

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA FIEVRE TYPHOÏDE



Dr. Souleymane DIALLO
CHU Gabriel Touré



PLAN

1. DIAGNOSTIC DIRECT

1.1. HEMOCULTURES

1.2. COPROCULTURES

1.3. SEROTYPAGE

2. DIAGNOSTIC INDIRECT (WIDAL- FELIX)



1. DIAGNOSTIC DIRECT

Il faut toujours chercher à isoler le germe pour :

- sa caractérisation précise ;
- une enquête épidémiologique ;
- une étude de sa sensibilité aux antibiotiques.

1.1. HEMOCULTURE

- Utile lors des fièvres typhoïde et paratyphoïdes
- Positive dans 90% des cas pendant le 1^{er} septénaire, 75% au 2^e septénaire, 40% au 3^e septénaire voire 10% au 4^e septénaire.
- Peut être positive dans les gastro- entérites du jeune enfant et exceptionnellement dans les gastro- entérites de l'adulte.



1. DIAGNOSTIC DIRECT (suite)

1.2. COPROCULTURES.

- A faire parallèlement à l'hémoculture.
- Les salmonella sont faibles dans les selles par rapport aux Escherichia et Proteus d'où l'usage de milieux sélectifs et d'enrichissement.
- Examen lent, manque de sensibilité mais est le seul capable de déceler des porteurs sains.
- Prélèvements : Selles à tout stade de l'infection.
- Milieux : Bouillon Muller Kaufmann, Rappaport (enrichissement)
- Milieux gélosés : Mc Conkey, SS, Hectohen.



IDENTIFICATION DES SOUCHES DE SALMONELLA

- BGN ;
- S'ils sont mobiles, sont péritriches ;
- Poussent sur milieux ordinaires ;
- Poussent en aérobiose et en anaérobiose ;
- Réduisent les Nitrates en Nitrites ;
- Ont une réaction d'Oxydase Négative ;
- Utilisent le Glucose par voie fermentative.



CARACTERES BIOCHIMIQUES DES SALMONELLA

1. **Absence** de fermentation du Lactose ;
2. **Absence** de Beta- Galactosidase (ONPG -), d'Uréase et de production d'indole ;
3. Bactéries mobiles ;
4. Produisent du H_2S et ont une Lysine Décarboxylase (LDC +).

Exception : H_2S Négatif

Salmonella Typhi : Vi Positif



1. DIAGNOSTIC DIRECT (suite)

IDENTIFICATION DES SOUCHES DE SALMONELLA

Caractères biochimiques

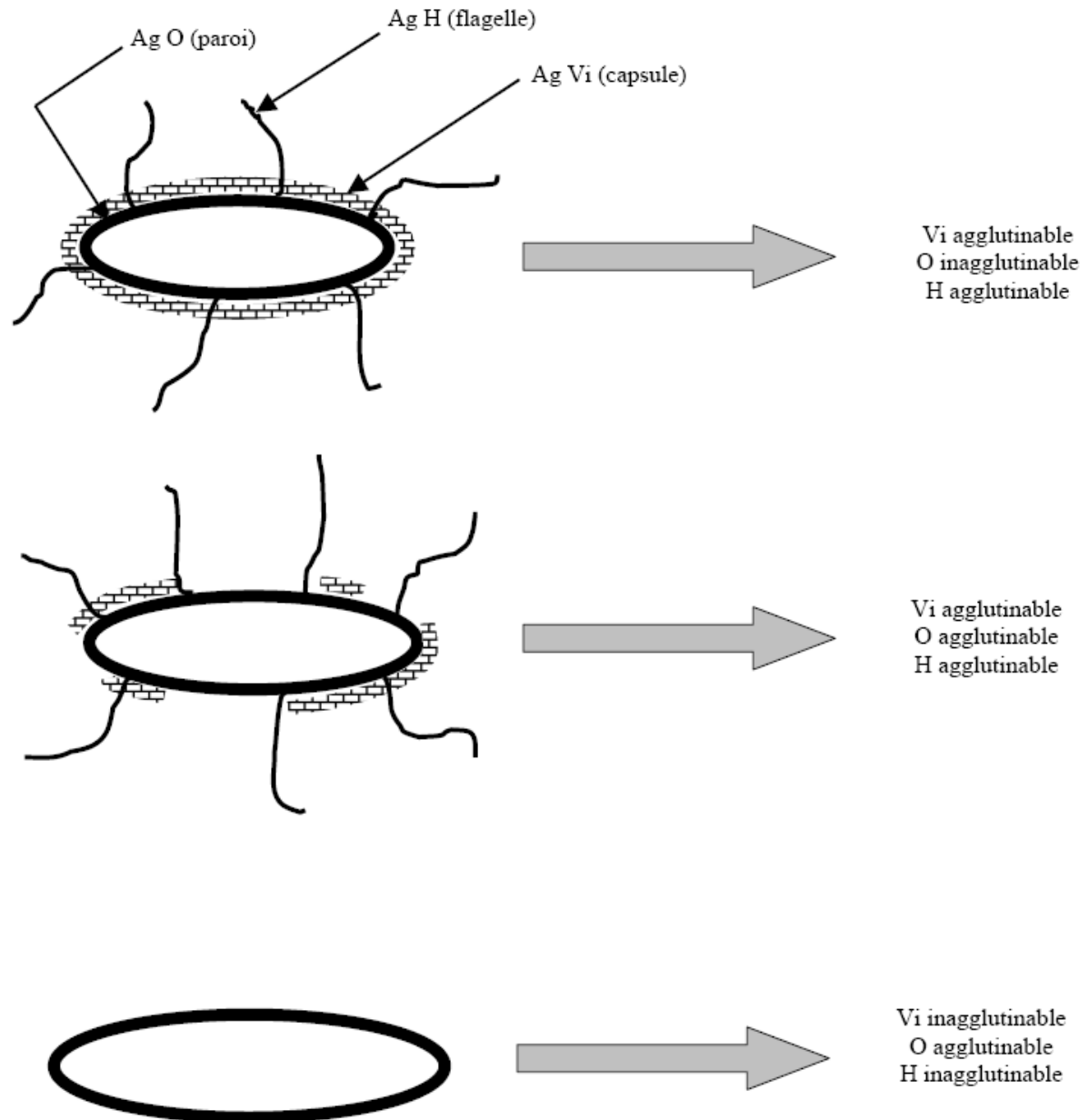
- Diagnostic différentiel avec d'autres espèces ou sous-espèces de *Salmonella* et avec d'autres enterobactéries comme *Citrobacter*, *Proteus*.

1.3. SÉROTYPAGE

Diagnostic des Sérotypes ou Sérovars par agglutination avec des sérums spécifiques anti- O anti- H et anti-Vi



LES ANTIGENES UTILES AU SEROTYPAGE DES *SALMONELLA*





EXTRAIT DU TABLEAU DE KAUFFMANN – WHITE

Exemples de Sérotypage

Exemple 1 : Salmonella groupe A.

- Type : **Salmonella Paratyphi A.** (en Afrique)
- Antigènes O : 1, 2, 12.
- Antigènes H : phase 1 = a ; Absence de phase 2.

Exemple 2 : Salmonella groupe C.

- Type : **Salmonella Paratyphi C.** (Extrême Orient)
- Antigènes O : 6, 7, [Vi].
- Antigènes H : phase 1 = c ; phase 2 = 1, 5.

Exemple 3 : Salmonella groupe D.

- Type : **Salmonella Typhi.** (Cosmopolite).
- Antigènes O : 9, 12, [Vi].
- Antigènes H : phase 1 = D ; Absence de phase 2.



1. DIAGNOSTIC DIRECT (suite)

IDENTIFICATION DES SOUCHES DE SALMONELLA (suite)

Caractérisation des souches par géotypage :

- PCR- ADN, Electrophorèse et Identification des séquences spécifiques :
- **Exemple** : PCR Methode to identify Salmonella enterica serovars Typhi, Paratyphi A and B among Salmonella isolates from the blood of patients with clinical enteric fever.



PCR Method To Identify *Salmonella enterica* Serovars Typhi, Paratyphi A, and Paratyphi B among *Salmonella* Isolates from the Blood of Patients with Clinical Enteric Fever[▽]

Haim Levy,^{1,2} Souleymane Diallo,³ Sharon M. Tennant,¹ Sofie Livio,¹ Samba O. Sow,³ Milagritos Tapia,^{1,3} Patricia I. Fields,⁴ Matthew Mikoleit,⁴ Boubou Tamboura,³ Karen L. Kotloff,¹ Rosanna Lagos,⁵ James P. Nataro,¹ James E. Galen,¹ and Myron M. Levine^{1*}

Center for Vaccine Development, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland 21044¹; Israel Institute for Biological Research, Ness Ziona, Israel²; Centre pour le Développement des Vaccins, Bamako, Mali³; National Salmonella Reference Laboratory, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia 30333⁴; and Centro para Vacunas en Desarrollo, Hospital de Niños Roberto del Río, Servicio de Salud Metropolitano Norte, Santiago, Chile⁵

Received 18 January 2008/Returned for modification 3 March 2008/Accepted 11 March 2008

PCR methodology was developed to identify *Salmonella enterica* serovars Typhi, Paratyphi A, and Paratyphi B. One multiplex PCR identifies serogroup D, A, and B and Vi-positive strains; another confirms flagellar antigen “d,” “a,” or “b.” Blinded testing of 664 Malian and Chilean *Salmonella* blood isolates demonstrated 100% sensitivity and specificity.

Identification of the serovars of *Salmonella* isolated from blood cultures, the lynchpin of enteric fever surveillance, is problematic in developing countries. Classical methods require high-quality O grouping and H typing antisera, reagents that can be difficult to obtain consistently. Accordingly, reference and research laboratories in developing countries, as in industrialized countries, are turning to multiplex PCR methods as a consistent, high-throughput approach to typing etiologic agents (1, 3, 25, 26). We utilized three sequential PCRs to identify the three classical pathogens that cause enteric fever, *Salmonella* serovars Typhi, Paratyphi A, and Paratyphi B, as an alternative to serotyping. An O grouping multiplex PCR identifies groups A, B, and D, based on described primers (12, 20). An H typing multiplex developed for this work identifies phase 1 H types “a,” “b,” and “d.” A third PCR uses primers described below to identify serovar Paratyphi B biovar Java that ferments *d*-tartrate (*dT*) (22). The sequential PCR methodology is robust and amenable to high throughput for use in research and reference laboratories in developing countries.

Classical *Salmonella* serovar Typhi reference strains expressing H antigen (d) and unusual strains expressing antigen “j” are listed in Table 1, along with reference *Salmonella* serovar Paratyphi A and B strains and 24 “negative control” strains of other serovars.

Two sets of putative *Salmonella* strains isolated from blood cultures of febrile patients were tested. One set included 443 isolates obtained from blood cultures of 431 febrile patients at l’Hôpital Gabriel Touré in Bamako, Mali, in the course of systematic surveillance for bacteremia and invasive bacterial disease among patients younger than 16 years of age with fever, who were admitted to the hospital or seen in the emer-

gency room (6, 27). Strains initially identified in the clinical microbiology laboratory of the Centre pour le Développement des Vaccins, Bamako, Mali (CVD-Mali), as *Salmonella* serotype Typhi, Paratyphi A, or Paratyphi B or as *Salmonella* species were shipped to CVD-Baltimore for bacteriological confirmation. The second set was 34 putative *Salmonella* serovar Paratyphi A and 189 *Salmonella* serovar Paratyphi B strains isolated from blood cultures of patients in the course of surveillance for enteric fever in Santiago, Chile (4, 8, 9, 15–18).

The serovars of the vast majority of Malian and Chilean isolates were identified at CVD-Baltimore by agglutination with O grouping (Denka Seiken Co. Ltd, Japan) and H typing antisera (Sifin Institute, Berlin, Germany) (5, 7); remaining isolates were serotyped by the CDC *Salmonella* Reference Laboratory. CVD-Baltimore and CDC clinical microbiology results were the “gold standard” against which the performance of the multiplex PCR methods was compared to assess their sensitivity, specificity, and positive predictive value.

The 5′ to 3′ sequences for the various primers and the sizes of the expected amplicons are presented in Table 2. To ensure that the absence of PCR products was not a failure in the PCR per se, an internal control (P1 and P2 that amplify *oriC* (23) was incorporated into the system (13). The primers in the O serogrouping multiplex have previously been described (12, 20), but heretofore were used in two distinct protocols. We combined these primers into a single multiplex PCR by optimizing primer concentration, annealing temperature, and elongation time.

The H typing primers were designed by using sequences from GenBank (accession numbers AE014613, X03393, and AY649698) so that the sizes of the DNA fragments would enable facile recognition on 1 or 2% agarose gels. The primers *dT*-for and *dT*-rev detect the gene encoding the proficient active enzyme that allows *dT* fermentation by the Java biovar (22).

Three bacterial colonies were suspended in 100 μl of double-distilled water in 0.5-ml PCR tubes. Tubes were placed in

* Corresponding author. Mailing address: Center for Vaccine Development, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland 21044. Phone: (410) 706-7588. Fax: (410) 706-6205. E-mail: mlevine@medicine.umaryland.edu.

[▽] Published ahead of print on 05/08/08.



2. DIAGNOSTIC INDIRECT (Widal – Félix)

Utile seulement pour le diagnostic tardif des fièvres typhoïde et paratyphoïdes.

2.1. Indications.

- - Chez le client vu tardivement, ayant bénéficié d'une antibiothérapie à l'aveugle.

Faire en plus Hémoculture et Coproculture.

2.2. Principe et réalisation.

- Rechercher dans le sérum des malades les agglutinines correspondants aux antigènes somatiques O et aux antigènes flagellaires H de Salmonella Typhi et des Salmonella Paratyphi A, B et C.



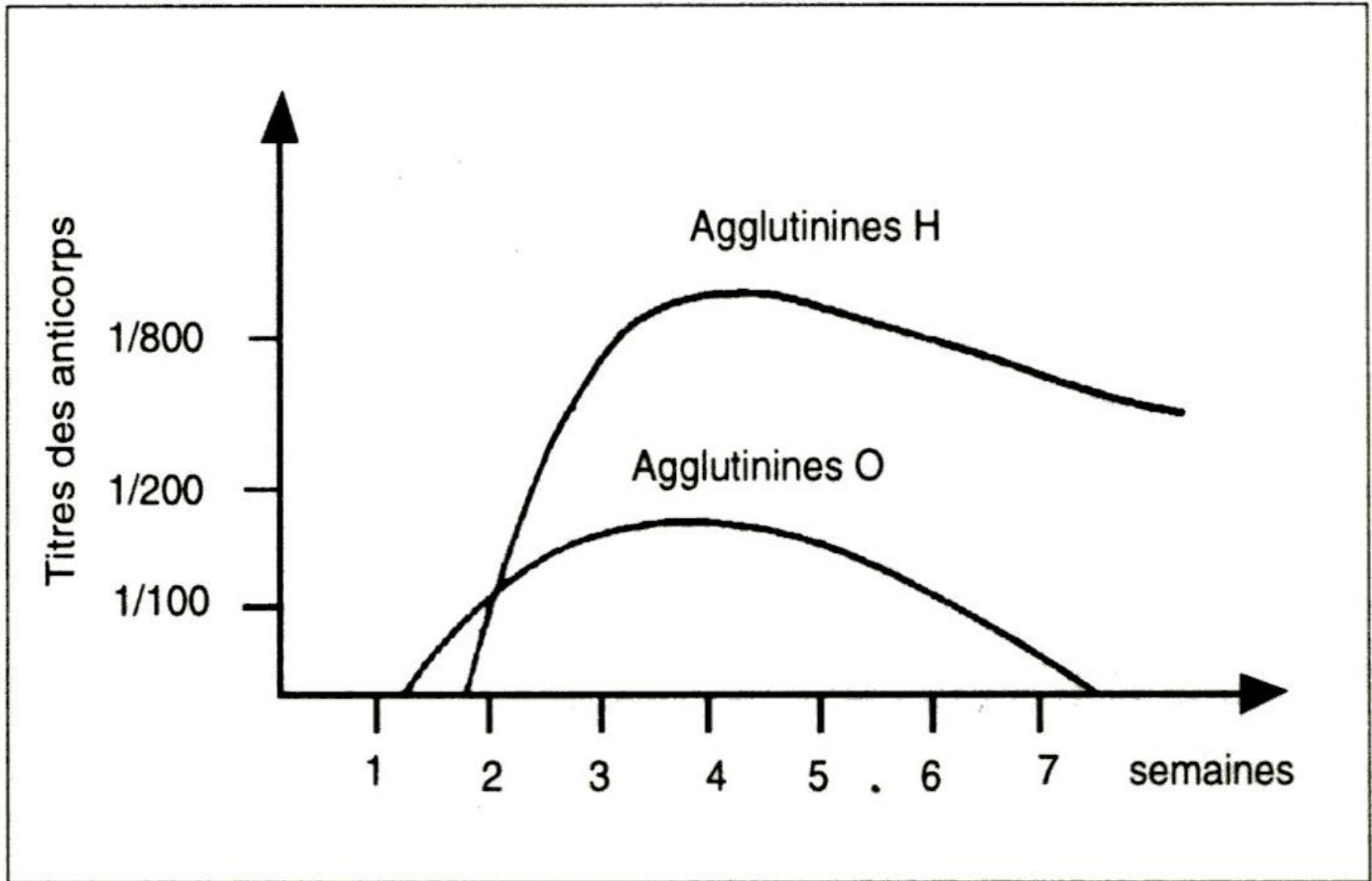
2. DIAGNOSTIC INDIRECT (SUITE)

2.3. Résultats normaux.

- Les agglutinines O apparaissent vers le 8^e jour de la maladie et les agglutinines H vers les 10^e - 12^e jour.
- A la période d'état, il y a simultanément des agglutinines O et H.
- Les titres sont : $TO = 1/200$ et $TH = 1/800$
- Les agglutinines O disparaissent normalement en 2 à 3 mois alors que les H persistent plusieurs années (après une infection ou une vaccination).
- Seule la présence d'agglutinines O témoigne d'une infection récente.



Evolution du titre des agglutinines au cours des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes





2. DIAGNOSTIC INDIRECT (SUITE)

2.4. Résultats faussement positifs.

- Présence d'agglutines TO seules : Possibilité pour *Salmonella Typhi* ou *Salmonella Enteritidis*.
- Présence d'agglutines BO seules : Possibilité pour infection à *Salmonella Typhimurium* ou certaines souches de *Yersinia pseudotuberculosis*.
- Des réactions faussement positives au cours de : paludisme, typhus exanthématique, dysglobulinémies (myélomes, collagénoses, cirrhoses) et infections diverses par d'autres entérobactéries, par des virus (HIV, HSV...), les rickettsioses.



2. DIAGNOSTIC INDIRECT (SUITE)

2.5. Résultats faussement négatifs

- Pendant le 1^{er} septénaire de la maladie.
- Un traitement précoce par des antibiotiques ou des corticoïdes peut empêcher l'élévation du taux des anticorps.

2.6. Se rappeler toujours.

- Un résultat négatif ne veut pas dire absence de fièvres typhoïde ou paratyphoïdes.
- Il n'y a pas de relation entre le titre des agglutinines et la gravité de la maladie.



SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

- - Pour le traitement des fièvres typhoïdes :
Thiamphénicol, Ampicilline, Triméthoprime-Sulfaméthoxazole par voie orale
- Céftriaxone et Fluoroquinolones ont une excellente activité et réduisent le temps de traitement.
- NB : Souches résistantes ont été observées en Thaïlande, au Tadjikistan, au Viêtname et au Pakistan.
- Pour les autres formes : Fluoroquinolones



QUELQUES DONNEES DU LABORATOIRE

- **DIABATE C.F.M.** Fréquence d'isolement des Salmonella Typhi et Paratyphi A, B, et C au laboratoire de Bactériologie CVD au CHU Gabriel Touré de 2002 à 2004.

Thèse Pharmacie. 2006. Bamako. Mali

- Total Hémocultures : 5494

- Germes isolés : 1492 dont

- *Streptococcus pneumoniae* : 293
- *Haemophilus influenzae* type b : 233
- Salmonella spp : 147
- Salmonella Typhi : 89
- Salmonella Paratyphi A : 02
- Salmonella Paratyphi B : 32*
- Salmonella Paratyphi C : 02



QUELQUES DONNEES DU LABORATOIRE (suite)

- **2. SADESSI M.**

Evaluation du rôle des Salmonella (*Salmonella* spp) autres que *Salmonella* Typhi et Paratyphi A, B, et C en milieu pédiatrique à partir des liquides biologiques prélevés et examinés au laboratoire de Bactériologie CVD au CHU Gabriel Touré.

- **Thèse Pharmacie.** 2007. Bamako. Mali



QUELQUES DONNEES DU LABORATOIRE (suite)

- 3. **MALLE D.** Typage des souches de Salmonella isolées au laboratoire de bactériologie CVD au CHU Gabriel Touré de janvier 2005 à mai 2006.
- **Thèse Pharmacie.** 2008. Bamako. Mali
 - Total : 192 souches isolées
 - Identification par sérotypage : Salmonella Typhi = 25% ; Autres groupes D = 12,5% ; Salmonella Paratyphi A = 1,6% ; Salmonella Paratyphi B = 32% ; Salmonella Paratyphi C = 2,1% ; Autres Salmonella = 26%
 - Identification par génotypage : Salmonella Typhi = 25,5% ; Salmonella Typhimurium = 37% ; Salmonella Dublin = 13,5% ; Salmonella Stanleyville = 12,5% ; Salmonella Enteritidis = 6,2% ; Autres Salmonella = 4,7%

The image shows two white analytical balances with blue accents on a laboratory bench. The balances have their lids open, revealing the weighing pans. The text 'Mettler' is visible on the side of the front balance. In the background, a microscope is visible on the bench. The text 'Merci de votre attention!' is overlaid in the center of the image.

Merci de votre attention!