nombre de copie et des gènes qui codent selon les plasmides pour une ou plusieurs fonctions : transfert

chromosomique (plasmide F), production de colchicine (plasmide col), production d'entérotoxine ou d'hémolysine (plasmide Ent, Hly), résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds: plasmide R (Curtis 1977; Willets 1984). En général les plasmides des procaryotes ne sont pas indispensables à la vie. Cependant, ils permettent soit une meilleure adaptation à l'environnement défavorable ou fluctuant, soit une implantation dans certains hôtes, soit une compétition victorieuse avec d'autres micro-organismes. Un plasmide peut porter plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques conférant ainsi en bloc une multi-résistance. Les plasmides constituent également des vecteurs intercellulaires des structures génétiques comme les transposons et les intégrons.

- **Dissémination des plasmides**

Deux types de plasmides ont été définis selon le nombre de copies par cellule : Les petits plasmides dont les gènes régulateurs du nombre de copies par cellule ne sont pas soumis à un contrôle strict. Ces types de plasmides appelés plasmides non conjugatifs existent en grand nombre par cellule et n'ont pas de fonctions connues dans la résistance aux agents antibactériens. Ils ne peuvent être transférés d'une bactérie à une autre que par mobilisation (Courvalin 1994). Les gros plasmides ou plasmides R ou encore plasmides conjugatifs, qui ont leur site de régulation soumis à un contrôle strict. Ces types de plasmides sont présents en une seule copie par cellule et leur réplication est indépendante de celle de l'ADN génomique. Les plasmides de résistance (R) se caractérisent par leur autoréplication, leur autonomie physique (ils peuvent être séparés de l'ADN par ultracentrifugation sur gradient de densité) et leur perte spontanée à faible fréquence à température ambiante (37°C).

La plupart des plasmides de résistance sont transférables d'une bactérie à une autre par contact (Curtis 1977). De tels plasmides possèdent un gène codant pour la synthèse d'appendices protéiques appelés pilis sexuels et un opéron TRA regroupant une vingtaine de gènes qui codent pour de nombreuses protéines nécessaires à la conjugaison bactérienne. En outre les plasmides R renferment d'autres gènes codant pour d'autres fonctions tels que : l'inhibition de l'efflux, la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'adénylation de groupements fonctionnels (Witchitz 1982).

Ces plasmides transférables ont une spécificité d'hôte. Ceci n'implique leur diffusion épidémique que dans les environnements sélectionnant tels que les services hospitaliers où les antibiotiques

sont largement utilisés ou chez les animaux recevant une alimentation supplémentée en antibiotiques.

- **Mécanisme de la dissémination des plasmides**

Trois mécanismes principaux sont impliqués dans la dissémination des plasmides (figure 2) :

Conjugaison : phénomène de contact bactérien au cours duquel il y'a échange de matériel génétique.

Transduction: transfert d'ADN par un bactériophage Transformation: intégration et expression de séquence génomique étrangère en l'absence de toute homologie de séquence (33).

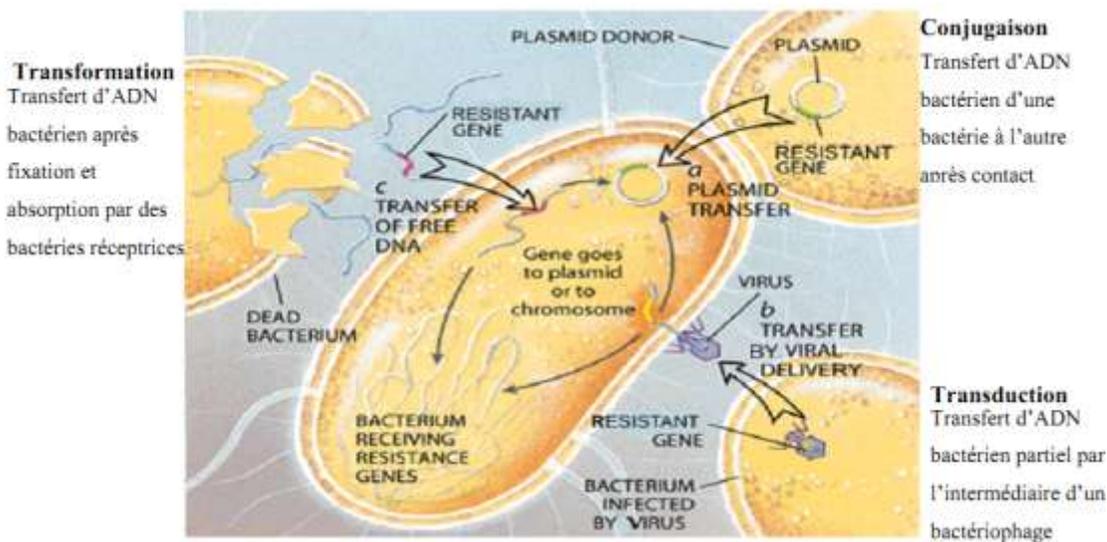


Figure 8 : Mécanisme de dissémination des plasmides

3.6. Etude de sensibilité de *salmonella* aux antibiotiques :

Les Salmonelles sont sensibles à la plupart des antibiotiques à large spectre. Les Salmonelles sont susceptibles de développer une résistance acquise par deux mécanismes : par le transfert de gène de résistance, d'origine plasmidique ou lié à des transposons, qui est le plus fréquent et par la mutation qui est rare. La résistance transmise aux B-lactamines est essentiellement de type pénicillinase et ne touche pas les céphalosporines de troisième génération. L'augmentation de la résistance chez les bactéries d'origine aviaire peut être attribuée à l'usage abusif des antibiotiques. Cependant, les bactéries dans l'environnement naturel peuvent héberger des gènes de résistance dérivés de l'utilisation de ces médicaments chez les humains et les animaux. Ces résistances sont

surtout importantes pour les antibiotiques suivants: Tétracyclines, Triméthoprine, Sulfamides, Triméthoprine-Sulfametoxazole, Ampicilline, Céfalotine, Streptomycine(9).

4. Méthodologie

4.1. Cadre de l'étude

Le Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (C.I.C.M) a constitué le cadre de notre étude pour les analyses bactériologiques et les prélèvements humain. Les prélèvements d'animaux et environnementaux ont été effectués dans plusieurs localités de Bamako et Kati. Le CICM est situé dans le quartier de l'ex- base aérienne de Bamako, rue du Docteur Charles Mérieux.

Le centre est fruit de la collaboration entre le Gouvernement de la République du Mali et la Fondation 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 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
- Mai 2005 : Démarrage des activités

Le CICM comprend :

- Une administration générale.
- Un centre de formation avec une formation diplômante (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 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 et Période d'étude

C'est une étude transversale, prospective, descriptive portant sur les souches de *salmonella spp* isolées des échantillons, d'origine animale, environnementale, ainsi que celles isolées des échantillons humains au LRM de janvier 2019 à décembre 2019.

4.3. Population d'étude

Notre étude a porté sur les souches de *Salmonella spp* isolées des animaux (fientes de poulets, fientes de volailles, fèces de poisson, fèces de mouches, fèces de rat, fèces de chien) ; de l'environnement (sols, eaux usées, eaux de consommation non traitées) et des échantillons humains (selle et sang) destinés aux analyses microbiologiques de routine reçus au LRM pendant la période de notre étude.

4.3.1. Critère d'inclusion

Ont été incluses dans notre étude les souches de *salmonella spp* isolées des échantillons d'origine animale, environnementale et celles isolées des prélèvements humains au LRM.

4.3.2. Critère de non-inclusion

N'ont pas été incluses dans notre étude les autres souches bactériennes isolées de l'environnement, des animaux et des échantillons humains au LRM.

4.4. Echantillonnage

Au total 958 échantillons issus des trois entités ont été collectés, dans les quels 37 souches de *salmonella spp* ont été isolées. Dans 628 échantillons humains, 25 souches de *salmonella spp* ont été isolées ; 8 souches dans 132 échantillons d'origine animale et 4 souches dans 198 échantillons d'origines environnementale.

4.5. Collecte des données

Les données ont été recueillies à partir des dossiers des patients, dans ces dossiers, on pouvait trouver pour les humains des informations telles que le numéro du patient, l'âge, le sexe, la nature du prélèvement, la structure de santé, l'espèce bactérienne isolée ainsi que les antibiotiques testés.

Pour les prélèvements d'origine environnementale et animale, les données ont été recueillies à partir des fiches de renseignements dont le questionnaire comportait l'origine du prélèvement, le lieu, l'espèce bactérienne isolée et les antibiotiques testés.

4.6. Méthodes bactériologiques

4.6.1. Recherche des souches de *Salmonella* spp d'origine humaine

Les souches de *Salmonella* spp d'origine humaine ont été isolées à partir des prélèvements des selles ou des prélèvements sanguins reçus au LRM pour des analyses de routine.

4.6.1.1. Examen bactériologique des selles (coproculture)

4.6.1.1.1. Prélèvement

Les prélèvements, étaient des selles recueillies dans des pots stériles émises sur place ou apportés par les patients reçus au LRM. Les selles recueillies étaient déposées dans le bac de bactériologie et sont tous acheminées dans l'unité de bactériologie pour leur analyse.



Figure 9 : Image des pots contenant des selles des patients

4.6.1.1.2. Examen macroscopique

Il consistait à apprécier la couleur et l'aspect des échantillons selon leur origine.

4.6.1.1.3. Examen microscopique

▪ L'état frais

Cette étape a concerné seulement les échantillons humains (selles) reçus au LRM. Il consistait à rechercher les leucocytes, les cristaux, les cellules épithéliales, les hématies, les kystes et des parasites et la mobilité des bactéries dans les selles.

▪ L'état après coloration de Gram

Les échantillons sont fixés sur la lame et colorés au Gram pour l'observation microscopique. La coloration de Gram est la coloration de base en bactériologie et elle permet de mettre en évidence la forme (cocci, bacille) et le type (Gram positif ou négatif) de la bactérie.

✓ 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 30secondes ;
- 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.

✓ Résultat

A la coloration de Gram :

- Bactéries Gram négatif : coloration rose
- Bactéries Gram positif : coloration violette
- Levures : forme ovale coloration violet

4.6.1.1.4. Culture

Milieux de culture et Ensemencement :

- 1^{ER} Jour :

On utilise le bouillon Rappaport comme milieu liquide d'enrichissement dans lequel on met quelques gouttes de la suspension de selle.

Ensuite, les cultures sont faites sur les milieux solides d'isolement (Gélose Hektoen).

Ces milieux ensemencés (liquides et solides) ont été placés à l'étuve pendant 18 à 24 heures à 37 °C.

- 2^{ème} jour : Première lecture à 24h

Lecture des colonies sur milieu hektoen1=H1, si les selles contiennent beaucoup de salmonelle on aura de nombreuses colonies de lactose négatif (colonies vert) et à H₂S positif (centre noir) ;

Si les selles contiennent très peu de salmonelle, on aura très peu de colonies ou pas du tout ; dans ce cas, on réensemence une goutte du bouillon Rappaport du 1^{er} jour sur un milieu Hektoen 2 (H2) qu'on placera à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. En cas de fièvre typhoïde ou de fièvre paratyphoïde, on aura de nombreuses colonies caractéristiques. Le maximum de positivité de la coproculture se situe à la 2^{ème} semaine mais dès la 1^{ère} semaine, cette positivité commence et persiste durant toute la maladie.

4.6.1.1.5. Isolement et purification des souches

24heures après la mise en culture des échantillons, les colonies types *salmonella spp* (vert à centre noire) étaient ré-isolées sur le milieu Urieselect 4 pendant 24heures afin d'obtenir des souches pures (colonies crémeuses).



Figure 10 : Les colonies de *salmonella* sur Hektoen (à gauche) et sur Uriselect4 (à droite) isolées à partir des selles au LRM (photo prise le 15/07/2019)

Après ré-isolément les colonies caractéristiques faisaient l'objet d'identification à partir des tests biochimiques et métaboliques.

▪ Test d'oxydase

Le test de l'oxydase est basé sur la production bactérienne d'une enzyme appelée 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.

✓ Technique

- 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.

✓ Résultat

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.

- **Galerie Api 20^E**



Figure 11 : Caractères biochimiques de *Salmonella* isolée dans les prélèvements de mouche (Révéls à l'aide de la galerie Api 20^E)



Figure 12 : Automate mini Api pour la lecture de galerie (Photo prise au LRM le 04/10/2019).

Le Mini API permet deux types de lecture.

- ✓ **La lecture turbinéphéléométrique**

Elle est destinée aux galeries turbinéphéléométrique.

-**Turbidimétrie** : mesure de l'intensité de la lumière transmise (T) inversement proportionnelle à la croissance bactérienne.

-**Néphéléométrie** : 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 turbinéphéléométrique 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.

✓ La lecture colorimétrique

Elle est destinée aux galeries colorimétriques.

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.

- **VITEK 2 compact :** Le système Vitek 2 Compact est destiné à l'identification des bactéries et levures, ainsi qu'à la réalisation d'antibiogrammes et d'antifongogrammes pour les bactéries significatives au plan clinique. Le système comprend l'instrument Vitek 2 Compact, un ordinateur et une imprimante.



Figure 13 : Automate VITEK 2 Compact (photo prise au LRM le 04/10/2019)

✓ **Technique**

- Prendre le flacon eau saline Vitek 2, introduire dans la dispensette ;
- Prendre des tubes secs pour Vitek 2, y introduire dans les puits de la cassette ;
- La cassette peut prendre jusqu'à 10 tubes soit 2x5 (identification+ antibiogramme) ;
- Mettre dans chaque tube, 3ml de la solution saline du Vitek 2 à l'aide de la dispensette préalablement réglée à 3 ml.

N.B : Pour un germe, deux tubes secs seront utilisés dont l'un servira à l'identification et l'autre à l'antibiogramme ;

- Sur une feuille vierge, porter la date et le numéro de l'échantillon ainsi que le nom approximatif du germe à identifier ;
- A partir de la culture pure sur gélose (culture jeune 24 h), à l'aide d'une oese, prélever quelques colonies et les introduire dans le tube sec contenant la solution saline ;
- Homogénéiser la suspension et bien vortexer ;
- A l'aide du densitomètre, mesurer la concentration bactérienne à 0,5 Mc Farland ;
- Poser le tube contenant la suspension bactérienne en première position et faire suivre celui prévu pour l'antibiogramme ;

-Préparer la solution pour antibiogramme :

- Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé la micropipette calibrée à 145µl (rouge) spécifique au Gram négatif.
- A partir de la suspension bactérienne, pipeter 145µl et diluer dans 3ml d'eau saline contenu dans le tube voisin. On aurait ainsi préparé la suspension pour l'antibiogramme.

-Placer la carte d'identification GN, et la carte pour l'antibiogramme AST-N 233 Au niveau de l'ordinateur de l'automate, à l'apparition de la page principale ;

-Cliquer sur Vitek 2

-Mettre Identifiant du LRM

-Cliquer sur gérer la cassette virtuelle

-Créer une cassette virtuelle

-Identification de la cassette 1,2, ...

-Lecture du code à barre de chaque carte à partir de la douchette

-Saisir les données de l'isolat ;

-Entrer les informations de l'isolat (numéro attribué au laboratoire, nom du germe si déjà identifié par d'autres techniques)

-Puis enregistrer les données de la cassette virtuelle

-Au niveau de l'automate Vitek 2 Compact,

-Ouvrir le capot de remplissage et insérer la cassette à l'intérieur de la chambre ;

-Fermer le capot de remplissage ;

-Appuyer sur la touche Lancer remplissage, un bip indique que le cycle de remplissage est terminé ;

-Retirer la cassette du capot de remplissage et l'introduire dans la chambre de lecture où s'effectue le scellage. Le processus de chargement/déchargement permet la lecture du code à barre des cartes et le code à barre de la cassette ;

-Lorsque le message retiré s'affiche dans la chambre de lecture, cela indique que le Vitek 2 a terminé le traitement des cartes contenues sur la cassette. On peut la retirer en ouvrant le capot chargement puis le refermer ;

-On attend le jour suivant où les résultats seront imprimés.

4.6.1.1.7. Test de sensibilité aux antibiotiques par la méthode de diffusion sur disques d'antibiotiques

L'antibiogramme est l'interprétation de la sensibilité des bactéries à l'antibiotique en termes d'efficacité clinique. Il permet de catégoriser une souche bactérienne en classes semi-quantitatives (sensible, intermédiaire ou résistante).

La technique utilisée est la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton, l'antibiogramme est interprété après mesure des diamètres d'inhibition autour des disques d'antibiotiques en accord avec les recommandations du comité d'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM).

- **Matériels et réactifs utilisés**

-Gélose Mueller-Hinton ; Solution saline à 0.45% ; Densitomètre (Mc Farland) ; Disques antibiotiques pour le test de sensibilité ; Ecouvillons en coton stériles ; Pipettes ; Tubes à hémolyse ; Pincettes à disques ;

▪ **Les antibiotiques testés**

-Amoxicilline 25 µg ; Amoxicilline + Acide clavulanique 20/10 µg ; Tobramycine 10 µg ; Gentamycine 15 µg ; Ciprofloxacine 5 µg ; Ticarcilline 75 µg ; Cefoxitine 30 µg ; Cefotaxime 30 µg ; Ceftazidime 30 µg ; Acide Nalidixique 30 µg ; Amikacine 30 µg ; Nitrofurantoinne 300 µg ; Fosfomycine 50 µg ; Sulfaméthoxazole + triméthoprime 1.25/23.75 µg ; Norfloxacine 5 µg ; Imipénème 10 µg

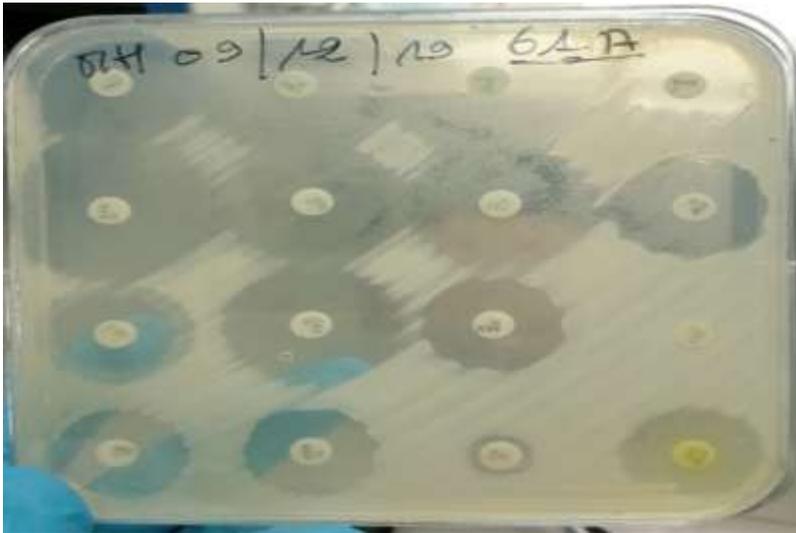


Figure 14 : Antibiogramme d'un échantillon de mouche écrasé au LRM (photo prise le 16/10/2019)

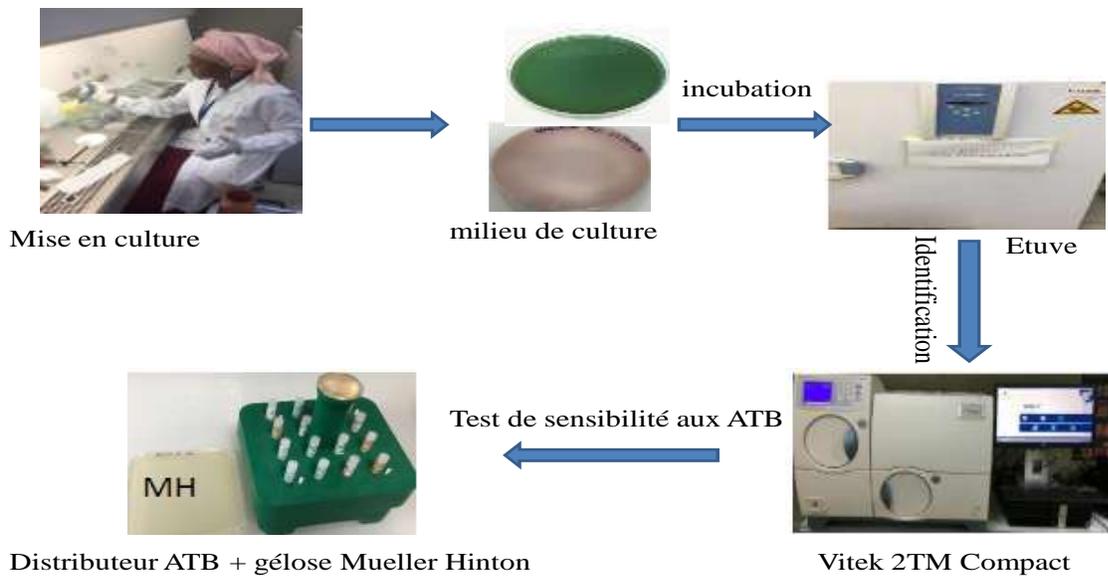


Figure 15 : Techniques de travail de notre étude

4.6.1.2. Examen bactériologique du sang (hémoculture)

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

4.6.1.2.1. Prélèvement :

Le prélèvement de sang s'effectue par ponction veineuse après désinfection de la peau au moyen d'un antiseptique bactéricide. La décharge bactérienne dans le sang n'étant pas permanente, il est nécessaire de faire non seulement le prélèvement au moment du pic thermique ou pendant les frissons mais aussi de multiplier le nombre de prélèvement. Ceci permet d'éviter les résultats faussement négatifs. Le prélèvement doit se faire avant toute antibiothérapie.

4.6.1.2.2. Technique de l'hémoculture :

Le sang prélevé doit respecter la proportion de 10ml de sang pour 100 ml de bouillon chez l'adulte. Cette dilution à 1/10 permet d'inactiver l'effet bactéricide du sang. Chez les enfants, le prélèvement se fait en fonction de l'âge, prélever 1 ml chez le nouveau-né, 2 ml chez l'enfant de 1-4 mois, 3 ml chez l'enfant de plus de 4 mois.

4.6.1.2.3. Milieux d'hémoculture :

Différents milieux sont préconisés pour les hémocultures,

- ✓ **Milieux liquides :** Ce sont des bouillons de type trypticase soja agar, bouillon cœur cerveau. Les échantillons ou prélèvement sont acheminés rapidement au laboratoire, où on réalise un étiquetage correct mentionnant le nom et prénom du patient, le service, la date, l'heure, la température au moment du prélèvement. Ensuite, elles sont rangées dans l'étuve à 37 °C. Les hémocultures sont surveillées quotidiennement en vue de déceler un éventuel développement microbien. Cette opération s'effectue pendant 15 à 21 jours après l'ensemencement. En cas de positivité, c'est à dire de développement microbien, il faut éliminer un contaminant ou germe de souillures telles que *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnés*, les corynebactéries, les streptocoques non hémolytiques, etc.

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

90% pendant le 1er septénaire

75% pendant le 2è septénaire.

40% pendant le 3è septénaire.

10% pendant le 4è septénaire.

4.6.1.2.4. Examen microscopique et la coloration de gram

Pour mettre en évidence la forme (bacille) et le type (négatif) de la bactérie. La procédure est la même que celle décrite dans le chapitre coproculture.

4.6.1.2.5. Culture :

Pour la recherche des bacilles gram (-), ensemercer une goutte du bouillon sur Drigalski et sur gélose au sang frais (COS) et incuber sous CO₂. Sur Drigalski, les Salmonelles donnent des colonies bleu-vert (lactose-).

4.6.1.2.6. Identification :

Pour l'identification nous avons utilisé le vitek 2 ou la galerie Api 20^E. La procédure est la même que celle décrite dans le chapitre coproculture.

4.6.1.2.7. Test de sensibilité aux antibiotiques :

Pour le test de sensibilité aux antibiotique nous avons utilisé le vitek 2 ou la méthode de diffusion sur la gélose Muller Hinton ; la procédure est la même que celle décrite dans le chapitre coproculture.

4.6.2. Examen bactériologique des échantillons d'origine animale et environnementale :

4.6.2.1. Prélèvement :

Prélèvement d'échantillon d'origine animale tel que les fèces des poissons, fientes des volailles, mouches, fèces des rats et fèces des chiens sont recueillies dans des plastiques stériles et acheminé au laboratoire pour analyse bactériologique.

Pour le prélèvement d'échantillon d'origine environnementale, les eaux sont recueillies dans des pots stériles et les sols dans des plastiques stériles. Ils sont tous acheminés au laboratoire pour des analyses bactériologiques.





Figure 19 : Prélèvement des eaux du fleuve Niger de Bamako (photos présent le 20/11/2019)



Figure 20 : Prélèvement d'eau de canalisation de l'hôpital de point G (à gauche) et d'eau de canalisation d'abattoir de Sabalibougou koura (à droite) (photos présent le 12/03/2019)



Figure 21 : Prélèvement des sols contaminé par les déchets humains au centre émetteur de Kati (photos présent le 17/10/2019)



Figure 22 : Prélèvement des sols de champs à sébénicoro et du jardin potager à wovowayanko2 (photos prises le 20/03/2019)

4.6.2.2. Culture, identification et test de sensibilité aux antibiotiques :

Pour ses deux types d'échantillons nous avons utilisé la même procédure que celle décrite dans le chapitre coproculture.

4.6.2.3. Contrôle de qualité interne :

Pour la validité de nos résultats d'identification et de test de sensibilité aux antibiotiques nous avons utilisé E. coli 25922 souches ATCC comme souche de référence

4.7. Variables étudiées

Les variables étudiées sont :

➤ Dans le secteur humain

- La provenance des souches ;
- Le type de prélèvement ;
- Le type de germe (espèces) ;
- Le sexe ;
- L'âge ;
- Le profil de résistance aux ATB testés.

➤ Dans le secteur animal et environnementale

- La provenance des souches ;
- Le type de prélèvement ;
- Le type de germe (espèces) ;

-Le profil de résistance aux ATB testés.

4.8. Aspect bioéthique :

L'autorisation des responsables du laboratoire a été obtenue pour l'utilisation des échantillons de routine.

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.

Avant tout prélèvement sur les animaux (fermes, abattoir, pêcheurs...) ou dans l'environnement (jardin, sols contaminés par les déchets humains, eaux de puits...), l'autorisation était d'abord demandée aux responsables, qui donnaient leur consentement éclairé après explication de l'étude et les lois de protection animale étaient respectées.

4.9. Analyses et traitement des données

Les données ont été saisies avec Microsoft Word et Excel version 2013 et analysées avec le logiciel SPSS21, référencées par ZOTERO 5.0.65.

5. RESULTATS

5.1. Résultats globaux :

Nous avons effectué au total 958 prélèvements dont 628 chez les patients, 132 chez les animaux et 198 dans l'environnement. Nous avons isolé au total 37 souches de *Salmonella* dans ces prélèvements soit une fréquence de 3.86%.

Tableau VI : Fréquence d'isolement des souches de *Salmonella* selon leur origine de prélèvement.

Origine	Nombre de prélèvement	Nombre de souche de <i>Salmonella</i>	Pourcentage (%) d'isolement
Humaine	628	25	3,98
Animale	132	8	6,06
Environnementale	198	4	2,02
Total	958	37	3,86

Les Salmonelles ont été le plus isolée dans les prélèvements d'origine animale (6,5%)

5.2. Résultats descriptifs dans les prélèvements humains

5.2.1. Répartition des 25 souches de *salmonella* isolées chez l'homme

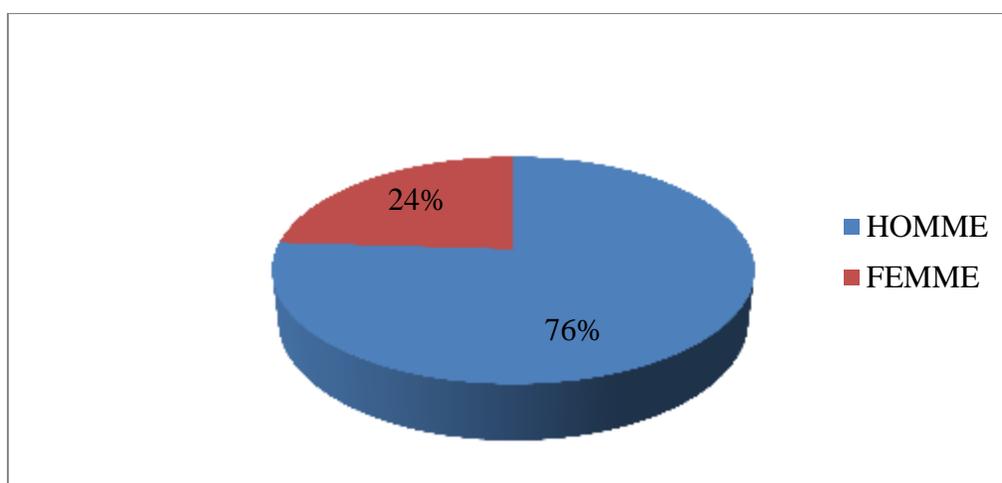


Figure 23 : La fréquence des souches de *Salmonella* isolées chez l'homme par rapport au sexe.

Les Salmonelles ont été retrouvées plus chez les hommes parmi la population infectée avec une fréquence de 76%. Le sexe ratio est de 3.17%.

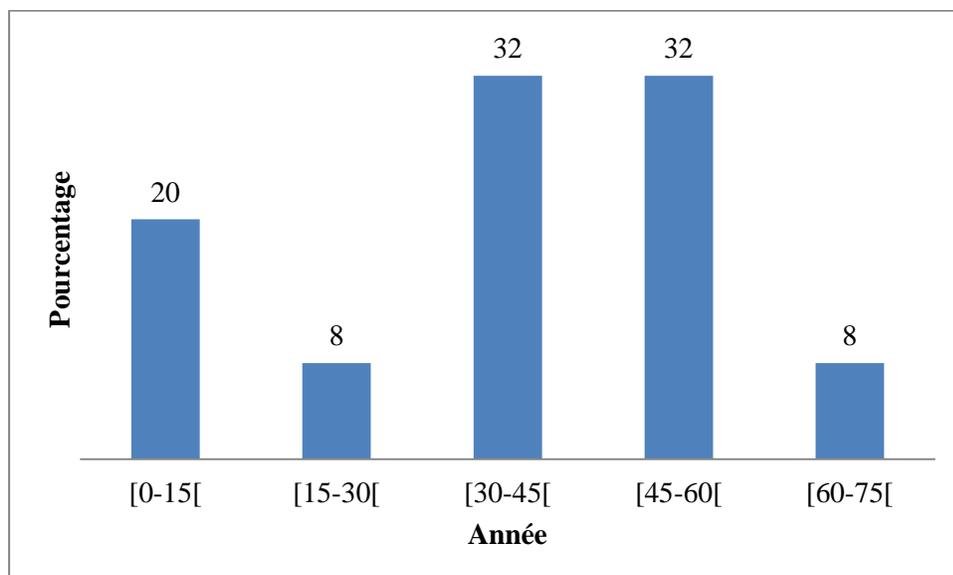


Figure 24 : Répartition des souches de *Salmonella* isolées selon les tranches d'âge des patients. La tranche d'âge de [30-60[ans était la plus représentée avec un pourcentage de **64%**.

Tableau VII : Fréquence d'isolement des souches de *Salmonella* selon les types de prélèvement humains.

Types de prélèvement	Nombre de prélèvement	Nombre de souche de <i>Salmonella</i>	Pourcentage d'isolement (%)
selles	254	23	9,05
sang	374	2	0,53
total	628	25	3,98

Les Salmonelles ont été le plus isolée dans les selles (9,05%) que dans le sang (0,53%)

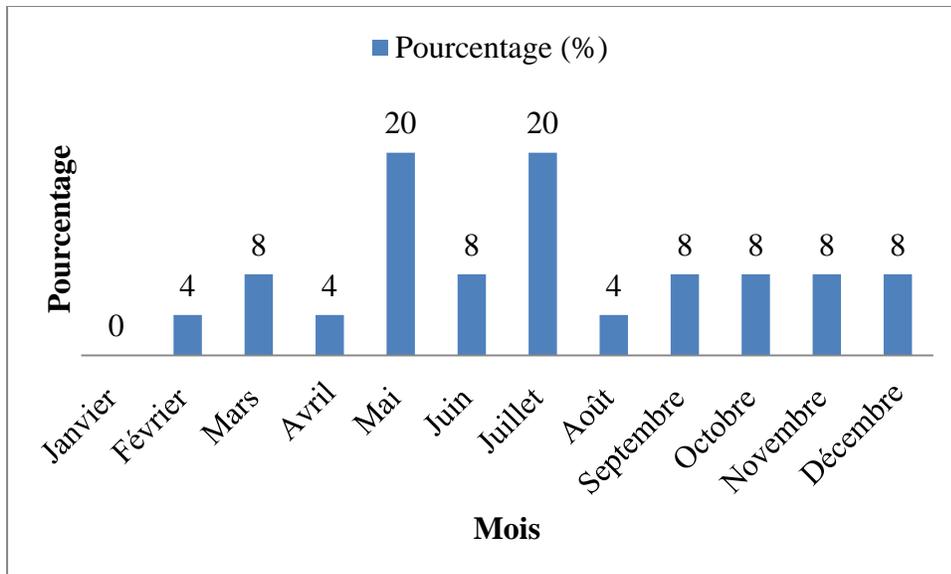


Figure 25 : Fréquence d'isolement de *Salmonella* chez les patients selon le mois.

La fréquence d'isolement de *Salmonella* a augmenté en Mai et en Juillet avec 20% pendant notre période d'étude.

5.2.2. Répartition des 8 souches de *Salmonella* isolées chez les animaux

Tableau VIII : Fréquence d'isolement des souches de *Salmonella* selon les types de prélèvement d'animaux.

Types de prélèvement	Nombre de prélèvement	Nombre de souche de <i>Salmonella</i>	Pourcentage d'isolement (%)
Fèces des poissons	30	0	0
Fientes des volailles	33	0	0
Mouches	15	4	26,66
Fèces des rats	27	0	0
Fèces des chiens	21	4	19,04
Total	132	8	6,06

Les souches ont été isolées dans les prélèvements des mouches (26,66%) et fèces des chiens (19,04%).

5.2.3. Répartition des 4 souches de *Salmonella* isolées dans l'environnement

Tableau IX : Fréquence d'isolement des souches de *Salmonella* dans l'environnement.

Types de prélèvement	Nombre de prélèvement	Nombres de souche de <i>Salmonella</i>	Pourcentage d'isolement (%)
Eaux de puits	30	2	6,66
Eaux de fleuve	34	0	0
Eaux de lido	4	0	0
Eaux usées	31	2	6,45
Eaux d'abattoir	12	0	0
Jardin potager	24	0	0
Sol avec déchet humain	51	0	0
Sol des marchés	12	0	0
Total	198	4	2,02

Les Salmonelles ont été isolées dans les eaux de puits (6,66%) et eaux usées (6,45%) dans l'environnement.

5.3.Profils de résistance des souches aux principales familles d'antibiotiques testés

5.3.1. Profils de résistance aux antibiotiques testés sur les 25 souches isolées chez les humains.

Tableau X : Fréquence de la résistance aux antibiotiques des 25 souches isolées chez les humains.

Antibiotiques	Sensibilités %	Résistances %	Effectif
Amoxicilline/ Acide clavulanique	96	4	25
Amoxicilline	96	4	25
Ticarcilline	100	0	25
Cefotaxime	100	0	25
Ceftazidime	100	0	25
Cefoxitine	100	0	25
Imipeneme	100	0	25
Acide nalidixique	100	0	25
Ciprofloxacine	96	4	25
Norfloxacine	100	0	25
Gentamicine	100	0	25
Tobramycine	100	0	25
Amikacine	100	0	25
Co-trimoxazole	100	0	25
Fosfomycine	100	0	25
Nitrofurantoin	88	12	25

Nous avons observé peu de résistance aux différents antibiotiques testés chez les souches d'origine humaine.

5.3.2. Profil de résistance aux antibiotiques testés sur les 8 souches de *Salmonella* isolées chez les animaux

Tableau XI : Fréquence de la résistance aux antibiotiques des 8 de *Salmonella* souches isolées chez les animaux.

Antibiotiques	Sensibilités %	Résistances %	Effectif
Amoxicilline/ Acide clavulanique	75	25	8
Amoxicilline	75	25	8
Ticarcilline	75	25	8
Cefotaxime	75	25	8
Ceftazidime	75	25	8
Cefoxitine	100	0	8
Imipeneme	100	0	8
Acide nalidixique	50	50	8
Ciprofloxacine	50	50	8
Norfloxacine	50	50	8
Gentamicine	100	0	8
Tobramycine	100	0	8
Amikacine	100	0	8
Co-trimoxazole	25	75	8
Fosfomycine	87,5	12,5	8
Nitrofurantoin	100	0	8

La résistance les plus élevées ont été observées pour la co-trimoxazole (75%), l'acide nalidixique (50%), la ciprofloxacine (50%) et la norfloxacine (50%).

5.3.3. Profil de résistance aux antibiotiques testés sur les 4 souches de *Salmonella* isolées dans l'environnement

Tableau XII: Fréquence de la résistance aux antibiotiques des 4 de *Salmonella* souches isolées dans l'environnement.

Antibiotiques	Sensibilités %	Résistances %	Effectif
Amoxicilline/ Acide clavulanique	100	0	4
Amoxicilline	100	0	4
Ticarcilline	100	0	4
Cefotaxime	100	0	4
Ceftazidime	100	0	4
Cefoxitine	100	0	4
Imipeneme	100	0	4
Acide nalidixique	75	25	4
Ciprofloxacine	75	25	4
Norfloxacine	100	0	4
Gentamicine	100	0	4
Tobramycine	100	0	4
Amikacine	100	0	4
Co-trimoxazole	50	50	4
Fosfomycine	100	0	4
Nitrofurantoin	100	0	4

Les taux de résistance les plus élevés ont été observés pour la co-trimoxazole (50%), l'acide nalidixique (25%) et la ciprofloxacine (25%).

5.4. Souches multi résistantes

Parmi les souches isolées pendant notre période d'étude, nous avons isolées :

2 souches multi résistantes à 9 antibiotiques chez les mouches (AMX, CTX, NOR, AMC, TIC, CIP, CAZ, STX, NAL)

Une souche multi résistante à 5 antibiotiques chez les mouches (NOR, FSF, CIP, STX, NAL)

Une souche multi résistante à 4 antibiotiques chez les mouches (NOR, CIP, STX, NAL)

Une souche multi résistantes à 3 antibiotiques dans l'environnement (CIP, STX, NAL)

5.5. Résultats comparatifs de la résistance des souches de *Salmonella* isolées aux antibiotiques testés selon les trois secteurs

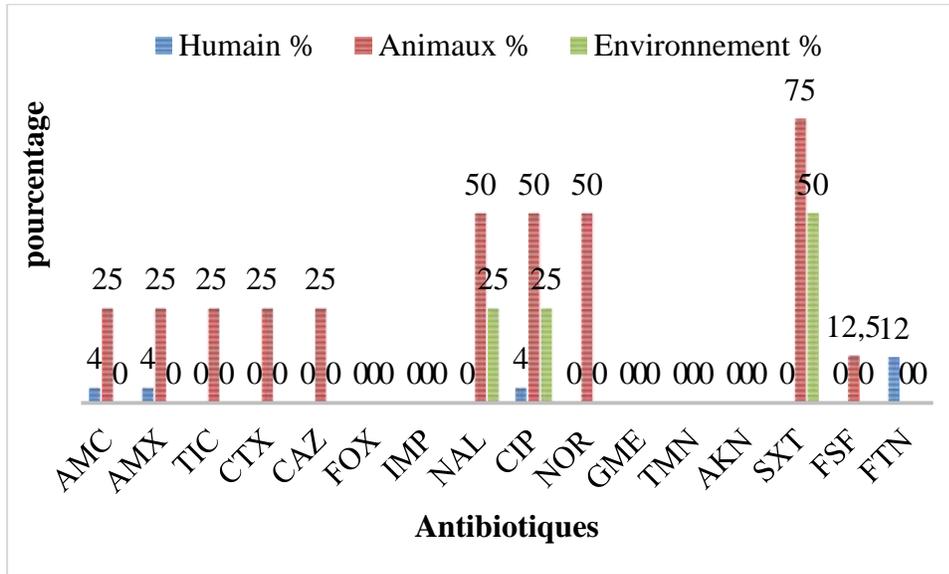


Figure 26 : Répartition des taux de résistance des souches de *Salmonella* aux antibiotiques testés isolées dans les trois secteurs.

Les résistances ont été les plus observées chez les animaux.

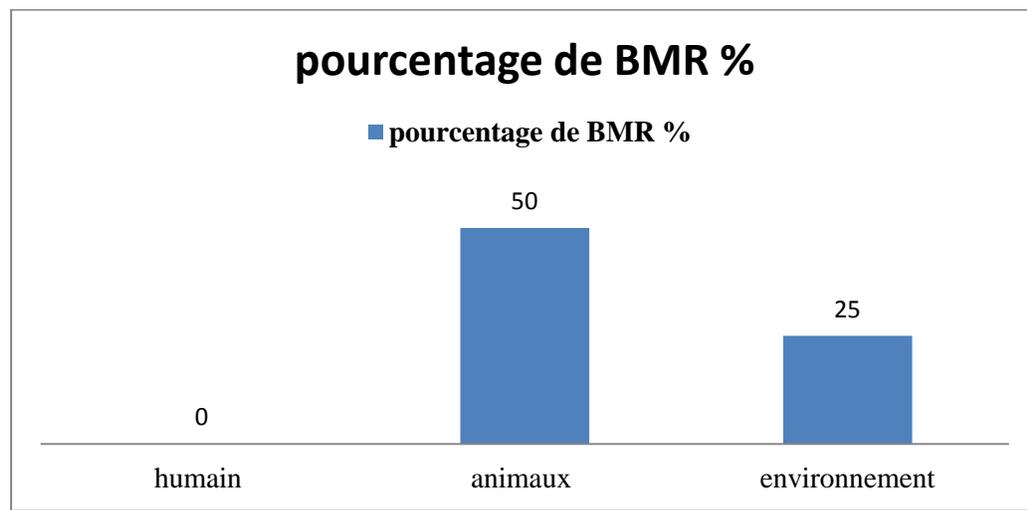


Figure 27 : Fréquence des souches multi résistantes isolées selon leurs origines de prélèvement. Les taux de multi résistance les plus élevés ont été observés chez les souches d'origine animale.

6. Discussion

6.1.Méthodologie

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 consistait à effectuer une étude transversale, prospective et descriptive du 1^{er} Janvier au 31 Décembre 2019 portant sur les patients du LRM, les animaux et l'environnement.

6.2.Fréquence

6.2.1. Données épidémiologiques des souches de *Salmonella* isolées chez l'Homme

L'analyse épidémiologie globale des souches de *Salmonella* isolées chez l'homme dans notre étude montre que nos données sont superposables à celles rapportées par **ATTAL M et al** (34) et **Ouar K et al** (35) en 2017 en Algérie qui ont retrouvés respectivement une prévalence de 3% et de 3,41% dans leurs études. Par contre nos résultats sont inférieurs à ceux rapportés par **IFTENE A et al** (35) en 2017 qui ont retrouvés une prévalence de 5% dans une étude réalisée en Algérie.

De façon spécifique, la prévalence des souches de *Salmonella* isolées des hémocultures dans notre étude était de 0,53%, cette valeur est inférieure à celle rapportée par **TRAORE S** (18) en 2013 au Mali qui retrouvait que 1,68% des souches de *Salmonella* isolées lors de son étude provenait des hémocultures. Dans une étude réalisée en Algérie en 2018 concernant la coproculture **HAFSA M et al** (35) ont rapporté une prévalence supérieure au notre. Ces différences observées pourraient être dues à la méthodologie utilisée pour l'enrôlement des patients mais aussi à l'environnement dans lequel habitent les patients.

Dans notre population d'étude, 76% des malades étaient des hommes contre 24% des femmes avec un sexe ratio est de 3,17%. Nos données étaient superposables à ceux rapportées par **MALLE A** (2) au Mali en 2018 et **IFTENE A et al** (35) en Algérie en 2018 qui trouvaient respectivement une prédominance masculine de 74% et de 72,7%. Mais contraire à ceux rapportées par **ATTAL M et al** (34) en Algérie en 2017 qui trouvaient une prédominance féminine de 66,66%.

6.2.2. Isolement de *Salmonella* chez les animaux

Des prélèvements réalisés chez les animaux, nous remarquons que la prévalence des souches de *Samonella* isolées chez les chiens de notre étude était supérieure à celles rapportées en Algérie par **BOUROUIS A et al** (36) en 2016 et par **GONZALEZ et al** (37) en 2016 à Madrid qui ont

retrouvé respectivement une valeur de 0,96% et 0,6%. Cela pourrait s'expliquer par les conditions de vie de ces animaux qui sont différentes selon le milieu. L'isolement des souches de *Samonella* chez les mouches dans notre étude était élevé. Ce constat a été fait par l'étude de **GIGA et al** (24) en 2018 qui ont décrit que l'une des bactéries la plus retrouvées sur les mouches était *Samonella enterica* qui est probablement cause d'intoxication alimentaire commune dans notre population.

6.2.3. Isolement de *Salmonella* dans l'environnement

En ce qui concerne l'isolement des souches de *Salmonella* dans l'environnement à partir des échantillons d'eau dans notre étude, cette présence de souches de *Salmonella* dans les eaux a été rapportée par **DJAOUA et al** (38) en 2018 au Cameroun à partir des eaux de puits de Garoua. Le même constat a été fait par **KASSIMI A** (39) en 2015 au Maroc dans les échantillons d'eaux reçues au laboratoire de microbiologie d'eau et d'aliments et par **HOUNSOUNOU E.O. et al** (40) en 2018 à Cotonou, qui a rapporté des prévalences plus élevées selon les saisons climatiques. Ces prévalences étaient de 73,33% pour la grande saison pluvieuse ; 56,67% pour la grande saison sèche ; 43,33% pour la petite saison pluvieuse et 40% pour la petite saison sèche.

6.2.4. Isolement de *Salmonella* selon leurs origines

Parmi les 3 secteurs, les Salmonelles étaient le plus isolées dans les prélèvements d'origine animale avec une prévalence de 6,5%. Cella est due au faite que la contamination par les excréments d'animaux porteurs étant très importante et peuvent disséminées les germes dans l'environnement (19). Donc on peut signaler que les animaux servent de réservoir des germes entre l'homme et l'environnement. Contre un taux de 3,9 chez les humains et 2,02 dans l'environnement.

6.3. Résistance aux antibiotiques des souches bactériennes isolées de notre étude

Pour les souches de *Salmonella* isolées des prélèvements humains 84% étaient sensibles à tous les antibiotiques. Parmi ceci 96% de ces souches étaient sensibles à la Ciprofloxacine. Ce résultat était supérieur à ceux rapportés par **TRAORE S** (18) en 2013 au Mali qui retrouvait 97,5% de sensibilité à cette molécule d'antibiotiques. Nous avons noté une bonne sensibilité de nos souches isolées aux quinolones, aux Céphalosporines et aux aminosides. Par contre nous avons constatez une diminution de la sensibilité des germes isolés à l'amoxicilline, à l'amoxicilline /Acide

clavulanique et nitrofurantoïne. **KASHOSI et al** (4) en 2018 ont retrouvé en RD Congo dans une étude portant sur la résistance, une bonne sensibilité aux quinolones, aux Céphalosporines et à l'amikacine.

Pour la résistance concernant les souches de *Salmonella* isolées des prélèvements provenant des animaux, nos données étaient supérieures à celles rapportées par **NOUICHI et al** (41) qui ont retrouvé une résistance aux antibiotiques qui variaient entre 1,19% à 65,05%. Cette résistance était de 17,8% pour les β -lactamines ; 32,14% pour les sulfamides ; 17,8% pour les quinolones et les céphalosporines et 22,69% de bactéries multi-résistantes à au moins 5 molécules d'antibiotiques. Cela pourrait être lié à l'utilisation irrationnelle des antibiotiques chez les animaux.

Pour les souches isolées de l'environnement, nous retrouvons que 50% de nos souches étaient résistantes à au moins un antibiotique, 50% au co-trimoxazole et 25% avaient une multi résistance à 3 antibiotiques. Nos résultats étaient superposables à ceux rapportés par **KASSIMI A** (39) qui retrouvait que 52% des souches isolées étaient sensibles à tous les antibiotiques testés avec 48,14% de résistance à au moins une molécule d'antibiotiques tandis que 19% des souches étaient multi résistantes à plusieurs antibiotiques.

7. Conclusion et recommandations

7.1. Conclusion

Notre étude a permis d'isoler au total 37 souches de *Salmonella* aussi bien chez l'humain, l'animal que dans l'environnement. Ces souches étaient plus fréquemment isolées chez les animaux. La fréquence des souches multirésistantes était également plus levés dans le secteur animal. Les souches d'origine humaine et environnementale ont présenté des bas niveaux de résistance aux différents antibiotiques testés.

7.2. Recommandation

❖ Au ministère de la santé

Il est urgent de mettre en place des programmes de surveillances efficaces, notamment pour :

- Mettre en place un programme national de lutte contre la résistance aux antimicrobiens
- Réglementer l'usage des antibiotiques en médecine humaine, vétérinaire et environnementale (agro-alimentaire).

❖ Les chercheurs

- Répertorier les sérotypes des Salmonelles circulant dans les secteurs humains, animal et environnemental.
- Mettre en place un centre de référence des salmonelles.

❖ La population

- Respecter les règles d'hygiène et d'assainissement
- Eviter l'automédication par les antibiotiques

REFERENCES:

1. Ali M, Nas FS. Salmonella Enterica Mechanisms of Overcoming Host Acquired Immune System: A Review. . I. 2018;8.
2. 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. these Phar, FaPH, Bamako 2018, 187 P
3. ISO 19250:2010(fr), Qualité de l'eau — Recherche de Salmonella spp. Disponible sur: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:19250:ed-1:v1:fr>, consulté le 8 juill 2019
4. Kashosi TM, Muhandule AB, Mwenebitu DL, Mihuhi N, Mutendela JK, Mubagwa K. Antibio-résistance des souches de Salmonella spp isolées d'hémocultures à Bukavu en RD Congo. Pan Afr Med J. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5987141/>, consulté le 5 août 2019
5. Crump JA, Mintz ED. Global trends in typhoid and paratyphoid Fever. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 15 janv 2010;50(2):241-6. consulted le 10/ 07/ 2019
6. Chabane Chaouch S, Mezhoud H. Isolement de bactéries résistantes aux antibiotiques à partir des effluents d'abattoirs de volaille. 26 juin 2018 ; Disponible sur: <http://172.17.1.105:8080/handle/123456789/12109>, consulté le 5 août 2019
7. Gis Sol » Les pathogènes dans les sols. Disponible sur: <https://www.gissol.fr/thematiques/pathogenes-53>. consulté le 08/07/2019
8. Tadesse B, Ashley E, Ongarello S, Havumaki J, Wijegoonewardena M, J. González I, et al. Antimicrobial resistance in Africa: A systematic review. BMC Infect Dis. 1 déc 2017;17:616. consulté le 05/08/2019
9. Fofana A. Etude de la resistance aux antibiotiques des souches de Salmonella sp et Esherichia coli isolees de la viande de poulet de chair au Sénégal [Mémoire de Diplôme D'études Approfondie, Es]. [Sénégal]: Universite Cheikh Anta Diop de Dakar; 2004. consulté le 02/01/2020

10. BACTÉRIE : Définition de BACTÉRIE. Disponible sur:
<https://www.cnrtl.fr/definition/bact%C3%A9rie>. consulté le 30 sept 2019
11. *Enterobacteriaceae*. In: Wikipédia 2019. Disponible sur:
<https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Enterobacteriaceae&oldid=159377273>. consulté
12 juill 2019
12. FRENEY J, RENAUD F, HANSEN W, BOLLET C. Précis de la Bacteriologie Clinique.
ESKA. rue du Quatre-Septembre-Paris: Alexandre Lacassagne; 2000. 1692 p. consulté le
30/07/1019
13. FMPMC-PS - Bactériologie - Niveau DCEM1 Disponible sur:
<http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.7.html>. consulté le 7 août
2019
14. Denis F, Ploy M, Martin C, Bingen E, Quentin R. Bactériologie médicale. ELSEVIER
MASSON SAS. 62 rue Camille-Desmoulins; 2007. 573 p.
15. Mlle Fatoumata Mariam Daffe. Surveillance de la résistance aux antimicrobiens des souches
de *Klebsiella Pneumoniae* isolées au Laboratoire Rodolphe Mérieux De 2016 A 2017 au
Mali. These Phar, FaPH, Bamako 2018, 114 P
16. Cazanave C. Bactériémie à entérobactéries productrices de BLSE : actualités. :66. consulté le
24/09/2019
17. Carle S. La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important ! Pharmactuel
2009; 42(0). Disponible sur:
<https://pharmactuel.com/index.php/pharmactuel/article/view/977>. consulté le 24 sept 2019
18. TRAORE Sounkarou. Typage des Souches de *Salmonella* isolées au Laboratoire De
Bactériologie CVD du Chu Gabriel Toure de Janvier 2011 à Juillet 2013. These Phar, FaPH,
Bamako 2013, 118P

19. *Salmonella*. In: Wikipédia 2019 Disponible sur:
<https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Salmonella&oldid=157104233>. Consulté le 8 juill 2019
20. Infections à *Salmonella* (non typhiques). Disponible sur: [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). Consulté le 8 juill 2019
21. *Salmonelle*: définition et explications [Internet]. AquaPortail. Disponible sur: <https://www.aquaportail.com/definition-3329-salmonelle.html>. Consulté le 4 sept 2019
22. Boubrit S, Boussad N. Détermination "in vitro " du pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'eucalyptus, myrte, clous de girofle et sarriette et leur application à la conservation de la viande fraîche type hachée. Memoire Online. 2007 [cité 4 sept 2019]. Disponible sur: https://www.memoireonline.com/10/11/4897/m_Determination-in-vitro--du-pouvoir-antibacterien-des-huiles-essentielles-deucalyptus-myrte-9.html
23. Intoxication par le poisson: quels sont les dangers? Doctissimo. Disponible sur: http://www.doctissimo.fr/html/nutrition/securite/nu_4282_poisson_intox.htm. Consulté le 8 juill 2019
24. Giga. Les mouches sont de véritables risques d'hygiène ambulants. StopNuisibles. 2018. Disponible sur: <https://www.rentokil.fr/blog/les-mouches-sont-de-veritables-risques-dhygiene-ambulants/>. Consulté le 3 févr 2020
25. Millemann Y. Le pouvoir pathogène des salmonelles: facteurs de virulence et modèles d'étude. BioMed Central. 1998;29(5):385-407. Consulté le 03/09/2019
26. FMPMC-PS - Résistances aux β -lactamines - Service de Bactériologie-Hygiène - Pitié-Salpêtrière Disponible sur:
<http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/resistlacta/POLY.Chp.17.html>. Consulté le 6 sept 2019
27. Silue N. Thermorésistance de trois serotypes de *salmonella* dans l'oeuf et les gesiers de poulets - Navoun SILUE. Memoire Online. 2005. Disponible sur:

<https://www.memoireonline.com/11/06/280/thermoresistance-salmonella-oeuf-gesiers-de-poulet.html>. Consulté le 11 sept 2019

28. HARIZI Khalil. Recherche et Identification des Bactéries Pathogènes *Salmonella* et *Listeria* dans les aliments. Université de Gabés; 2008. Disponible sur: https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/42/056/42056534.pdf. Consulté le 11 sept 2019
29. Les Salmonella. Disponible sur: <http://www.biologiemarine.com/micro/salmo.htm>. Consulté le 11 sept 2019
30. David J. Attribution des cas de salmonelloses humaines aux différentes filières de production animale en France. Adaptabilité et robustesse du modèle bayésien d'attribution par typage microbiologique. *Biologie cellulaire*. 2009;277 P. Consulted 17/09/2019
31. Wray C, Davies RH, Unit WHOVPH. Guidelines on detection and monitoring of salmonella infected poultry flocks with particular reference to salmonella enteritidis. 1994 ; Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66292>. Consulted 4 oct 2019
32. Antibiotique. In: Wikipédia 2019. Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Antibiotique&oldid=163265157>. Consulté le 8 oct 2019
33. Lassina Gadi TIMBINE. Etude des marqueurs moléculaires de la résistance aux antibiotiques des bactéries entériques isolées en Afrique de l'Ouest (Burkina Faso, Mali, Sénégal) [These De Doctorat]. [Dakar]: Université Cheikh Anta Diop De Dakar; 2014. 201 P
34. Attal Mohamed Salim Et Aouar Omar. Frequence des infections a *Salmonella* spp. chez l'Homme au niveau de l'hôpital Djilali belkhenchir (ex birtraria) AlgerSalm [Internet] [Diplôme de Docteur Vétérinaire]. [Algérie]: Université Saad Dahleb-Blida -01-; 2017. Disponible sur: <http://di.univ-blida.dz:8080/jspui/bitstream/123456789/2584/1/1594HTV-1.pdf>. Consulté le 5 mars 2020

35. Mr HAFSA Mohamed, Mr IFTENE Amine. Infections Digestives à Salmonella : Diagnostic et Résistance aux Antibiotiques. [Algérie]: Faculté Des Sciences De La Nature et de la Vie Département de Biotechnologie; 2018. 45 P
36. BOUROUIS Asma & BRAZANE Mira. Etude du portage fécal de souches d'entérobactéries productrices de carbapénèmases isolées d'animaux de compagnie [Master]. [Algérie]; 2016. 27 P
37. González-Torralba A, Oteo J, Asenjo A, Bautista V, Fuentes E, Alós J. Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Companion Dogs in Madrid, Spain. Antimicrob Agents Chemother. 2016;2499-501. Consulted 13/03/2020
38. Djaouda M, Gaké B, Hubert S, Togouet Z, Wadoube Z, Nola M, et al. Évaluation de la contamination par *Salmonella sp.* et *Vibrio cholerae* des eaux de puits de Garoua, Nord Cameroun. 1 janv 2018;224 P. Consulté le 03/02/2020
39. KASSIMI Aziza. Antibiorésistance des salmonelles d'origine alimentaire et environnementale reçus à l'INH entre 2006 et 2014 [Diplôme De Master Sciences Et Techniques]. [Université Sidi Mohammed Ben Abdellah Faculté des Sciences et Techniques]; 2015. 69 P
40. E.O. H, L. A-F, A.C. A, Tchibozo M. AD, D. M. Contamination Des Eaux De Puits Par Les Salmonelles Et Les Vibrions non-O1/non-O139 Dans Les Quartiers Précaires Du Sixième Arrondissement De Cotonou (Sud-Bénin). Eur Sci J ESJ. 28 févr 2018;14(6):252 P. Consulté le 30/07/2019
41. Nouichi S, Ouatouat R, Can HY, Mezali L, Belkader C, Korichi MO-, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella isolated from bovine and ovine samples in slaughterhouses of Algiers, Algeria. J Hell Vet Med Soc. 2018;69(1):863-72 P. Consulté le 04/03/2020

FICHE SIGNALITIQUE

NOM : SYLLA

PRENOM : HAWA

NATIONALITE : MALIENNE

ADRESSE : 00223 69363631

hsylla6936@gmail.com



TITRE : CARACTERISATION DES SOUCHES De *Salmonella spp* MULTIREsISTANTES ISOLEES CHEZ LES HUMAINS, LES ANIMAUX ET DANS L'ENVIRONNEMENT AU LRM DE BAMAKO.

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2019-2020

VILLE DE SOUTENANCE : Bamako - Mali

LIEU DE DEPOT : Bibliothèque de la Faculté de Pharmacie et de la Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomalogie de Bamako.

SECTEURS D'INTERET : Microbiologie, Santé Publique, Infectiologie, Industrie pharmaceutique.

RESUME

Introduction et objectifs : Les bactéries résistantes aux ATB ou leurs déterminants de résistance sont connus pour se transmettre des animaux aux humains directement ou via la chaîne alimentaire. Les entérobactéries sont pour la plupart des bactéries qui colonisent le tube digestif, on les retrouve chez l'homme, dans de nombreuses espèces animales et ainsi que dans l'environnement.

La présente étude avait pour objectif de Caractériser les souches de *Salmonella spp* multi résistantes isolées chez les humains, les animaux et dans l'environnement.

Les souches de *Salmonella spp* ont été isolée dans des échantillons humains (selle et sang), d'animaux (mouche et chien) mais aussi dans l'environnement à partir d'eaux de fleuve et d'eaux usées.

Matériels et Méthode : Des souches de *Salmonella spp* ont été isolées à partir des échantillons humains, animaux et de l'environnement par la méthode de bactériologie classique d'identification et de test de sensibilité. Le test de sensibilité aux antibiotiques a été réalisé selon la recommandation du CA-SFM 2019 à partir de l'automate Vitek2 compact.

Résultats : Notre étude s'est déroulée du 1^{er} janvier au 31 décembre 2019. Au total 37 souches de *Salmonella* ont été isolées à partir de 958 prélèvements soit une fréquence de 3,86%. Nous avons effectué 3,9% d'isolement sur 628 échantillons humains, 6,06% sur 132 échantillons animales et 2,02% sur 198 échantillons environnementaux.

Les résistances les plus élevées des souches de *Salmonella spp* isolées ont été observées chez les animaux vis à vis du cotrimoxazole (**75%**), de la quinolone (**50%**), des β -lactamines (**25%**) et des céphalosporines (**25%**). Ainsi (**50%**) des souches étaient multi résistants à 9 antibiotiques et (**12,5%**) à 5 antibiotiques ainsi qu'à 4 antibiotiques.

Dans l'environnement (**50%**) de nos souches étaient résistantes à au moins un antibiotique, (**50%**) des souches avaient une résistance vis à vis du co-trimoxazole et (**25%**) des souches avaient une multi résistance à 3 antibiotiques.

Les résistances les plus faibles ont été observées pour des souches isolées chez les humains. Ces souches avaient une résistance vis à vis de la nitrofurantoïne (**12%**), de l'amoxicilline (**4%**), l'amoxicilline-acide clavulanique (**4%**) et de la quinolone (**4%**).

Conclusion : La résistance aux antibiotiques n'épargne aucun des trois secteurs qui les utilisent. Elle est plus marquée dans le secteur animal car les antibiotiques sont plus utilisés et de façon irrationnelle chez les animaux.

Mots clés : *Salmonella*, résistance, antibiotiques, humains, animaux, environnement, Mali.

CARD-INDEX SIGNALITIC

NAME: SYLLA

FIRST NAME: HAWA

ADDRESS: 0022369363631

hsylla6936@gmail.com

COUNTRY OF ORIGIN: MALIAN

ACADEMIC YEAR: 2019 - 2020

POINT DISCHARGE: Library of Faculty Pharmacy and Faculty of Medicine and Odonto-Stomatology

TITLE: CHARACTERIZE THE MULTI-RESISTANT STRAINS OF *salmonella spp* ISOLATED FROM HUMANS, ANIMALS AND THE ENVIRONMENT

SECTION OF INTEREST: bacteriology, public health, infect ology, industry pharmaceutical

ABSTRACT

Introduction and objectives: Bacteria resistant to ATB or their resistance determinants are known to be transmitted from animals to humans directly or via the food chain. Enterobacteriaceae are mostly bacteria that colonize the digestive tract and are found in humans, many animal species and in the environment.

The objective of this study was to characterize multi-resistant strains of *Salmonella spp* isolated from humans, animals and the environment.

Strains of *Salmonella spp* have been isolated in human samples (stool and blood), animals (fly and dog) but also in the environment from river water and wastewater.

Materials and Method: Strains of *Salmonella spp* were isolated from human, animal and environmental samples by the standard bacteriological method of identification and susceptibility testing. The antibiotic sensitivity test was performed according to the recommendation of CA-SFM 2019 using the Vitek2 compact automaton.

Results: Our study took place from January 1 to December 31, 2019. A total of 37 strains of *Salmonella* were isolated from 958 samples, ie a frequency of 3.86%. We performed 3.9% isolation from 628 human samples, 6.06% from 132 animal samples and 2.02% from 198 environmental samples.



The highest resistance of the strains of *Salmonella* spp isolated was observed in animals against cotrimoxazole (75%), quinolone (50%), β -lactams (25%) and cephalosporins (25%). Thus (50%) of the strains were multi-resistant to 9 antibiotics and (12.5%) to 5 antibiotics as well as 4 antibiotics.

In the environment (50%) of our strains were resistant to at least one antibiotic, (50%) of the strains had resistance to co-trimoxazole and (25%) of the strains had multi-resistance to 3 antibiotics.

The lowest resistance was observed for strains isolated from humans. These strains had resistance to nitrofurantoin (12%), amoxicillin (4%), amoxicillin-clavulanic acid (4%) and quinolone (4%).

Conclusion: Antibiotic resistance does not spare any of the three sectors that use them. It is more marked in the animal sector because antibiotics are used more and irrationally in animals.

Keywords: *Salmonella*, resistance, antibiotics, humans, animals, environment, Mali.

ANNEXES

Annexe 1 : MODE OPERATOIRE DE L'UTILISATION DU VITEK 2 COMPACT

Rédigé le:	22/02/2013	Par : Sandrine	S	Visa :
Vérifié le:	25/03/2013	Par : Nana Kadidia KEITA	NK	Visa :
Approuvé le:	25/03/2016	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 :	25/04/2016			Version N° 1
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:

D:

E:

I – Buts

Décrire le mode d'utilisation du Vitek 2 Compact.

II - Domaines et personnels concernés

Secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utilisé cet appareil.

III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

IV – Références

Manuel d'utilisation du Vitek 2 Compact

V – Contenu

MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU VITEK 2 COMPACT

1. Principe

Le système Vitek 2 Compact est destiné à l'identification des bactéries et levures, ainsi qu'à la réalisation d'antibiogrammes pour les bactéries significatives au plan clinique. Le système comprend l'instrument Vitek 2 Compact, un ordinateur et une imprimante.

Le logiciel fourni par le système Vitek 2 Compact inclut des programmes d'analyses, de gestion de données et un système de contrôle de qualité afin de valider le kit test du Vitek 2 Compact.

2. Mode opératoire

- Prendre le flacon eau saline Vitek 2, introduire la dispensette ;
- Prendre des tubes secs pour Vitek 2, y introduire dans les puits de la cassette ;
- La cassette peut prendre jusqu'à 10 tubes soit 2x5 (identification+ antibiogramme) ;
- Mettre dans chaque tube, 3ml de la solution saline du Vitek 2 à l'aide de la dispensette préalablement réglée à 3 ml.

N.B : Pour un germe, deux tubes secs seront utilisés dont l'un servira à l'identification et l'autre à l'antibiogramme ;

- Sur une feuille vierge, porter la date et le numéro de l'échantillon ainsi que le nom approximatif du germe à identifier ;
- A partir de la culture pure sur gélose (culture jeune 24 h), à l'aide d'une oese, prélever quelques colonies et les introduire dans le tube sec contenant la solution saline ;
- Homogénéiser la suspension et bien vortexer ;
- A l'aide du densitomètre, mesurer la concentration bactérienne à **0,5 McFarland** ;
- Poser le tube contenant la suspension bactérienne en première position et faire suivre celui prévu pour l'antibiogramme ;

- Préparer la solution pour antibiogramme :
 - Si la bactérie à identifier est à :

Gram positif, utiliser la micropipette calibrée à 280µl (bleue), Gram négatif, utiliser la micropipette calibrée à 145µl (rouge) ;

- A partir de la suspension bactérienne, pipeter en fonction de la nature du germe suspecté (BGN ou BGP) et diluer dans 3ml d'eau saline contenu dans le tube voisin. On aurait ainsi préparé la suspension pour l'antibiogramme.
- Placer la carte d'identification (soit GN, soit GP ou YST) et la carte pour l'antibiogramme (soit AST- N, soit SST- P ou AST- Y) en fonction de la nature du germe sur la cassette.

NB : différentes cartes utilisables :

- Streptocoques et entérocoques : ID : GP 67, réf 22226 ; ATB : AST-P 586, réf 22276 o Staphylocoques: ID GP: réf 21342. ATB : AST-P 580, réf 22233
- ID GN : réf 21341 ; ATB : non entérobactéries : AST- 222, réf 413083 ; entérobactéries : AST-N 233, réf 413117 o Levures : ID : YST, réf 21343 ; ATB : AST-YS01, réf 22108
- Au niveau de l'ordinateur de l'automate, à l'apparition de la page principale ; o Cliquer sur Vitek 2
 - Mettre Identifiant : **labsuper**, le mot de passe : **labsuper** o Cliquer sur gérer la cassette virtuelle o Créer une cassette virtuelle o Identification de la cassette 1,2,...
 - Lecture du code à barre de chaque carte à partir de la douchette o Saisir les données de l'isolat ;
 - Entrer les informations de l'isolat (numéro attribué au laboratoire, nom du germe si déjà identifié par d'autres techniques)
- Puis enregistrer les données de la cassette virtuelle
- Au niveau de l'automate Vitek 2 Compact,
- Ouvrir le capot de remplissage et insérer la cassette à l'intérieur de la chambre ;
- Fermer le capot de remplissage ;
- Appuyer sur la touche **Lancer remplissage**, un bip indique que le cycle de remplissage est terminé ;
- Retirer la cassette du capot de remplissage et l'introduire dans la chambre de lecture où s'effectue le scellage. le processus de chargement/déchargement permet la lecture du code à barre des cartes et le code à barre de la cassette ;

- Lorsque le message **retiré** s'affiche dans la chambre de lecture, cela indique que le Vitek 2 a terminé le traitement des cartes contenues sur la cassette. On peut la retirer en ouvrant **le capot chargement** puis le refermer ;
- On attend le jour suivant où les résultats seront imprimés.

3. Résultats

Le Vitek 2 Compact est un appareil qui permet d'identifier les germes et de réaliser l'antibiogramme puis d'interpréter les phénotypes de résistances acquise et naturelle puis la sensibilité naturelle du germe.

Exemple : les bêtalactamases des entérobactéries (*Klebsiella*, *E. coli*), *S.aureus* résistant à méthicyline et vancomycine, *Pseudomonas* résistant à l'imipenème...et les phénotypes des souches sauvages (le germe sensible à tous les antibiotiques testés excepté les sensibilités naturelles).

4. Gestion des déchets

- **Retrait des cartes éjectées :**

Pour éjecter une carte, le Vitek 2 Compact la retire du carrousel/incubateur, la présente au lecteur de cartes et la dépose dans le récipient collecteur de déchets. Le réceptacle collecteur de déchet peut contenir jusqu'à 60 cartes, il est recommandé de contrôler régulièrement le niveau du réceptacle collecteur de déchet et le vider.

- **Retrait du réceptacle collecteur de déchet :**

- Ouvrir le capot du récipient collecteur de déchets. Noter que les cartes usagées sont stockées à l'intérieur du réceptacle ;
- Retirer le réceptacle collecteur de déchet de la station de travail en tirant sur le bord avant, vers soi ;
- Jeter les cartes usagées dans la poubelle de déchets contaminés ;
- Remettre en place le réceptacle collecteur de déchets en le faisant glisser vers l'intérieur ; o Fermer le capot du récipient collecteur de déchets.

Le Vitek 2 Compact réinitialise le compteur de déchets si le réceptacle est entièrement vidé.

Annexe 2 : 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

MODE:

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.

3.1. 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	3 ans après la fin de leur utilisation
Traçabilité AQ	Fiche de vie Mini Api	Laboratoire Bactériologie	Pendant la durée de vie de l'appareil et 3 ans après
Document fabricant	Manuel d'utilisation et Manuel Instrument Mini Api	Laboratoire Bactériologie	Pendant la durée de vie de l'appareil et 3 ans après

Annexe 3 : 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

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

VI

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 30secondes ;
- 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 négatif : coloration rose
- Bactéries Gram positif : coloration violette
- Levures : forme ovale coloration violet

Annexe 4: 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

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).

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'autooxydation et améliorer la stabilité du réactif. Cette formulation est basée sur la formule de la réactive oxydase de Kovac.

Matériel

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

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.

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.

Contrôle de qualité

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

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

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

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.

Résultat

- **Lecture et interprétation** o L'apparition en 10 à 30 secondes d'une coloration allant de violet à pourpre indique un test positif.
 - o 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.*

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 5 : 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- 004 V1

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

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 cytobactériologique 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 μ 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 10µl 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.

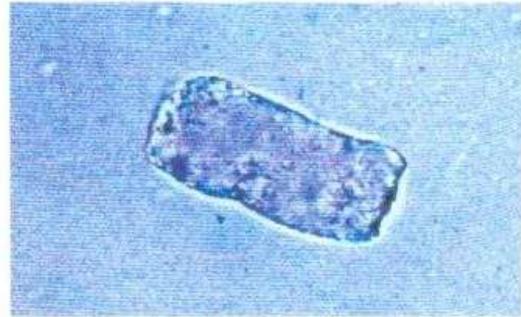


Fig. 12. - Cireux.

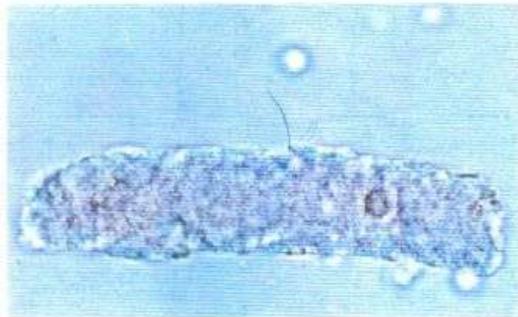


Fig. 13. - Granuleux.

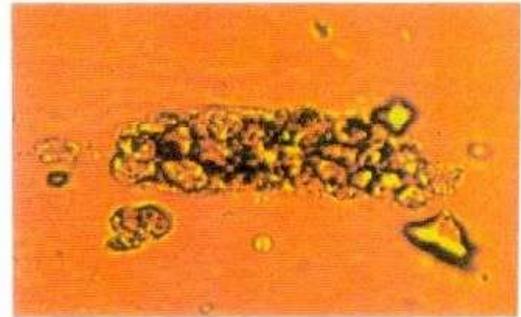


Fig. 14. - Leucocytaire.

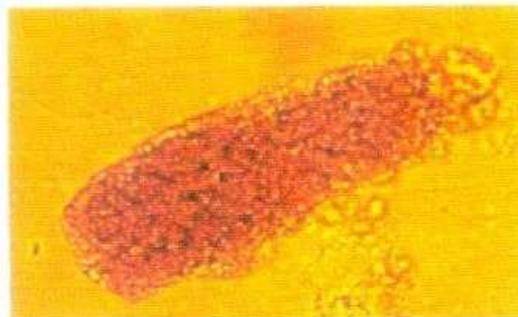


Fig. 15. - Hémoglobinique.

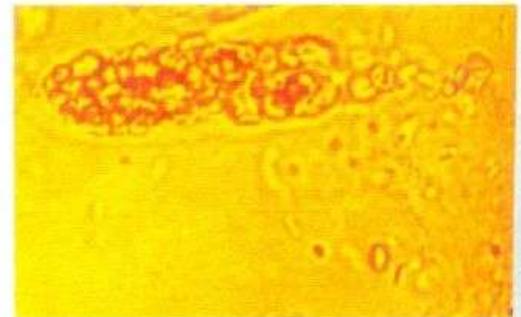


Fig. 16. - Hématique.

CRISTAUX À L'EXAMEN DIRECT



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

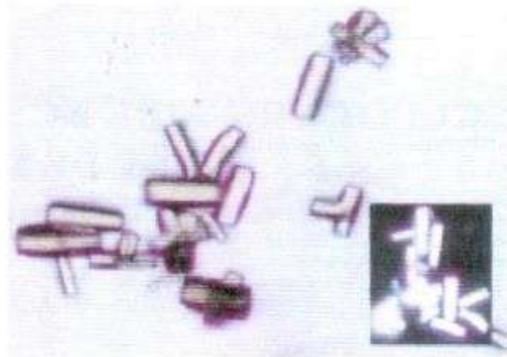


Fig. 2. - Acide urique (direct + lumière polarisée).



Fig. 3. - Urate.



Fig. 4. - Phosphate amorphe.



Fig. 5. - Oxalate de calcium.

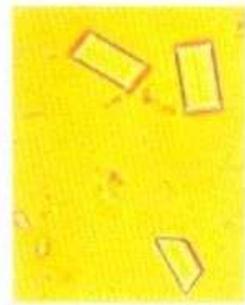


Fig. 6. - Phosphate ammoniaco-magnésien.



Fig. 7. - Cholestérol.

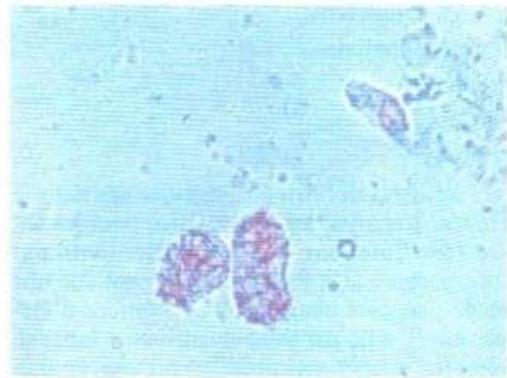


Fig. 8. - Bilirubine.

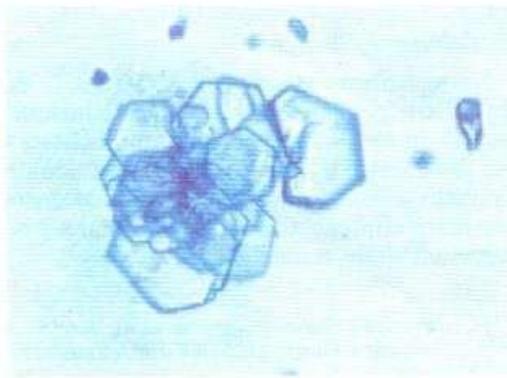


Fig. 9. - Cystine.

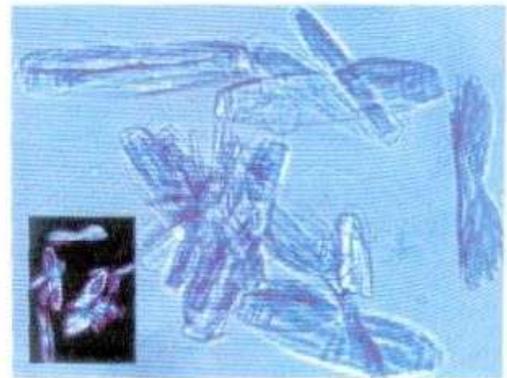
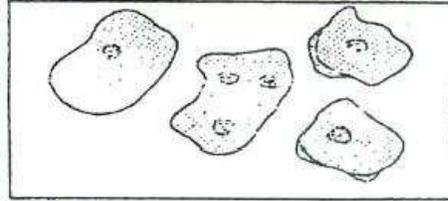
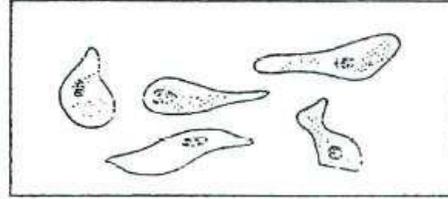


Fig. 10. - Cristaux médicamenteux.

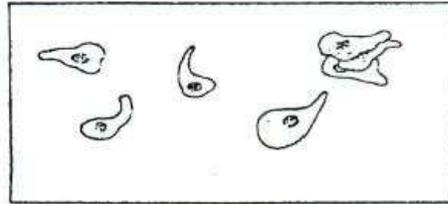
1. **Cellules épithéliales**
 1. *Cellules épithéliales pavimenteuses*
 Grandes cellules rectangulaires de desquamation (arrachées aux épithéliums qui recouvrent les voies et organes urinaires). Elles proviennent:
 - de l'urètre
 - ou du vagin.



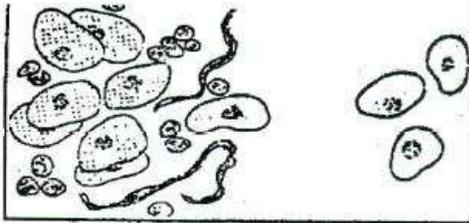
2. *Cellules de la vessie*
 Grandes cellules souvent en losange, avec un noyau bien distinct.



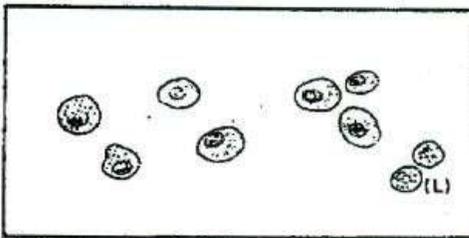
3. *Cellules du bassinnet*
 Cellules de taille moyenne (comme 3 leucocytes), granuleuses avec une sorte de queue.



- 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.



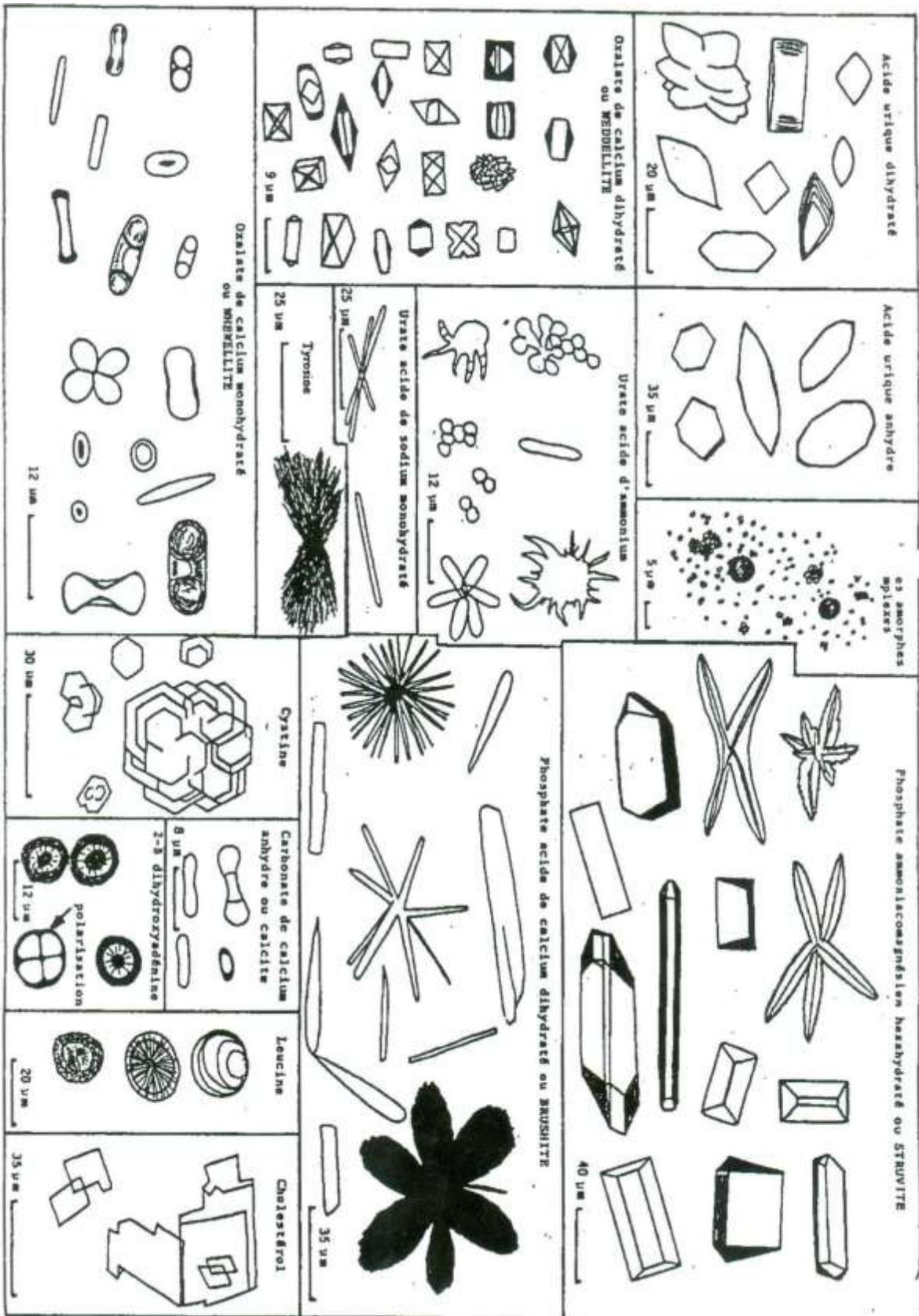


PLANCHE DE CRISTAUX URINAIRES.

- 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 :

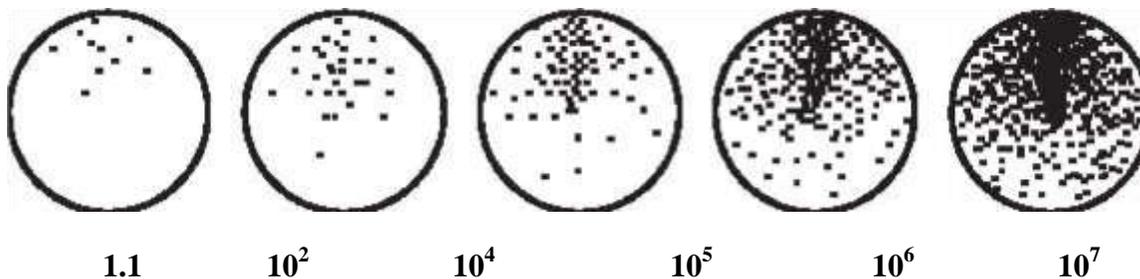
- Ne pas toucher les zones réactives de la bandelette,
- La plonger dans l'urine et la retirer immédiatement en éliminant l'excès d'urine en tapotant légèrement la tranche de la bandelette sur le bord du récipient.
- La tenir horizontale pour éviter toute interférence avec les réactifs des plages voisines.
- 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°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/mm ³	<10 ²	Urine normale, non infectée
>10/mm ³	>10 ²	Infection urinaire, habituellement mono microbienne, et poly microbienne chez un porteur d'une sonde à demeure
< 10/mm ³	>10 ²	Discordance entre absence de réaction cellulaire et bactériurie: infection débutante, contamination, infection sur terrain particulier
< 10/mm ³	10 ² à 10 ⁵	Contamination, prélèvement incorrecte. Un nouveau prélèvement est nécessaire
>10/mm ³	< 10 ²	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**

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

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

Cocci à Gram positif : faire la catalase et la coagulase Cf. **Mode opératoire du test de la coagulase**

Réf. M07 ANA BAC- 023 V1

Coloration bleue : réaliser un examen microscopique :

Bacille à Gram négatif : il y a forte présomption de bactérie appartenant au groupe K.E.S.C (*Klebsiella –Enterobacter – Serratia- citrobacter*) ; faire une identification par l'automate Vitek 2 Compact ou Mini Api

Cocci à Gram positif: forte présomption d'Entérocoque

Coloration brune : Forte présomption d'une bactérie appartenant au groupe *Proteus-ProvidenciaMorganella*.

Dans tous les cas de colorations, on procèdera à une identification sur l'automate Vitek 2 Compact suivi d'un antibiogramme. Les identifications et les antibiogrammes s'accompagnent toujours d'une pureté sur un milieu de culture en fonction du germe.

Un antibiogramme est obligatoirement réalisé si le dénombrement signe une infection urinaire et lorsqu'on possède des colonies isolées des bactéries responsables (obtenues en 24h).

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

V1 Antibiogramme réalisé sur le Mini Api

Le Mini Api nous sert à l'antibiogramme des bactéries à oxydase positive telles que *Pseudomonas aeruginosa* et les streptocoques du groupe B.

- Pour *Pseudomonas aeruginosa* ou les *Streptocoques du groupe B*, prendre une carte de lecture de *Pseudomonas aeruginosa* ou streptocoque sur laquelle on notera le numéro d'identification du patient ;
- Prendre un flacon de solution de Na Cl à 0,85% ;
- Casser le bout du flacon ;
- A l'aide d'une oese prendre avec 2 à 3 colonies isolées sur la gélose ;
- Introduire l'oese dans le flacon contenant la solution de Na Cl à 0,85% ;
- Frotter la partie de l'oese sur laquelle les colonies ont été prélevées dans le flacon jusqu'à obtenir une suspension homogène ;
- Prendre 10 µl de cette suspension qu'on introduira dans une solution ATB Médium pour *Pseudomonas aeruginosa* ou 200 µl de cette suspension dans une solution ATB S Médium pour les *Streptocoques du groupe B* ;
- Distribuer successivement 135 µl de cette solution qu'on va introduire dans chaque puits de la galerie ;
- Fermer ensuite la galerie et la mettre dans un bocal qu'on laissera à incubation à 37° pendant 24h à l'étuve ;
- Le lendemain matin prendre la galerie et l'introduire dans l'automate Mini Api pour l'antibiogramme en suivant les différentes instructions de l'automate.

A la fin de l'identification et l'établissement de l'antibiogramme, on procède dans le cas où on observe des germes multi résistants au souchage des bactéries concernées :

- *Salmonelles*
- *Staphylococcus aureus* (Méthicyline, Vancomycine Résistants)
- *Klebsiella pneumoniae*
- *E. coli*
- *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 paillasses ;
- 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.

7.3. 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

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 6 : MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE DU LIQUIDE D'ASCITE

Rédigé le:	25/02/2005	Par : Al Hadji SIDIBE	AS	Visa :
Vérifié le:	03/03/2005	Par : Dr Louis DEWEERDT	LD	Visa :
Approuvé le:	04/03/2005	Par : Fatou Traoré FAYE	FTF	Visa :
Modifié le:	01/08/2013	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Vérifié le :	02/08/2016	Par : Nana Kadidia KEITA	NK	Visa :
Approuvé le:	10/08/2016	Par : Dr Madiné TALL TOURE	MTT	Visa :
Mise en application :	08/09/2016			Version N° 2
Date de revue :	08/08/2017			
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: 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 d'ascite.

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 D'ASCITE

1. But

L'examen cyto bactériologique du liquide d'ascite est essentiellement considéré ici dans le cadre des infections des cirrhoses. Il peut y avoir également surinfection au cours d'une dissémination sanguine bactérienne. L'ascite peut également être le point de départ d'une bactériémie.

2. Principe

Le liquide d'ascite est une ponction faite aseptiquement au niveau de la fosse iliaque gauche, après toilette de la peau au savon liquide, dégraissage à l'éther, puis désinfection avec un antiseptique fort comme l'alcool iodé. 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 ;
- Conteneur de déchets contaminés ; Plaque chauffante.

4. Consommable

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

5. Réactif

- Colorant de GRAM ;
- Bouillon (cœur-cervelle) ;
- 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 macroscopique

Aspect du liquide : clair, trouble etc.

[]

Gélose Cos  + gélose chocolat sous CO2.

S

Si liquide purulent gélose Anaérobie.

Ensemencement des milieux de

culture

Si présence de levures à l'examen direct

Sabouraud + cloramphénicol.



Numération des leucocytes et
hématies

Après homogénéisation, faire la numération
Sur cellule de kovas. Si nécessaire, diluer dans
De l'eau physiologique.

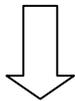


Centrifugation

3500 rpm pendant 5 minutes

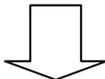
Faire deux lames du culot pour

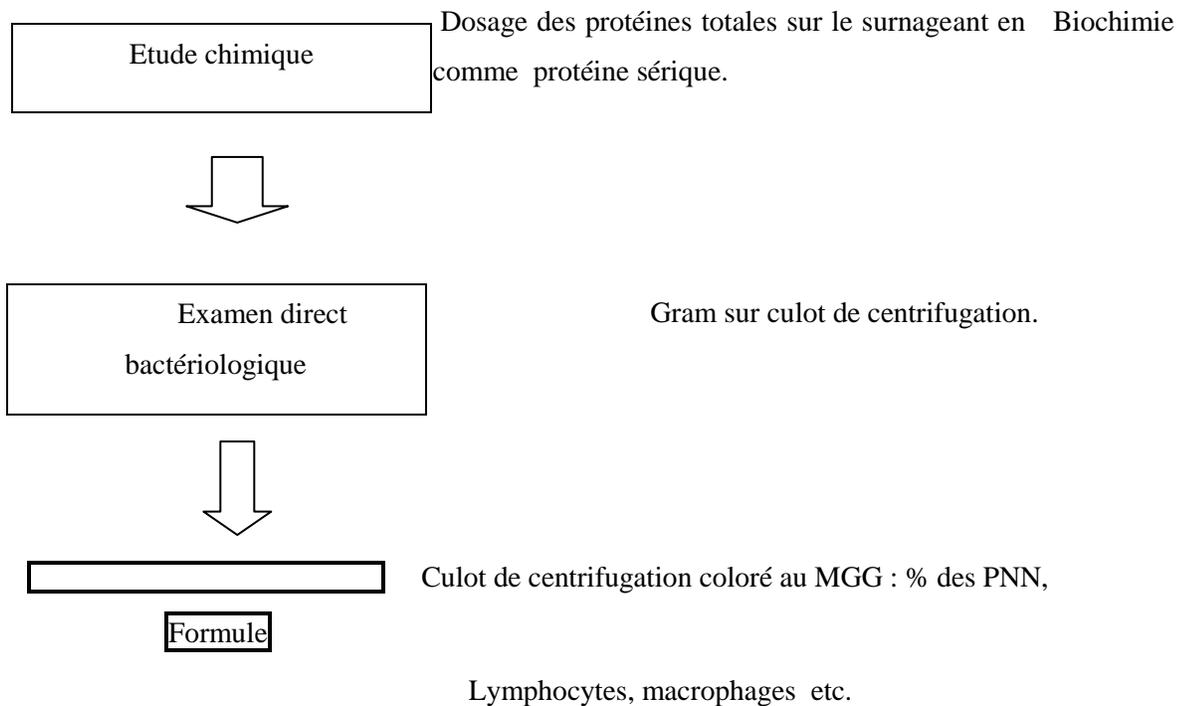
Gram et coloration MGG



Aspect du surnageant

Clair, trouble, citrin, hémolysé, xanthochromique etc.





7.2. Incubation

L'incubation s'effectue à 37°C sous CO₂ 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 ou 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 systématique dans l'eau de javel à 12° chlorimétrique. Les objets tranchants sont jetés dans une boite 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 7 : 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

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 – Contenu

MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN

BACTERIOLOGIQUE DES PUS ET ABCES

MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN

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

- 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. M07 ANA BAC- 021 V1**

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

1.3. Culture

- Les différents milieux de culture sontensemencés en fonction du Gram lu :
 - o Gélose au sang (COS), incubée à 37°C sous CO2,
 - o Gélose chocolat, incubée à 37°C sous CO2,
 - o Gélose au sang, incubée à 37°C en anaérobiose,

- Drygalski, incubé en aérobiose (si bacilles au Gram négatif), o Chapman, incubé en aérobiose,
- Sabouraud, incubé en aérobiose (en fonction du prélèvement), o CAN 2, incubé en aérobiose, o Mueller Hinton, incubé en aérobiose, o 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 CO2 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

1.2 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.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des Pharmaciens, et de mes condisciples :

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

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

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

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

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

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

Je le jure !