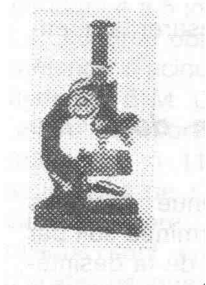


**APPORT AU DIAGNOSTIC ET EVALUATION DE LA PRATIQUE DU
SERODIAGNOSTIC DE WIDAL ET FELIX DANS LES LABORATOIRES
D'ANALYSES MEDICALES DE COTONOU**



AFFOLABI D*, BANKOLÉ H**, AGBLA M**, VIWAMI F**, ANAGONOU S*.

* Faculté des Sciences de la Santé, 01 BP 188 Cotonou, Bénin

** Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, Bénin

Auteur correspondant: Dissou Affolabi Faculté des Sciences de la Santé 01 BP 188 Cotonou
Tel : 21 33 15 33 Email : affolabi_dissou@yahoo.fr

RESUME

Le sérodiagnostic de Widal et Félix est le test de confirmation biologique des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes le plus répandu au Bénin. Mais son apport au diagnostic et les conditions réelles de sa pratique dans les laboratoires d'analyses médicales ne sont pas connues. Dans le but d'évaluer cette pratique, nous avons réalisé une étude prospective transversale dans 13 laboratoires d'analyses médicales de Cotonou. De plus, nous avons testé de façon prospective avec la méthode de référence, 1000 échantillons consécutivement reçus au Laboratoire de Microbiologie du Centre National Hospitalier et Universitaire Hubert Koutoukou Maga (CNHU-HKM) de Cotonou.

Nous sommes parvenus aux principaux résultats suivants :

- . Il y a une multitude de réactifs dont l'utilisation n'est pas contrôlée par le Ministère de la Santé.
- . Les techniques utilisées varient d'un laboratoire à l'autre et parfois à l'intérieur d'un même laboratoire. Les recommandations du fabricant des tests sont parfois modifiées pour amoindrir le coût du test.
- . Aucun des laboratoires visités n'interprète les résultats du test selon les recommandations du fabricant.
- . Chez les patients reçus au CNHU-HKM, le taux de positivité du test est de 8,1% et *Salmonella* Typhi est le sérotype le plus souvent rencontré.

Il est nécessaire de mettre en place au niveau national, un système efficace de contrôle des réactifs, ainsi qu'une évaluation externe régulière de la qualité des laboratoires d'analyses médicales.

Mots clés : Fièvre typhoid, laboratoires, Widal

SUMMARY

The Widal and Felix test is the test commonly used for typhoid and paratyphoid fever diagnosis in Benin. However, its contribution to the diagnosis and actual practice in medical laboratories are unknown. To assess this practice, we performed a cross-sectional prospective study in 13 medical laboratories in Cotonou. In addition, 1000 samples consecutively received in the Microbiology Laboratory of The University Teaching Hospital Hubert Koutoukou Maga (CNHU-HKM, Cotonou) were analyzed, using the reference method.

We found that:

- . They were in laboratories, various brands of reagents, not controlled by The Ministry of Health.
- . Techniques used are different between laboratories and sometimes within a laboratory. Manufacturer's procedures have sometimes been modified to lower the cost of the test.
- . No laboratory interpreted the results according to the manufacturer's instructions.
- . In the Microbiology Laboratory of The University Teaching Hospital Hubert Koutoukou Maga, the positivity rate of the test was 8.1% and *Salmonella* Typhi was the most common serotype.

It is necessary to set up at national level, a well functioning system for management of reagents as well as a regular external quality assessment of medical laboratories.

Key words :Typhoid fever, laboratory, Widal

INTRODUCTION

Alors qu'elles sont devenues rares dans les pays industrialisés, les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes restent un problème de santé publique dans les pays à faible revenu où l'hygiène collective et individuelle est souvent défectueuse. Ces infections liées au péril fécal

et qui sont dues aux bactéries du genre *Salmonella*, sont surtout endémiques en Asie du Sud-Est et en Afrique Sub-Saharienne [1]. Grâce à l'affinement des techniques d'études antigéniques, on dénombre actuellement plus de 2500 sérotypes de *Salmonella* qui infectent de nombreuses espèces animales [2]. Chez

l'homme, les principaux sérotypes rencontrés sont *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A, *Salmonella* Paratyphi B et *Salmonella* Paratyphi C.

Le diagnostic biologique de certitude repose sur l'isolement du germe responsable par hémoculture ou coproculture, à condition que ces examens soient réalisés au moment indiqué [3]. En effet, l'hémoculture est en général positive au premier septénaire d'évolution de la maladie tandis que la coproculture devient positive de façon inconstante plus tard. Mais dans les pays à faible revenu où sévissent ces infections, l'hémoculture et la coproculture sont rarement disponibles et le diagnostic est souvent basé sur le sérodiagnostic de Widal et Félix, de réalisation *a priori* plus facile. Cependant, son interprétation n'est pas toujours ai-

sée et la non maîtrise des contours de la technique de réalisation de cet examen et surtout de son interprétation peut conduire à une prise en charge inappropriée de ces infections avec le risque surconsommation d'antibiotiques ou *a contrario* de complications graves comme les perforations intestinales [4].

Au Bénin, bien qu'il soit le test de confirmation biologique des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes le plus répandu, sa contribution au diagnostic et les conditions réelles de sa pratique dans les laboratoires d'analyses médicales ne sont pas connues. L'objectif de cette étude est donc d'évaluer l'apport de ce test au diagnostic des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes et sa pratique dans les laboratoires d'analyses médicales à Cotonou.

MATERIEL ET METHODES

Cette étude s'est déroulée d'une part, dans les laboratoires périphériques de la ville de Cotonou, choisis sur une liste disponible au Ministère de la Santé, sur la base de leur charge élevée de travail et d'autre part dans le laboratoire de microbiologie du Centre National Hospitalier Universitaire Hubert Koutoukou Maga (CNHU-HKM) de Cotonou. Elle a comporté deux parties.

La première partie s'est déroulée dans les laboratoires de Cotonou ayant une importante charge de travail. Au total, 18 laboratoires ont été identifiés. Il s'agit d'une étude prospective, transversale et descriptive qui s'est déroulée du 15 janvier au 19 mai 2006. Nous avons inclus dans cette étude, les laboratoires situés à Cotonou, réalisant le sérodiagnostic de Widal et Félix et fréquentés par un grand nombre de patients. Grâce aux registres disponibles dans les laboratoires et en collaboration avec les techniciens de ces laboratoires, nous avons rempli le questionnaire d'étude élaboré pour analyser la réalisation et l'interprétation du sérodiagnostic de Widal et Félix dans lesdits laboratoires.

La seconde partie de l'étude a eu lieu au laboratoire de microbiologie du CNHU-HKM de Cotonou. Il s'agit d'une étude prospective, transversale et descriptive qui s'est déroulée du 23 novembre 2005 au 17 mars 2006. Elle a

porté sur les patients consécutivement reçus au laboratoire de microbiologie du CNHU-HKM pour sérodiagnostic de Widal et Félix. Après administration d'un questionnaire, un prélèvement veineux a été réalisé chez ces patients et la recherche d'anticorps dirigés contre les antigènes somatiques O et flagellaires H de *Salmonella* Typhi et Paratyphi A, B et C, a été effectuée dans le sérum en utilisant le kit Bio-rad® (Marnes-la-Coquette, France) et suivant selon les recommandations du fabricant. Pour tout résultat positif, le titre en anticorps du sérum a été déterminé. Ce titre correspond à l'inverse de la plus forte dilution donnant encore lieu à une agglutination. Un titre en anticorps anti-O du sérum ≥ 200 est considéré comme significatif et signe une infection en cours d'après les recommandations du fabricant. En revanche, le titre en anticorps anti-H est significatif lorsqu'il est ≥ 400 .

Les données ont été saisies et analysées avec le logiciel epi info version 6. 04

RESULTATS

Sérodiagnostic de Widal et Félix dans les laboratoires de Cotonou

Parmi les 18 laboratoires identifiés, 13 (72%) ont accepté de participer à l'étude. Deux des 5 laboratoires qui ont refusé de participer à l'étude n'ont pas motivé leur refus. En revanche, les trois autres laboratoires ont évoqué la non réalisation de l'examen due à une rupture du stock de réactifs, pour expliquer leur refus d'y participer. Tous les types de structure ont été représentés parmi les 13 laboratoires : 4 laboratoires publics, 4 laboratoires privés à but non lucratif et 5 laboratoires privés à but lucratif. Dans les laboratoires, 7 différents réactifs ont été recensés. Certains laboratoires utilisaient parfois deux ou trois réactifs différents. La fréquence d'utilisation de ces réactifs selon les laboratoires est résumée dans le tableau I.

Tableau I : Réactifs utilisés dans les laboratoires

Réactifs	Nombre de laboratoires utilisant le réactif	Pourcentage (%)
Biorad[®]	10	55,4
Cypress[®]	02	11,1
Spin React[®]	02	11,1
Cromatest[®]	01	05,6
Omega[®]	01	05,6
Human AG[®]	01	05,6
SD Bioline[®]	01	05,6
Total	18	100

Tous les réactifs permettent une analyse semi-quantitative par agglutination du titre des anticorps anti-O et anti H, à l'exception du réactif SD Bioline[®] qui est une bandelette basée sur un principe immuno-chromatographique, et dont les résultats sont qualitatifs.

Les techniques utilisées variaient suivant les laboratoires et même à l'intérieur d'un même laboratoire, plusieurs techniques pouvaient être utilisées. Plus de la moitié des laboratoires (7 laboratoires : 53,8%) utilisaient la technique d'agglutination en tubes.

La technique d'agglutination sur plaque n'était utilisée que par 2 laboratoires (15,4%), le reste des laboratoires utilisaient les deux techniques (3 laboratoires : 23,1%) ou les bandelettes (1 laboratoire : 7,7%)

Parmi les 13 laboratoires enquêtés, plus des 2/3 (9 laboratoires : 69,2%) avaient modifié la technique du fabricant par réduction du volume du réactif et du sérum soit au 1/2 ou au 1/4.

Par ailleurs, seuls 8 laboratoires (61,5%) faisaient une interprétation des résultats du sérodiagnostic et parmi eux, aucun n'interprétait les résultats selon les recommandations du fabricant.

Sérodiagnostic de Widal et Félix au CNHU-HKM de Cotonou

L'échantillon de patients est composé de 471 hommes et 529 femmes donnant un sex-ratio de 0,89. L'âge médian des patients était de 31ans avec des extrêmes allant de 4 mois à 88 ans.

Parmi les patients inclus, 979 (97,9%) présentaient une fièvre. La répartition des titres en anticorps anti-O est présentée dans le tableau II. Le sérodiagnostic était négatif pour la majorité des patients (81,6%). Seuls 8,1% des patients avaient un résultat positif selon les recommandations du fabricant du test.

Tableau II: Répartition des patients selon le titre en anticorps anti-O.

Titre en anti-corps anti-O	Effectif	Pourcentage (%)
100	103	10,3
≥ 200	81	08,1
Négatif	816	81,6
Total	1000	100

Pour les anticorps anti-H, seuls 9,9% des échantillons étaient positifs selon les recommandations du fabricant du test. Parmi les patients qui avaient des anticorps anti-O positifs, 71,6% n'avaient pas d'anticorps anti-H, profil compatible avec un début d'infection. En fonction de la présence ou non de la fièvre chez les patients, les résultats du sérodiagnostic de Widal et Félix sont présentés dans le tableau III.

Tableau III: Répartition des patients en fonction des résultats du sérodiagnostic de Widal et Félix et de la durée de la fièvre

Durée de la fièvre	Tests réalisés	Tests positifs	Taux de positivité (%)
≤ une semaine	556	38	6,8
> une semaine	423	42	9,9
Pas de fièvre	21	01	4,8
Total	1000	81	8,1

Le sérodiagnostic a été demandé à plus de la moitié des patients (556 patients : 55,6%) au premier septénaire. Pourtant, parmi eux, 38 patients (6,8%) qui ont affirmé avoir une fièvre depuis moins de 8 jours ont des anticorps anti-O positifs à un titre significatif.

Le taux de positivité le plus élevé est cependant observé au second septénaire (9,9%).

La répartition des sujets malades confirmés positifs suivant le sérotype est présentée dans le tableau IV.

La quasi-totalité des sujets malades (92,6%) ont présenté un test positif à *Salmonella* Typhi. Aucun des patients n'a présenté un test positif à *Salmonella* Paratyphi C.

DISCUSSION

Dans l'enquête sur les réactifs et techniques utilisés pour le sérodiagnostic de Widal et Félix dans les laboratoires d'analyses biomédicales de Cotonou, tous les différents types de structures (structures publiques, structures privées à but lucratif ou non) étaient représentés. En effet, il est possible que les laboratoires de différents types de structure ne disposent pas des mêmes infrastructures. Les réactifs et techniques utilisés pourraient donc varier suivant le type de structure enquêtée. Cette situation n'a cependant pas été observée dans notre étude.

Il ressort que deux techniques (agglutination en tube ou sur plaque) étaient majoritairement utilisées dans ces laboratoires. Une troisième technique a été observée dans un seul laboratoire. Il s'agit d'une technique immunochromatographique utilisant une bandelette (SD Bioline®) et mettant en évidence les IgG et les IgM dirigés contre les somatiques O. La plupart des travaux dans la littérature sur le sérodiagnostic de Widal et Félix font plutôt référence aux techniques d'agglutination [5,6]. La technique qui utilise les bandelettes est une technique plus simple et peu coûteuse. Cependant, il est nécessaire de l'évaluer dans notre contexte pour apprécier ses performances réelles par rapport à la technique classique d'agglutination en tube.

Le réactif Biorad® était le réactif le plus utilisé. Cependant, compte tenu de son coût élevé, tous les laboratoires ont modifié la technique du fabricant en réduisant dans les mêmes proportions le volume du réactif et celui du sérum à tester au 1/2, voire au 1/4 bien qu'aucune étude préalable n'ait été faite pour valider une telle modification. La diminution

Tableau IV : Répartition des patients malades selon le sérotype.

Sérotypes	Effectif	Pourcentage (%)
S. Typhi	75	92,6
S. Paratyphi A	01	01,2
S. Paratyphi B	02	02,5
S. Paratyphi C	00	00
S. Typhi et Paratyphi B	03	03,7
Total	81	100

même proportionnelle des volumes de réactifs et de sérum pourrait influencer une observation aisée de l'agglutination avec un risque élevé de faux négatifs. Par ailleurs, la grande diversité des réactifs utilisés pourrait s'expliquer par l'absence d'un système national fonctionnel et contraignant d'enregistrement des réactifs de même que l'absence de directives nationales pouvant guider le choix des praticiens de laboratoire. Une évaluation préalable des performances de ces réactifs devrait précéder l'élaboration de ces directives.

Sur les 13 laboratoires enquêtés, aucun n'interprétait strictement les résultats selon les recommandations du fabricant. En général, dans ces laboratoires, un titre en anticorps anti-O égal à 100 est considéré comme positif alors que le fabricant recommande de déclarer un échantillon positif seulement lorsque son titre en anticorps anti-O est supérieur ou égal à 200 quel que soit le titre en anticorps anti-H.

Cette déviation par rapport aux recommandations du fabricant pourrait entraîner un nombre élevé de faux positifs qui sont le plus souvent liés aux réactions croisées du fait de la communauté antigénique entre les salmonelles typhiques et paratyphiques et d'autres bactéries (salmonelles non typhiques, *Yersinia pseudotuberculosis*), fréquemment rencontrées dans notre environnement [7,8]. La surconsommation des antibiotiques qui peut en découler risque d'aggraver le phénomène de résistance aux antibiotiques. Cet écart par rapport aux recommandations, pourrait également s'expliquer d'une part par la non maîtrise de l'interprétation des résultats de sérodiagnostic de Widal et Félix par les techniciens en

charge de ces examens et l'absence d'un système fonctionnel de contrôle externe de qualité des examens de laboratoires. De plus, la plupart des laboratoires concernés sont dirigés par des techniciens de laboratoire, parfois de niveau non universitaire.

Dans la deuxième partie de l'étude réalisée dans le laboratoire de microbiologie du CNHU-HKM de Cotonou sur 1000 échantillons de sérum de malades, en utilisant la technique de référence d'agglutination en tube, nous avons observé que les praticiens ont souvent utilisé la fièvre comme un élément déterminant pour la demande du sérodiagnostic de Widal et Félix (97,9%) sans tenir compte nécessairement de sa durée d'évolution. Cette stratégie a été rentable puisque la possibilité d'avoir un résultat positif en l'absence de fièvre était très faible (un seul cas observé).

La probabilité d'avoir des anticorps anti-O était plus élevée au 2^e septénaire qu'aux autres septénaires. Cette observation est en accord avec les données de la littérature qui indiquent que les anticorps anti-O apparaissent généra-

lement vers le 8^e jour. Cependant, dans notre étude, 6,8% des échantillons étaient positifs aux anti-O au 1^{er} septénaire. Cela pourrait s'expliquer par le fait que certains patients ne donnent pas toujours avec précision cette durée. Des observations comparables ont été faites avec les anti-H dont la positivité maximale a été observée après la fin du 2^e septénaire même si déjà au 1^{er} et 2^e septénaires, quelques échantillons étaient positifs.

La répartition des salmonelloses d'après le tableau IV, confirme que le sérotype le plus rencontré dans les salmonelloses majeures en Afrique est *Salmonella* Typhi [5, 9].

CONCLUSION

Le sérodiagnostic de Widal et Félix n'est pas réalisée dans les conditions optimales à Cotonou. Pour améliorer cette situation, il est nécessaire d'agir aux différents niveaux du système de gestion des laboratoires au niveau national, depuis l'enregistrement des réactifs jusqu'à l'évaluation externe de la qualité des laboratoires en passant par la formation des techniciens.

REFERENCES

1. Gendrel D. Diarrhées infectieuses dans les pays en développement. *Med Mal Infect.* 1997 ; 27 : 517-9.
2. Gast RK. Serotype-specific and serotype-independent strategies for preharvest control of food-borne *Salmonella* in poultry. *Avian Dis.* 2007; 51:817-28
3. Wain J, Hosoglu S. The laboratory diagnosis of enteric fever. *J Infect Dev Ctries.* 2008 2:421-5
4. Agbakwuru EA, Adesunkanmi AR, Fadiora SO, Olayinka OS, Aderonmu AO, Ogundoyin OO. A review of typhoid perforation in a rural African hospital. *West Afr J Med.* 2003; 22:22-5.
5. Agbenu E, d'Almeida H, Kolou M, Aho M, Agbetiafa K, Padaro E, Dagnra Y, Redah D, David M. Evaluation of the Widal-Felix serodiagnostic test in Togo. *Med Trop.* 2010; 70:43-8.
6. Taiwo SS, Fadiora SO, Oparinde DP, Olowe OA. Widal agglutination titres in the diagnosis of typhoid fever. *West Afr J Med.* 2007; 26:97-101
7. Olopoenia LA, King AL. Widal agglutination test-100 years later: Still plagued by controversy. *Postgrad Med J* 2000;76:80-4.
8. . Kariuki S, Mwituria J, Munyalo A, Revathi G, Onsongo J. Typhoid is over-reported in Embu and Nairobi, Kenya *Afr J Health Sci.* 2004; 11:103-10.
9. Kariuki S. Typhoid fever in sub-Saharan Africa: challenges of diagnosis and management of infections. *J Infect Dev Ctries.* 2008 1;2: 443-7.