

LISTE DES ABREVIATIONS

ADH :	Arginine dihydrolase
AFSSAPS :	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
ATCC:	American Type Culture Collection
BGAL :	Béta galactosidase
BT :	Bouillon thioglycolate
CLED:	Cystine Lactose Electrolyt Deficient
CLSI:	Clinical and Laboratory Standards Institute
CNRP:	Centre National de Recherche des Pneumocoques
CO₂ :	Dioxyde de carbone
ESC :	Esculine
FRU :	Fructose
G:	Gram
GLU :	Glucose
GNA:	Gloméruno Néphrite aigue
GSC :	Gélose au Sang Cuit
GSN :	Gélose au sang additionnée d'acide nalidixique
GSO :	Gélose au Sang Ordinaire
HALD :	Hôpital Aristide Le Dantec
HEAR:	Hôpital d'Enfant Albert Royer
IND :	Indole
IRA :	Infections Respiratoires Aigues
ISO :	Organisation Internationale de Normalisation
LIP :	Lipase
LOS:	Lipo Oligo Saccharides
LPS:	Lipo Poly saccharides
MAL:	Maltose
MEF:	Middle ear fluid

MH :	Muller Hinton
NAD:	Nicotinamide adénine dinucléotide
ODC :	Ornithine Décarboxylase
OMA:	Otite Moyenne Aigue
ORL:	Orto - Rhino - Laryngologie
Pal:	Phosphatase alcaline
RAA:	Rhumatisme articulaire aigue
SAC:	Saccharose
SGA:	Streptococoque Béta Hémolytique du Groupe A
SPN:	Streptococcus pneumoniae
STGG:	Skim milk, Tryptone, Glucose, and Glycerin
TDR:	Test de Diagnostic rapide
URE:	Urée

LISTES DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : coupe para sagittale des voies aériennes supérieures.....	5
<u>Figure 2</u> : Coupe para sagittale de la cavité nasale.....	7
<u>Figure 3</u> : Coupe frontale de l'oreille moyenne.....	9
<u>Figure 4</u> : Prélèvement des fosses nasales	28
<u>Figure 5</u> : Prélèvement de la gorge	28
<u>Figure 6</u> : Isolement et Identifications de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	31
<u>Figure 7</u> : Isolement et Identification de <i>Streptococcus pyogenes</i>	34
<u>Figure 8</u> : Isolement et Identification de <i>Haemophilus influenzae</i>	36
<u>Figure 9</u> : Isolement et Identification de <i>M.catarrhalis</i>	38
<u>Figure 10</u> : Répartition des souches isolées.....	44

LISTES DES TABLEAUX

<u>Tableau I</u> : Principaux germes responsables d'infection respiratoires aigues des voies aériennes supérieures	13
<u>Tableau II</u> : Recapitulatif de la durée des tests d'identification.....	40
<u>Tableau III</u> : Interprétation des résultats de probabilités relative	42
<u>Tableau IV</u> : Répartition des prélèvements	44
<u>Tableau V</u> : Répartition des souches isolées en fonction de la Pathologie.....	45
<u>Tableau VI</u> : Résultat d'Identification de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	46
<u>Tableau VII</u> : Résultat d'Identification de <i>H.influenzae</i>	47
<u>Tableau VIII</u> : Résultats d'Identification de <i>Moraxella catarrhalis</i>	48
<u>Tableau IX</u> : identification <i>Streptococcus pneumoniae</i>	49
<u>Tableau X</u> : Identification de <i>H.influenzae</i>	50
<u>Tableau XI</u> : Identification de <i>Moraxella catarrhalis</i>	52

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
PREMIÈRE PARTIE : GÉNÉRALITÉS.....	4
I/PARTICULARITES ANATOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DES VOIES AERIENNES SUPERIEURES DE L 'ENFANT	5
I.1. La cavité nasale.....	6
I.2. La cavité orale.....	7
I.3. Le pharynx	7
I.4. Le larynx	8
I.5. Oreille moyenne.....	8
II/ INFECTIONS RESPIRATOIRES AIGUES HAUTES D'ORIGINES BACTERIENNES.10	
II.1. Principales infections respiratoires aiguës hautes	11
II.1.1. Les rhinopharyngites aiguës.....	11
II.1.2. Les angines aiguës.....	11
II.1.3. Les laryngites aiguës	12
II.1.4. Les sinusites aiguës	12
II.1.5. Les otites moyennes aiguës	13
II.2. Principales bactéries	13
II.2.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	13
II.2.1.1. Caractères bactériologiques.....	14
II.2.2. <i>Streptococcus pyogenes</i>	15
II.2.2.1. Caractères bactériologiques.....	15
II.2.3. <i>Moraxella catarrhalis</i>	16

II.2.3.1. Caractères bactériologiques.....	16
II.2.4. <i>Haemophilus influenzae</i>	17
II.2.4.1. Caractères bactériologiques.....	17
II.3.Diagnostic microbiologique	17
III/ VALIDATION	21
III.1. Procédure de validation.....	22
III.2. Paramètres de validation.....	23
III.2.1 Répétabilité	23
III.2.2 Reproductibilité.....	23
DEUXIÈME PARTIE : TRAVAIL EXPÉRIMENTAL	24
I. CADRE D'ETUDE	25
II. OBJECTIFS DE L'ETUDE	25
III. MATERIELS ET METHODES	25
III.1 Matériels.....	25
III.2 Méthodologie	27
III.2.1 Population d'étude	27
III.2.2 Modalités de prélèvement	27
III .2.2.1 Enregistrement des patients	27
III .2.2.2 Conditions de prélèvement	27
III.2.2 .3 Réalisation du prélèvement.....	28
III.2.2.4 Transport des prélèvements	29
III.2.3 Examen bactériologique.....	29

III.2.3.1 Examen microscopique	29
III.2.3.2 Culture.....	30
III.2.3.2.1 Contrôle qualité des milieux	30
III.2.3.2.2 Culture proprement dite	30
III.2.3.3 Méthode d'identification.....	31
II.2.3.3.1 Algorithme d'identification de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	31
III.2.3.3 .2 Algorithme d'identification <i>Streptococcus pyogènes</i>	34
III.2.3.3.3 Algorithme d'identification <i>Haemophilus influenzae</i>	36
II.2.3.3.4 Algorithme d'identification <i>Moraxella catarrhalis</i>	38
III.2.4 Conservation des souches	40
III.2.5 Validation de l'identification des souches	41
III.2.5.1 Souches de référence.....	41
III .2.5.2 Autres critères de validation	41
RESULTATS	43
I. REPARTITION	44
I.1. Nombres de prélèvements	44
I.2 Souches isolées	44
II. RESULTATS DE L'IDENTIFICATION DES GERMES	46
II.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	46
II.2 <i>Haemophilus influenzae</i>	47
II.2.3 <i>Moraxella catarrhalis</i>	48

III. RESULTAT DE LA VALIDATION DES MÉTHODES D'IDENTIFICATION	49
III.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>.....	49
III.2 <i>Haemophilus influenzae</i>.....	50
III.3 <i>Moraxella catarrhalis</i>	52
III.4 Repétabilité et reproductivité	53
DISCUSSION	54
CONCLUSION	67
RECOMMANDATIONS	71
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	72

INTRODUCTION

Les infections respiratoires font partie des pathologies infectieuses les plus fréquentes et représentent une cause importante de morbidité et de mortalité. Parmi ces infections, les infections respiratoires aiguës des voies hautes de l'enfant sont les plus fréquemment rencontrées en consultation pédiatrique, elles constituent un problème de santé publique.

Les infections des voies respiratoires supérieures sont un terme général pour désigner un groupe hétérogène de maladies causées par de nombreux agents étiologiques qui affectent la muqueuse des voies respiratoires supérieures, y compris la cavité de l'oreille moyenne et des sinus para-nasaux. Elles sont à 80 % d'origine virale et sont souvent prédisposées à des complications bactériennes. Dans ce cas, les principaux symptômes de ces infections sont : l'obstruction nasale, l'écoulement, les éternuements, les maux de gorge, la toux et la fièvre souvent modérée.

L'épidémiologie bactérienne de ces infections est dominée par les germes pathogènes tels que : *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* et *Moraxella catarrhalis*.

La prise en charge de ces infections bactériennes passe par un diagnostic et une antibiothérapie adaptée et efficace.

Le diagnostic biologique de ces infections est basé sur une bonne méthode de prélèvement et d'identification. Pour ce faire, il nécessite des techniques de laboratoire bien codifiées afin de donner des résultats fiables et précis, pour une meilleure prise en charge.

L'identification de ces germes se fait par des méthodes spécifiques. Plusieurs études ont en effet été réalisées dans ce sens [1, 2, 3, 4, 5, 6]. A l'issue de ces études, des algorithmes d'identification validés dont les techniques décrites et utilisées pour la plupart depuis de nombreuses années ont été proposées. Ces méthodes d'identification ont été sélectionnées en raison de

leur utilité, de leur facilité de mise en œuvre et de leur reproductibilité dans nos laboratoires. Cependant, ces méthodes tellement utilisées en routine dans nos laboratoires, ne font plus l'objet de contrôle rigoureux et permanent comme il se doit dans un système de qualité sanitaire. Ceci pouvant expliquer les difficultés de prise en charge de ces infections via un diagnostic pas toujours fiable.

La validation n'est cependant pas une opération que l'on effectue une fois pour toutes. Chaque laboratoire doit apporter la preuve que la méthode utilisée est maîtrisée en interne. Car même les méthodes d'essai normalisées doivent être validées.

Notre étude s'inscrit dans ce cadre et a pour but d'isoler les germes à l'origine des infections respiratoires aiguës hautes de l'enfant et de valider les méthodes d'identification de ces germes selon qu'elles sont utilisées dans nos laboratoires.

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

I. Particularités anatomiques et physiologiques des voies aériennes supérieures de l'enfant

Les voies respiratoires supérieures encore appelées voies aériennes hautes ou extra-thoraciques sont constituées d'une série de cavités et conduits à travers lesquels circule l'air du nez et/ou de la bouche jusqu'aux poumons favorisant le renouvellement cellulaire et tissulaire en oxygène [7].

L'anatomie des voies aériennes chez le nouveau-né, et chez l'enfant dépend étroitement de la croissance crano-faciale. La base du crâne est alignée sur un plan quasi-horizontal qui prend une forme concave vers le bas au cours de l'enfance. Ceci explique en particulier la position initiale haute du larynx et le rapport étroit entre l'épiglotte et l'extrémité inférieure du voile du palais [7].

Les différentes structures retrouvées sont (Figure 1) :

- La cavité nasale
- La cavité orale (bouche)
- Le pharynx
- Le larynx

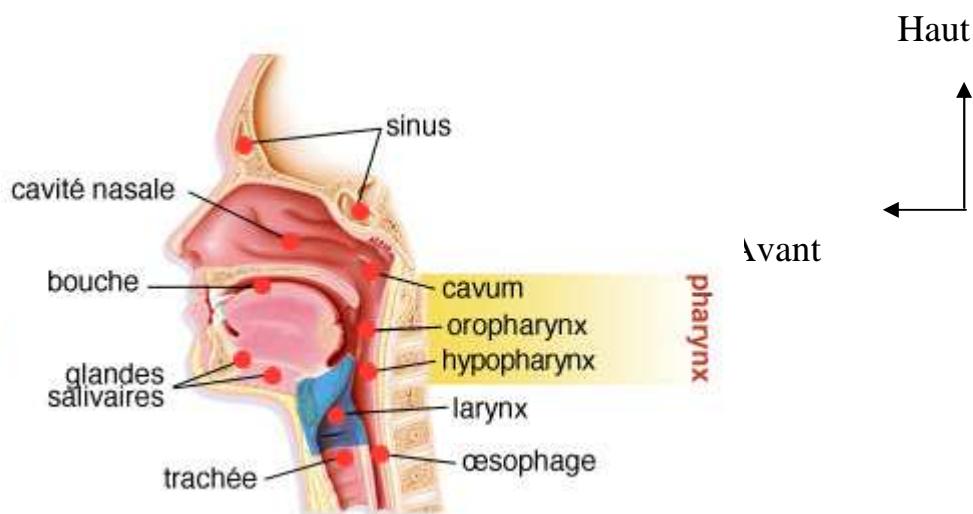


Figure 1 : Coupe para sagittale des voies aériennes supérieures [61].

I.1. La cavité nasale

À la naissance, toutes les structures endonasales sont en place et sont très étroites chez le nourrisson. Elles sont liées au volume des cornets qui, encombrés, ne permettent pas au méat moyen d'être fonctionnel. Le nez est formé d'une saillie sur le tiers moyen de la hauteur de la face d'où il constitue la partie initiale des voies respiratoires. C'est la porte d'entrée et de sortie de l'air. Il est constitué [8] :

- d'un squelette qui comprend la partie osseuse, en haut, formée au milieu par les os propres du nez, sur les côtés par le maxillaire supérieur et la partie cartilagineuse, un peu plus en bas donnant au nez son aspect pointu. Les cartilages et les os du nez sont recouverts de muscles.
- de deux fosses nasales qui comprennent une partie antérieure s'ouvrant à l'extérieur par les deux orifices des narines et une partie postérieure s'ouvrant par deux orifices, les choanes dans le rhinopharynx.

Les deux fosses sont séparées par la cloison, cartilagineuse en avant et osseuse en arrière. La paroi supérieure des fosses nasales est tapissée de muqueuse dite pituitaire où se trouvent les cellules sensorielles olfactives. Cette paroi est formée de l'os ethmoïde qui sépare les fosses du lobe frontal du cerveau. Cependant, la paroi externe de chaque fosse porte trois saillies osseuses allongées d'avant en arrière : les cornets inférieur, moyen, et supérieur recouverts de muqueuse. (Figure 2) [8].

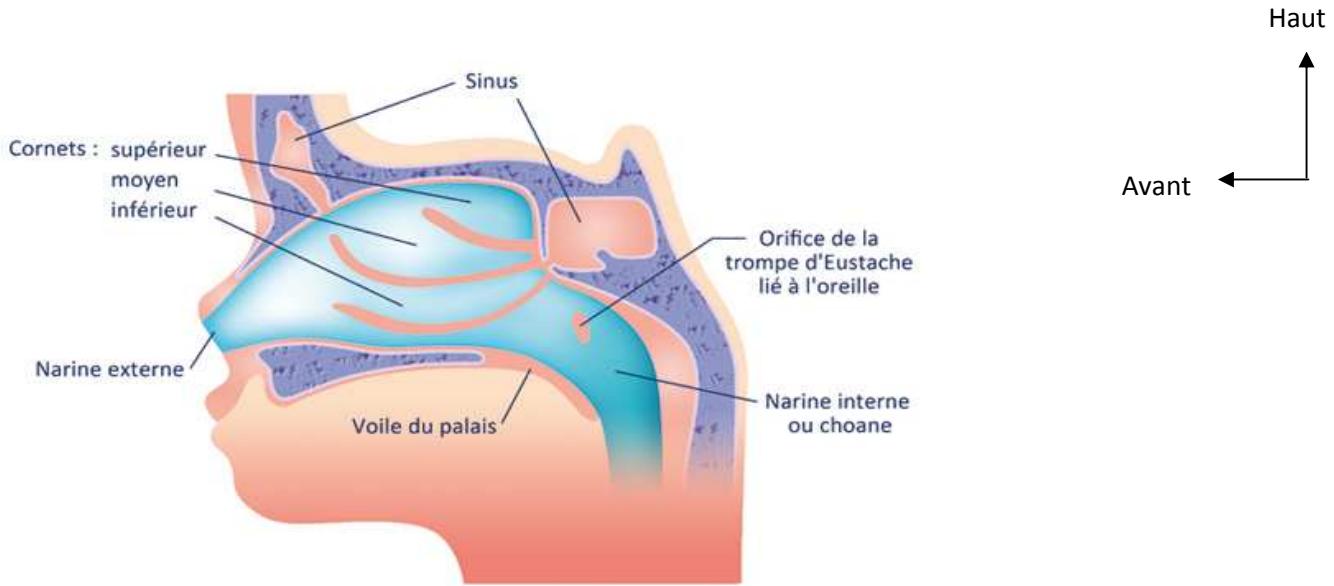


Figure 2 : Coupe para sagittale de la cavité nasale [62]

I.2. La cavité orale

La bouche est une cavité du visage qui permet également l'entrée et la sortie d'air surtout en cas d'obstruction du nez. En plus des fonctions digestives, elle assure aussi une fonction respiratoire et phonatoire. La bouche communique en arrière avec le pharynx par l'isthme du gosier et est lubrifiée par les glandes salivaires.

Elle est limitée en haut par le palais, en bas par le plancher buccal formé essentiellement de la langue, latéralement et en avant par les arcades dentaires qui comprennent les gencives et les dents, l'ensemble recouvert par les joues et les lèvres [8].

I.3. Le pharynx

C'est un conduit musculaire et membraneux allant du fond de la bouche à l'entrée de l'œsophage. Il correspond à la gorge et comprend trois étages. De haut en bas, on trouve le nasopharynx, l'oropharynx et l'hypopharynx. Le

nasopharynx fait partie des voies respiratoires. L'oropharynx et l'hypopharynx constituent les lieux où les voies aériennes et digestives supérieures se croisent. Les muscles du pharynx sont soit constricteurs, soit élévateurs [8].

I.4. Le larynx [9]

Organe de la phonation situé dans le cou, entre le pharynx et la trachée. Il s'élargit avec l'âge de l'enfant. Pour éviter le passage des aliments dans les poumons, le larynx est surmonté d'un clapet appelé épiglotte qui l'obstrue lors de la déglutition et se relève lors de la respiration. Sa paroi est tapissée de muscles recouverts d'une fine muqueuse.

Dans sa forme extérieure, le larynx est une sorte de cylindre creux et rigide en avant de l'hypopharynx. Dans sa forme intérieure, il comprend 3 parties :

- la partie sus-glottique dont la cavité s'appelle le vestibule
- la partie moyenne de la glotte
- la partie inférieure sous-glottique.

I.5. L'oreille moyenne

Elle comprend la caisse du tympan qui est ouverte sur le pharynx par la trompe d'Eustache permettant le drainage physiologique du mucus sécrété dans l'oreille moyenne (figure 3). Chez le nourrisson la trompe d'Eustache, est courte et béante, sa muqueuse est épaisse et son ostium est placé en arrière du cornet inférieur, sur un même plan que le palais osseux. A l'âge de 3ans, l'orifice de la trompe d'Eustache sera situé en arrière de la queue du cornet moyen [7]. L'oreille moyenne est tapissée par une muqueuse de type respiratoire ciliée [10] et contient de petites cavités creusées dans la mastoïde. Entre le tympan et la fenêtre ovale, sont situés trois osselets, successivement le marteau, l'enclume et l'étrier (figure 3).

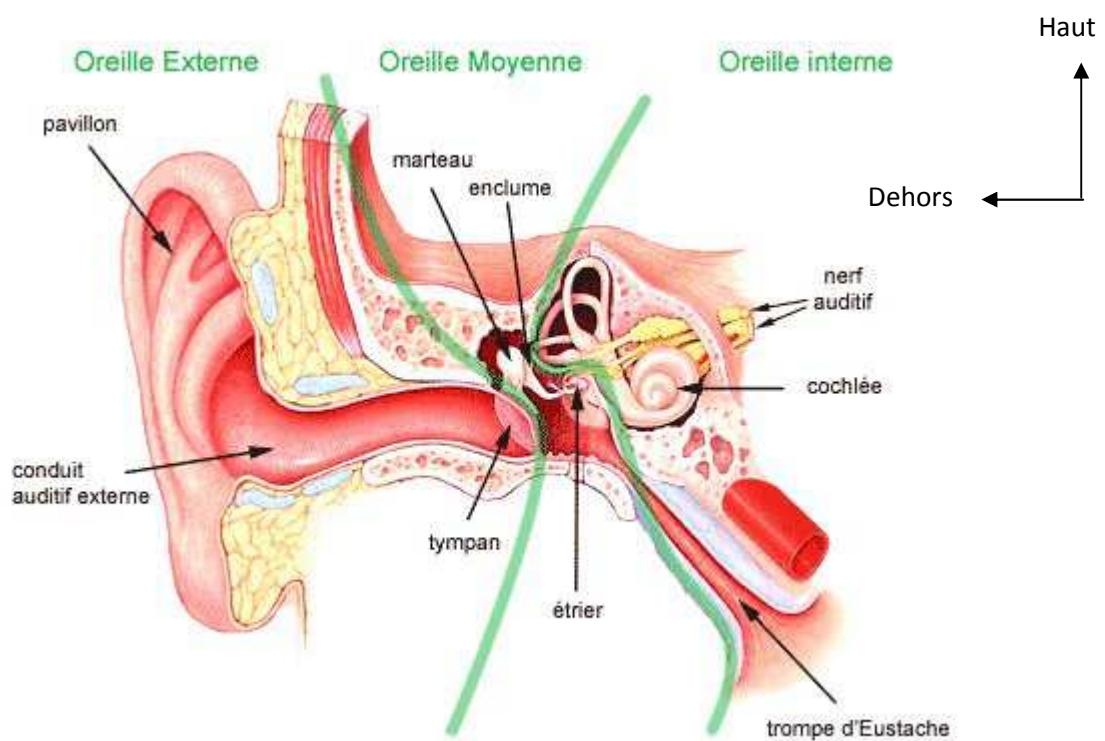


Figure 3 : Coupe frontale de l'oreille [63]

II. Infections respiratoires aiguës hautes d'origine Bactérienne

Les infections respiratoires aiguës hautes d'origine bactérienne sont des affections autolimitées avec une durée moyenne de 7-10 jours et un excellent pronostic [11]. Elles surviennent tout au long des voies aériennes supérieures après prolifération des germes responsables. Dans la majorité des cas, il s'agit d'une surinfection bactérienne compliquant généralement une affection virale préexistante.

Le problème majeur lié à l'infection respiratoire aiguë se situe dans les pays en développement et concerne beaucoup plus les enfants. Les facteurs favorisants sont: l'environnement climatique (surtout le froid), l'hygiène de l'habitat, la promiscuité, parfois le tabagisme familial, la malnutrition. La pauvreté de certaines populations contribue aussi à l'aggravation de la situation [12, 13].

Les pathologies infectieuses des voies aériennes supérieures les plus fréquentes sont :

- les rhinopharyngites
- les angines
- les laryngites
- les rhino sinusites
- les otites moyennes

II.1. Principales infections respiratoires aiguës hautes

II.1.1. Les rhinopharyngites aiguës

Les rhinopharyngites représentent un problème de santé publique du fait de la fréquence des consultations médicales, des prescriptions, des jours d'absentéisme scolaire ou d'arrêt de travail et enfin des coûts induits par cette pathologie [14,15]. Il s'agit de la première pathologie infectieuse de l'enfant et de la première cause de consultation en pédiatrie.

La rhinopharyngite aiguë est une inflammation aiguë du pharynx (cavum et fosses nasales) [16]. Elle s'accompagne souvent d'une fièvre généralement modérée [17]. Ses complications bactériennes sont otologiques et sinusiennes dues aux germes tels que : *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis* [15].

II.1.2. Les angines aiguës

L'angine est une inflammation des amygdales (amygdalite aigue), voire de l'ensemble du pharynx [18]. Elle est retrouvée chez l'enfant de 4 à 15 ans. Le diagnostic est porté sur l'examen de l'oropharynx : les amygdales sont le plus souvent rouges et augmentées de volume (angine érythémateuse ou angine rouge qui est fréquente chez l'enfant 25%-50% streptococcique) [18].

Dans environ 20% des cas la cause est bactérienne [19]. Le streptocoque β -hémolytique du groupe A(SGA) est de loin le plus fréquent puisqu'il est à l'origine de 80% des angines streptococciques [20] et constitue la première cause bactérienne des angines [21]. Les angines bactériennes autres que celles du SGA sont rares. [22]

Les angines aigues peuvent se compliquer d'infections locales ou d'infections dites post-streptococciques, c'est le cas du rhumatisme articulaire aigu (RAA) et de la glomérulonéphrite aigue (GNA).

II.1.3. Les laryngites aiguës

La laryngite est une inflammation et un rétrécissement du larynx très fréquents chez le jeune enfant de moins de 5 ans chez qui elle peut entraîner une gêne respiratoire, voire l'asphyxie par obstruction des voies aériennes supérieures. On distingue la laryngite épiglottique qui est une inflammation d'origine bactérienne située au-dessus de la glotte. C'est la plus grave et la représentation clinique est faite de : fièvre élevée, difficultés à avaler la salive, gêne respiratoire intense [8].

Les bactéries responsables sont : *Haemophilus influenzae* surtout [20], *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*.

II.1.4. Les sinusites aiguës

Environ 20 millions de cas de sinusite bactérienne aiguë (SBA) surviennent chaque année aux États-Unis [8,23]. Elle est définie comme étant une inflammation aiguë de la muqueuse des sinus de la face due soit à une infection des fosses nasales, soit à une infection de la racine d'une dent supérieure, et survenant parfois dans un contexte de rhinopharyngite aiguë [8]. Chez l'enfant, c'est une pathologie liée au développement progressif des cavités sinusiques.

La forme aiguë sévère est évoquée devant une fièvre supérieure à 39 °C, des céphalées, une rhinorrhée purulente et parfois un œdème périorbitaire [24]. L'ethmoïdite aigue extériorisée est la principale complication sinusienne des rhinosinuso pharyngites aiguës chez le nourrisson ou chez le jeune enfant. Elle est rare mais grave [25].

En général, la sinusite bactérienne aiguë passe à un très faible pourcentage de risque d'infection secondaire bactérienne causée par des bactéries aérobies telles que : *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, ou *Moraxella catarrhalis* [26,27].

II.1.5. Les otites moyennes aiguës

L'otite moyenne aiguë (OMA) est une inflammation aiguë associée à un épanchement purulent dans la cavité de l'oreille moyenne (la caisse du tympan). C'est l'infection bactérienne la plus fréquente chez le nourrisson. Elle représente un motif majeur de consultation en pédiatrie [10]. L'épidémiologie bactérienne des OMA est dominée par *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae* [28, 29, 30].

Elles peuvent se compliquer en entraînant une mastoidite, une méningite ou une paralysie faciale, voire même une bactériémie.

II.2. Les principales bactéries

Tableau I : Principaux germes responsables d'infection respiratoires aiguës des voies aériennes supérieures

Tableau clinique	Germes responsables
Rhinopharyngites	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i>
Angines aigues	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>
Oties moyennes aigues	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> ,
Laryngites aigues	<i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> .
Les sinusites aigues	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i>

II.2.1. *Streptococcus pneumoniae*

II.2.1.1. Caractères bactériologiques [31]

Streptococcus pneumoniae appartient à la famille des *Streptococcaceae*, au genre *Streptococcus*. Ce sont des cocci lancéolées, à Gram positif de diamètre inférieur à 2 µm, immobile et asporulé. Il est groupé en diplocoques ou en courtes chaînettes. C'est une bactérie commensale des voies aériennes supérieures (rhinopharynx).

Il pousse sur gélose au sang de mouton ou de cheval sous atmosphère enrichie à 5-10 % de CO₂. Ce milieu est généralement incubé à 37°C pendant 24h. Il se présente sous formes de colonies de 1 mm, lisses, à bord réguliers, transparentes, et à surface bombées, entourées d'une zone d'hémolyse partielle (dite de type alpha) avec verdissement du milieu. Ce germe est dépourvu de catalase et d'oxydase, sensibles à l'Optochine et s'autolyse en présence de sels biliaires.

Structure antigénique

Sa particularité est que sa paroi constituée de peptidoglycane et d'acide lipoteïchoïque possède une capsule polyosidique qui est un déterminant majeur de sa virulence. Différents antigènes de ces polysaccharides sont la base de leur identification, il existe environ 90 sérotypes immunologiques différents [32] dont 23 sont considérés comme pathogènes [20]. Certains sérotypes (23F, 19F, 6B, 14) sont souvent rencontrés dans la population et sont souvent associés à une résistance aux antibiotiques [16].

II.2.2. *Streptococcus pyogenes*

II.2.2.1. Caractères bactériologiques

Streptococcus pyogenes appelé streptocoque bêta-hémolytique du groupe A appartient à la famille des *Streptococcaceae* et au genre *Streptococcus*. Il est surtout recherché dans les prélèvements de gorge (cas d'angine) [33]. C'est un coccus de taille et de forme irrégulières, à Gram positif, groupé en chaînettes plus ou moins longues et flexueuses, immobile, acapsulé, asporulé [33].

C'est un germe exigeant qui ne pousse pas sur milieux de culture ordinaires mais plutôt sur ceux additionnés de sérum ou de sang frais. Sur bouillon, il pousse en donnant des flocons et un dépôt au fond du tube dû aux longues chainettes rappelant la mie de pain. Sur gélose au sang ordinaire (GSO ou GSN), on observe de petites colonies grisâtres, translucides, en grain de semoule, entourées d'une zone d'hémolyse totale (dite de type hémolyse bêta). Cependant, les autres streptocoques donnent une hémolyse partielle (hémolyse alpha) ou ne donnent pas d'hémolyse. C'est une bactérie anaérobie mais aérobie tolérante dépourvue de catalase. [31]

Structure antigénique

Le streptocoque du groupe A possède la protéine M qui est le principal antigène de la paroi expliquant sa virulence et sa résistance lors de la phagocytose. Les anticorps anti-M confèrent aussi une immunité durable et protectrice. Il existe plus de 60 types différents d'antigène M. Il sécrète des substances telles que les hémolysines O et S, la streptokinase, une protéase [33].

II.2.3. *Moraxella catarrhalis* [2,5]

II.2.3.1. Caractères bactériologiques

C'est un diplocoque Gram négatif aérobie strict appartenant à la famille des *Moraxellaceae*.

M. catarrhalis pousse sur gélose nutritive notamment sur gélose au sang cuit à température optimale de croissance de 35-37°C et à une durée d'incubation de 24 à 48 heures sous atmosphère au CO₂. Après culture on observe des colonies à surface rugueuse rosâtre à marron, opaques, de consistance friable. Elle produit une réaction catalase et oxydase positive et n'acidifie pas les sucres, ce qui est essentiel pour le diagnostic différentiel avec le méningocoque et le gonocoque.

Structure antigénique

Cette bactérie possède des facteurs de virulence tels que :

- la capsule qui n'est pas évoquée directement dans la pathogénicité.
- les lipo-oligosaccharides (LOS) ou lipopolysaccharides (LPS) font partie des constituants de la membrane externe ayant une activité endotoxique, et jouant ainsi un rôle dans la pathogénicité et la virulence. La caractérisation immunochimique des déterminants antigénétiques des LPS par des anticorps monoclonaux a confirmé la présence du déterminant Gal-alpha-(1-4)-Gal dans le lipopolysaccharide.
- l'immunoglobuline A protéase qui lui permet de se protéger de la présence locale des IgA sécrétoires spécifiques.

II.2.4. *Haemophilus influenzae*

II.2.4.1. Caractères bactériologiques

C'est un petit bacille à Gram négatif (1-2 x 0.3 μ) polymorphe aéro-anaérobie, immobile et parfois capsulé (facteur majeur de virulence).

H.influenzae est très fragile, c'est une bactérie exigeante qui pour sa croissance nécessite des facteurs présents dans le sang tels que : le facteur X (hémine qui est une coenzyme de plusieurs enzymes respiratoires), le facteur V (le NAD). Ces facteurs X et V permettent également de distinguer *H.influenzae* de *H.parainfluenzae* qui ne requiert que le facteur V. [34,35].

Elle possède une catalase et une oxydase ; elle fermente le glucose, le maltose, le ribose et la xylose mais pas le lactose ni le saccharose.

Structure antigénique

Elle possède des antigènes somatiques et 6 antigènes capsulaires de nature polyosidique permettant d'avoir les sérotypes : a, b, c, d, e, f. Le sérotype b est le plus répandu.

II.3. Diagnostic microbiologique des infections

respiratoires aiguës hautes de l'enfant.

Le diagnostic est déjà orienté par le type de prélèvement et la nature de l'infection. L'identification au niveau de l'espèce d'un germe pathogène est presque toujours suffisante. Les méthodes de diagnostic choisies doivent être rapides, informatives afin d'assurer une identification la plus rapide possible et de pouvoir proposer un diagnostic présomptif quelques heures après le prélèvement.

La démarche diagnostique se fait globalement en 3 étapes : diagnostic d'orientation, diagnostic d'espèce et détermination de marqueurs épidémiologiques utiles au traitement

- Le diagnostic d'orientation [36]

Il commence par l'examen direct du prélèvement qui va guider le choix d'une méthode d'isolement et permettre de donner les premiers résultats au clinicien pour la mise en route d'un traitement. Pour certains germes, il sera préférable d'utiliser directement les méthodes moléculaires (germes difficilement cultivables)

Sur les milieux d'isolement, il est important de repérer les colonies dont l'identification devra être poursuivie. Il est nécessaire au cours de cette étape de connaître les caractères morphologiques des colonies bactériennes sur culture et de distinguer les germes pathogènes des germes commensaux. En fonction du type de prélèvement, des milieux de culture spécifiques et sélectifs doivent donc être ensemencés.

L'étape suivante consiste à classer dans un taxon la souche considérée comme pathogène grâce à des marqueurs fiables et rapides qui reposent sur des caractères : structuraux (Gram, mobilité) ; métaboliques (test unitaire : oxydase, catalase, coagulase) ; culturaux (type d'hémolyse) ; antigéniques (Slidex Staph plus®) ; voire moléculaires (sonde nucléique, PCR).

- Le diagnostic d'espèce [36]

Il est réalisé sur un plus grand nombre de marqueurs diagnostiques bien standardisés et des trousse diagnostiques performantes existent (ex : Api system)

La nature des tests d'identification à pratiquer dépend du groupe bactérien dans lequel le diagnostic a été orienté. Ceci soulève le rôle primordial du diagnostic

d'orientation et suppose que celui-ci ait été bien conduit sinon l'utilisation d'une galerie peut aboutir à une impasse ou à une erreur diagnostique.

Les étapes du diagnostic microbiologique sont basées sur le prélèvement et les méthodes d'identification.

▪ **Le prélèvement**

Les prélèvements doivent être entrepris stérilement et placés dans des récipients stériles, généralement des écouvillons.

Il est fonction du site de l'infection [37]

- Angines et rhinopharyngites : par écouvillonnage des amygdales et/ou du rhinopharynx
- Sinusites : par aspiration du liquide de drainage sinusien
- Otites moyennes : par aspiration ou écouvillonnage du Liquide de paracentèse ou d'otorrhée en cas de perforation tympanique
- Otites externes : par Ecouvillonnage du conduit auditif externe

Il faut les étiqueter et les renseigner.

Le prélèvement doit être conditionné dans un milieu de transport comme le milieu de Stuart Amies [11] et doit être rapidement acheminé au laboratoire. Il peut être conservé à une température de 5°C [38] ou à 4°C [39]

▪ **Méthodes d'identification phénotypiques [36]**

Examen direct.

L'examen direct peut être à lui seul très informatif pour le clinicien, et même suffisant dans un contexte d'urgence (mais restant à confirmer).

L'examen au microscope du prélèvement après coloration de Gram permet d'apprécier la morphologie (c cocci ou bacilles), la mobilité et le Gram.

Etude macroscopique des colonies

L'intérêt porte sur : le développement de la bactérie et son isolement (obtention d'une culture pure), ses caractéristiques culturales...

Cela nécessite de regrouper des conditions d'atmosphère (aérobiose, anaérobiose, enrichi en CO₂), de température et de culture favorable au développement microbien.

Le type de gélose ensemencé repose sur les informations de l'examen direct ou sur demande spécifique du clinicien.

Ainsi, des milieux ordinaires et sélectifs peuvent être utilisés [2].

Elle repose sur l'Aspect des colonies : forme, contour, relief, couleur, odeur, type d'hémolyse

Tests unitaires

Ils peuvent être mis en œuvre soit directement par utilisation de substrats sur la gélose d'ensemencement (Test de lyse par la bile), soit secondairement par prélèvement de colonies sur la culture.

Associés aux renseignements obtenus par l'examen direct, et l'aspect des colonies sur les différentes géloses utilisées, certains peuvent suffire à l'identification du genre voire de l'espèce.

Galeries d'identification - Système API

Elles utilisent le même principe que les techniques biochimiques conventionnelles d'identification des bactéries. Elles se présentent sous forme de cupules prête à l'emploi contenant le substrat lyophilisé nécessaire aux différents tests biochimiques. Miniaturisée et standardisée, les galeries API ont l'avantage de standardiser les caractères biochimiques recherchés pour améliorer la reproductibilité inter laboratoire en éliminant le choix subjectif des tests « importants » pour la caractérisation, elles limitent la variabilité

technique. Et leur utilisation est simple. Le rendu des résultats repose sur le principe de l'identification numérique.

- **Méthodes immunologiques [36]**

Elles sont basées sur la réaction d'un anticorps spécifique vis à vis d'un antigène du corps bactérien, d'un antigène soluble ou d'une toxine. Elles ont l'avantage d'être rapides et spécifiques. Elles peuvent manquer de sensibilité, on peut alors les associer à une autre méthode pour augmenter la sensibilité. Ce sont globalement des techniques coûteuses.

Agglutination au latex

Pneumocoque, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, (détection de l'antigène polysaccharidique des Streptocoques.)

III. Validation de la méthode d'identification

Selon la norme ISO/IEC 17025 version révisée de 2005, la validation est la « confirmation par examen et apport de preuves tangibles que les exigences particulières pour un usage spécifique prévu sont satisfaites» [40]. Le travail de validation doit satisfaire à remplir les exigences de l'accréditation pour une démarche de diagnostic microbiologique. Plus les conséquences d'un résultat sont importantes, plus l'effort pour en assurer la qualité doit être important. La validation consiste donc à vérifier la performance de la méthode et sa conformité à des normes [41].

La validation de méthode microbiologique est d'une importance particulière. La variabilité des méthodes peut être attribuée principalement aux deux aspects suivants :

- la nature intrinsèque du microorganisme vivant qui possède une grande capacité de variation génétique et de mutation.

- les outils de détection et de dénombrement de microorganismes par des techniques conventionnelles, qui impliquent l'utilisation de substances biologiques variables, tels que les milieux de culture ou les réactifs biochimiques [2].

III.1. Procédure de validation

Elle suit la démarche de la méthode, ses caractéristiques, ses performances, et ses limites d'acceptation. Elle est complétée par des données statistiques. La validation de l'identification des souches passe par le calcul des probabilités [2].

Des tables diagnostiques contiennent pour chaque espèce [36] :

- la probabilité de positivité notée f dans le cas où la réponse de la souche aux différents tests est positive.
- la probabilité de négativité notée $1-f$ si la réponse de la souche aux tests est négative.

Ainsi, on définit :

- la probabilité absolue comme étant le produit des valeurs donnant la fréquence théorique de la souche.

Probabilité absolue = $f \times (1 - f) \times \dots =$ produit des valeurs obtenues pour chaque espèce.

- la probabilité relative ou la probabilité d'appartenance à l'espèce comme étant le rapport de fréquence théorique sur la somme des fréquences théoriques pour chacune des souches soumises à la comparaison.

Probabilité absolue

Probabilité relative = ----- x 100

Somme des probabilités absolues

III.2. Paramètres de validation

Les paramètres qui se rattachent à la validation de la démarche du diagnostic sont les suivants :

III.2.1 Répétabilité

C'est la mesure de résultats au sein d'un même laboratoire lorsque la méthode est répétée par le même opérateur dans les mêmes conditions, c'est-à-dire avec le même matériel, les mêmes réactifs, et dans un court intervalle de temps. Pour la déterminer, il faut au préalable calculer la moyenne et la variance entre chaque essai, en utilisant les formules ci-dessous [2,41] :

$$\bar{X} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N X_i$$

\bar{X} est la moyenne arithmétique des observations

X_i est une observation individuelle

N est le nombre d'observations

$$S^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2$$

S^2 est la variance des observations. Elle détermine la variabilité autour de la moyenne

III.2.2 Reproductibilité

C'est la précision de la méthode lorsqu'elle est appliquée dans des conditions différentes, généralement dans les laboratoires différents, à des échantillons distincts, théoriquement identiques, prélevés sur le même lot homogène de produit à analyser [41].

Ces deux paramètres font partie des formes d'expression de la fidélité qui correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé expérimental à plusieurs reprises dans des conditions déterminées [42].



DEUXIÈME PARTIE :

TRAVAIL EXPERIMENTAL

I. Cadre d'étude

Cette étude prospective a été réalisée de décembre 2011 à mai 2012 dans L'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du laboratoire de bactériologie-virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec de Dakar (HALD) en collaboration avec le service d'Oto-Rhino-Laryngologie (ORL) de l'Hôpital Fann et de l'Hôpital d'Enfant Albert Royer de Dakar (HEAR).

II. Objectifs de l'étude

Notre objectif était d'isoler les germes tels que *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* *Moraxella catarrhalis* d'isoler les germes à l'origine des infections respiratoires aiguës hautes de l'enfant et de valider les méthodes d'identifications de ces germes selon qu'elles sont utilisées au laboratoire de bactériologie-virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec de Dakar (HALD).

III. Matériels et méthodes

III.1 Matériels

Matériels de prélèvements

- Ecouvillons stériles
- Abaisse-langue
- Seringues
- Sonde
- Aspirateur
- Gants
- Otoscope
- Glacière

- Réfrigérants

Matériels d'isolation

- Anse de platine
- Boîtes de pétri
- Bec Bunsen
- Gélose au sang (trypticase soja ou Columbia® + Sang de mouton ou Sang de cheval)
- Polyvitex®
- Jarre d'incubation
- Bougie (Générateur de CO₂)
- Etuve à 37°C
- Autoclave

Milieux, réactifs et consommables d'identification

- Lames porte-objet
- Violet de Gentiane – Lugol - Alcool 95° - Solution de Fuchsine
- Microscope optique
- Pipettes Pasteur
- Peroxyde d'hydrogène 3 %
- Bâtonnets
- Disques d'optochine
- Désoxycholate de sodium 10 %
- Slidex pneumo kit®
- Disques de Bacitracine
- Slidex Strepto A ®
- La galerie Api NH®
- La galerie Api 20 Strep®
- Disques de facteurs X, V, X+V

- Bandelette d'oxydase
- Gélose Müller-Hinton (MH)
- Bouillon hyper salé (BHS)
- Bile esculine

Matériels de conservation des souches

- Cryotubes (tube Nunc®)
- Bouillon cœur-cervelle + glycérol
- Lait écrémé

III.2 Méthodologie

III.2.1 Population d'étude

Elle concerne les enfants âgés de 2 mois à 15 ans reçus en consultation externe à l'hôpital Fann et HEAR atteints de pathologies telles que la rhinite aiguë, la sinusite aiguë, l'otite moyenne aiguë, la rhinopharyngite aiguës, l'angine aiguë.

III.2.2 Modalités de prélèvement

III.2.2.1 Enregistrement des patients

Nous procédions à une petite enquête dont nous reportions les réponses sur la fiche d'enquête. Les notions telles que la date, l'heure du prélèvement, le nom, le sexe, l'âge du malade, le diagnostic du médecin, rubrique pour la prise d'antibiotique, le type de prélèvement à faire étaient inscrites sur la fiche.

III.2.2.2 Conditions de prélèvement

Les prélèvements étaient réalisés en respectant les règles d'asepsie et de stérilité et en absence de prise antibiothérapie. Ils étaient réalisés par écouvillonnage à l'aide d'un écouvillon stérile en présence de l'accompagnant.

III.2.2.3 Réalisation du prélèvement

Le prélèvement était réalisé en fonction de la localisation de l'infection (gorge, nez, oreille...).

En cas de rhinopharyngites, le prélèvement était réalisé par écouvillonnage des fosses nasales (figure 4) et de la gorge (figure 5) ; alors qu'en cas d'angine, il était réalisé par écouvillonnage des amygdales.

Prélèvement des fosses nasales

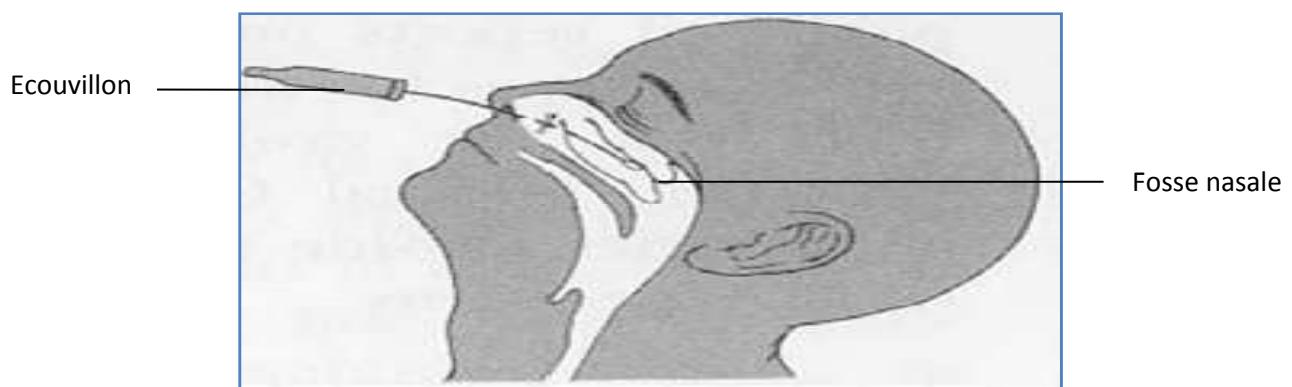


Figure 4 : prélèvement des fosses nasales

Prélèvement de Gorge

Pour cela, le patient ouvrait grandement la bouche, sortait la langue et prononçait le son « AAAHHH ». Avec un abaisse-langue la langue était immobilisée.

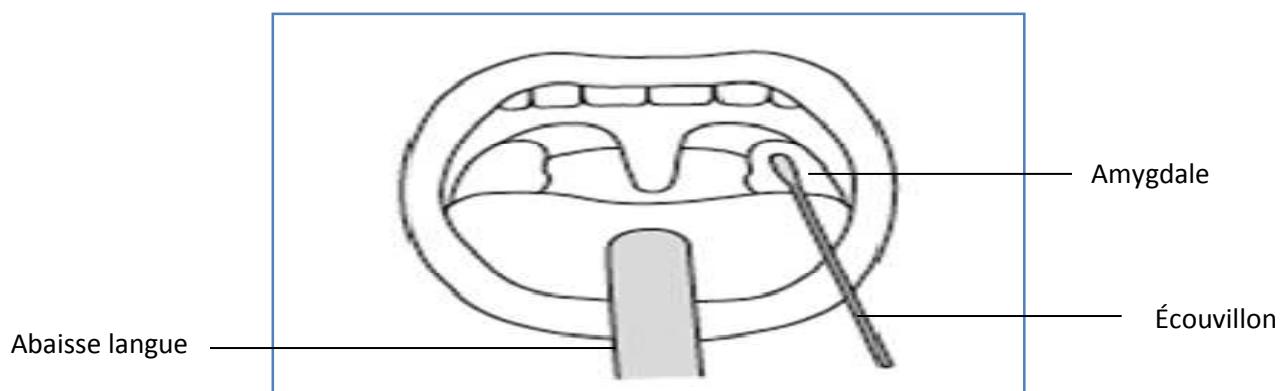


Figure 5 : prélèvement de la gorge

III.2.2.4 Transport des prélèvements

Les écouvillons étaient transportés dans une glacière réfrigérée et acheminés au laboratoire dans un délai maximum d'une heure.

III.2.3 Examen bactériologique

Les écouvillons imprégnés de sécrétions étaient déchargés dans 0.5 ml d'eau physiologique et homogénéisés à l'aide d'un vortex.

III.2.3.1 Examen microscopique

Examen direct

- Coloration de Gram

Un frottis était étalé sur une lame à partir de l'écouillon imprégné de sécrétions puis séché à l'air ambiant. La fixation du frottis a été faite à la flamme. Ce frottis était recouvert violet de Gentiane (cristal-oxalate d'ammonium) pendant 1 minute, puis rincé délicatement à l'eau du robinet et enfin égoutté pour enlever l'excès d'eau. Ensuite le frottis était recouvert de la solution de Lugol pendant 1 minute, rincé délicatement à l'eau du robinet et égoutté. Le frottis était décoloré avec de l'alcool éthylique à 95 % pendant 15 à 30 secondes. Enfin, ce frottis était recoloré à la fuchsine pendant 1 minute, rincé à l'eau de robinet et séché sur papier buvard ou sur un porte-lame à température ambiante.

- Examen microscopique après coloration de Gram

A l'objectif x 100 avec une goutte d'huile à immersion, la lecture du frottis coloré permettait d'apprécier l'aspect de la flore bactérienne (morphologie et coloration) afin d'orienter la recherche des germes.

III.2.3.2 Culture

III.2.3.2.1 Contrôle qualité des milieux utilisés

Contrôle de stérilité

Un échantillon de milieux à utiliser était incubé à l'étuve à 37°C pendant 18 heures. L'absence de pousse bactérienne confirmait sa stérilité.

Contrôle d'efficacité

Une souche de référence était repiquée sur un échantillon des milieux à utiliser. Après 24 heures d'incubation le milieu était considéré comme efficace si on notait une pousse bactérienne.

Les souches de référence utilisées étaient :

- *H.influenzae* ATCC 49247
- *S.pneumoniae* ATCC 49619

Pour les autres souches nous avions utilisé des germes conservés et isolés lors des recherches antérieures.

III.2.3.2.2 Culture proprement dite

Différents milieux étaient ensemencés selon le germe recherché à l'aide d'une anse en platine. Ces milieux étaient :

- La Gélose Columbia + 5 % sang de cheval + acide nalidixique (GSN) pour *Streptococcus pneumoniae*.
- La Gélose Columbia + 5 % sang de cheval (GSO) pour *Streptococcus pyogènes*.
- La Gélose trypticase soja + 5 % de sang de cheval + Polyvitex® pour *Haemophilus influenzae*.
- La Gélose trypticase soja + 5 % de sang de cheval pour *Moraxella catarrhalis*.

Ces milieux étaient incubés dans une jarre d'incubation sous atmosphère anaérobie à 37°C.

III.2.3.3 Méthode d'identification

II.2.3.3.1 Algorithme d'identification de *Streptococcus pneumoniae*

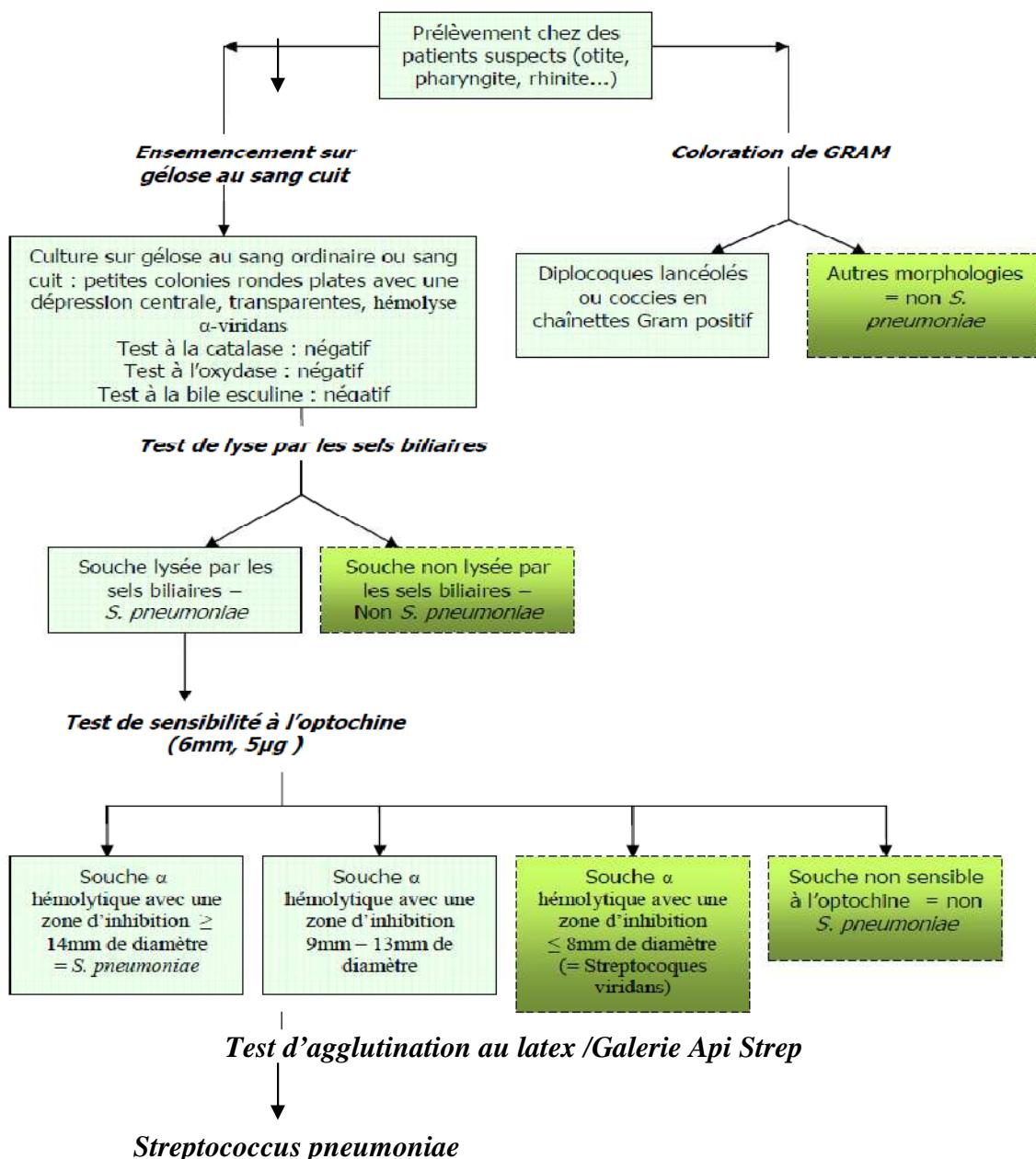


Figure 6 : Isolement et Identifications de *Streptococcus pneumoniae* [43]

Réalisation des tests d'identification

Le prélèvement était mis en culture sur milieu GSN qui fut incubé à 37°C sous CO₂ pendant 16-18 heures. Après incubation, sur le milieu GSN, on observait des colonies rondes transparentes développant une hémolyse verdâtre type alpha.

Examen microscopique

Après coloration de Gram (à partir de la culture), la lecture microscopique nous révélait des diplocoques Gram positif lancéolés, en flamme de bougie.

Test de catalase

Sur une lame étaient étalées quelques colonies qui, en contact avec la goutte d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) n'avaient pas produit des bulles d'air matérialisant l'absence de libération d'oxygène.

Test d'oxydase

Le chlorhydrate de tétraméthyl-p-phénylène diamine incolore était oxydé en un composé violet à noirâtre par les bactéries qui possédaient le système cytochrome C. A l'aide d'une pipette pasteur ou un bâtonnet en bois, un fragment de la colonie était prélevé et étalé sur une bandelette de papier-filtre imprégné. A l'issu de cela, nous n'avions pas observé de coloration.

Test de sensibilité à l'Optochine

Une colonie alpha-hémolytique était prélevée avec une anse stérile et ensemencée en stries sur gélose au sang ordinaire. Ensuite, le disque imprégné d'optochine de 6 mm de diamètre (contenant 5g d'éthylhydrocupréine) était déposé à l'endroit où on avait débuté l'ensemencement. Enfin, le milieu était incubé pendant 18 à 24 heures à 35 °C sous atmosphère riche en CO₂ (crée par la flamme de bougie). Sur la gélose incubée précédemment, on observait une

zone d'inhibition ou halo clair autour du disque d'optochine de diamètre supérieur à 14 mm.

Test à la bile esculine

Les colonies alpha hémolytique prélevées à l'aide de l'anse étaient introduites dans le milieu bile esculine sous forme de piqûre centrale ; puis le milieu était incubé à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, le milieu était resté intact. Il n'y avait pas de virage de couleur en noir, donc le test était négatif.

Culture dans le bouillon hyper salé (BHS)

Quelques colonies de notre souche de référence étaient mises en suspension dans le bouillon ; puis le bouillon était incubé à l'étuve pendant 24 heures. Après incubation, on n'observait pas de pousse.

Test de lyse par les sels biliaires

Une goutte de solution de désoxycholate à 10 % était déposée directement sur quelques colonies de la souche. La boîte de Pétri, sans être retournée et à moitié ouverte était placée à l'étuve en aérobie à 37 °C pendant une quinzaine de minutes. Nous avions noté une disparition de ces quelques colonies.

Test d'agglutination au latex (pneumo kit)

Sur 2 cercles différents d'une carte d'agglutination, on déposait une goutte d'eau physiologique pour mettre en suspension quelques colonies prélevées à l'aide de l'anse. Dans le premier cercle, on déposait une goutte de latex anti pneumoniae (R1) tandis que dans le second cercle, on déposait une goutte de latex témoin (R2). On mélangeait à l'aide de bâtonnet les colonies en suspension et le réactif latex et enfin, on faisait roter la carte pendant environ 2 minutes. La lecture se faisait en bon éclairage d'où l'apparition d'agglutination (agrégation) des particules de latex bien visibles.

III.2.3.3.2 Algorithme d'identification *Streptococcus pyogenes*

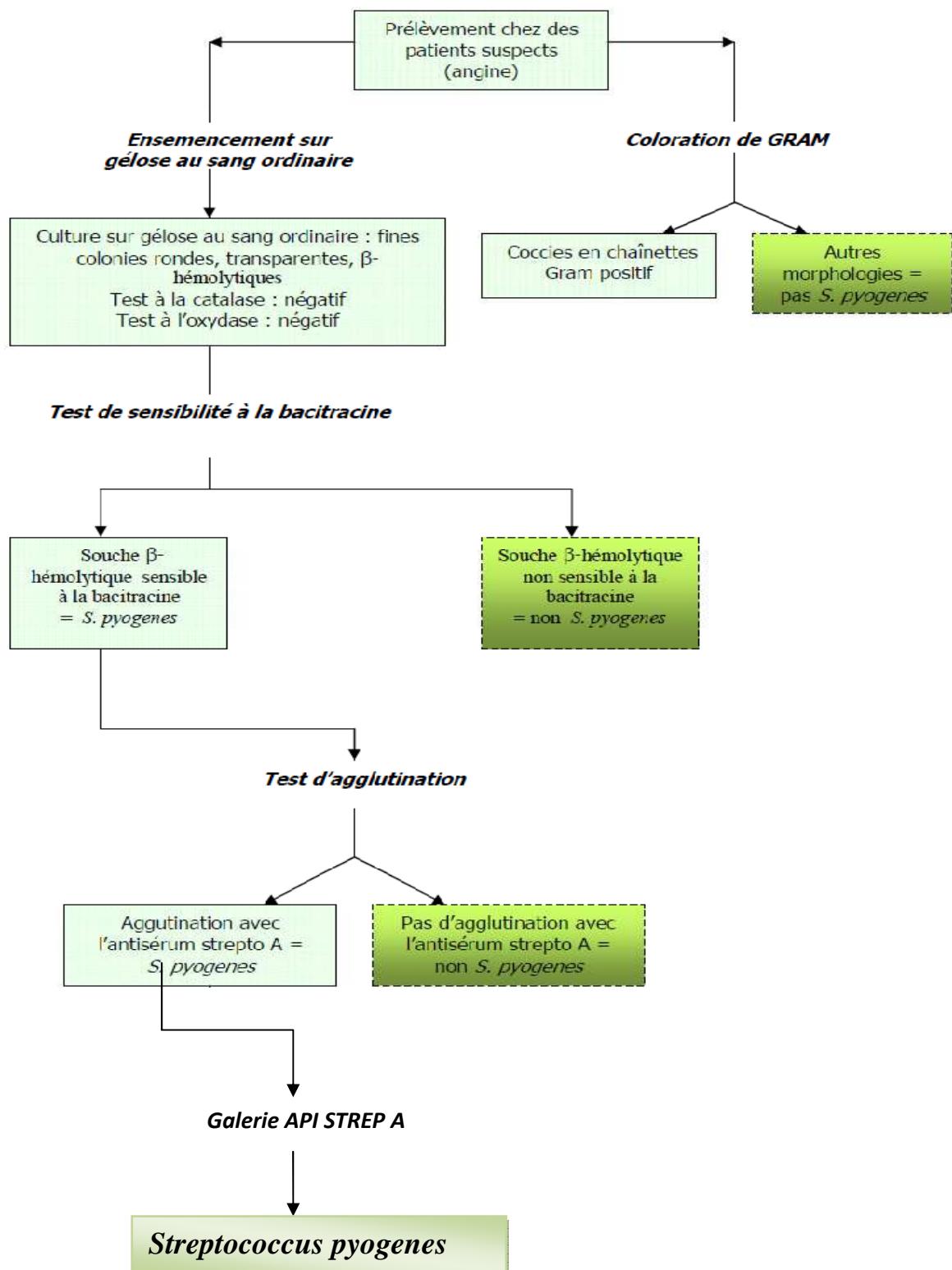


Figure 7 : Isolement et Identification de *Streptococcus pyogenes* [43]

Réalisation des tests d'identification

Le prélèvement était mis en culture sur GSO que l'on incubait à 37°C sous 5% de CO₂ (produit par la bougie) pendant 18-24 heures. Après incubation, la lecture du GSO présentait des colonies fines, lisses, translucides développant une hémolyse de type bêta.

- **Examen microscopique** : après coloration de Gram, l'examen microscopique présentait des cocci Gram positif disposés en courtes chaînettes.
- **Test à la catalase** (*cf. S.pneumoniae*) : on notait l'absence de Bulles d'air.
- **Test à l'oxydase** (*cf. S.pneumoniae*) : nous n'avions pas observé d'oxydation.
- **Test à la bile esculine** (*cf. S.pneumoniae*) : l'absence de virage de coloration était notée.
- **Test à BHS** (*cf. S.pneumoniae*) : l'absence de pousse était remarquée
- **Test de sensibilité à la bacitracine** : des colonies pures de Streptocoque bêta hémolytique étaient mises en suspension de manière à obtenir une turbidité égale à celle du tube 0,5 Mac Farland. L'inoculum était ensuite ensemencé sur la gélose au sang ordinaire (GSO) sur laquelle on déposait le disque de bacitracine. Après 24 heures d'incubation à 37°C sous atmosphère riche en CO₂, on observait une zone d'inhibition.
- **Test d'agglutination au latex (slidex streptoA®)** : Il consiste à avoir une agglutination visible à l'œil nu, s'expliquant par une réaction des particules de latex sensibilisées par un antisérum anti-streptocoque A avec le streptocoque A. Une goutte de latex en suspension était déposée

dans un des cercles de la carte d'agglutination. Une autre goutte de l'extrait contenant 2 ou 3 colonies mise en suspension dans 0.4 ml d'enzyme d'extraction était également déposée dans le même cercle à côté de la goutte de latex. A l'aide d'un bâtonnet, on mélangeait les deux gouttes de manière à étaler la suspension dans le cercle. A cette carte était attribué un mouvement de rotation pendant environ 2 minutes.

On observait une agglutination, ainsi la réaction était positive.

III.3.3.3.3 Algorithme d'identification *Haemophilus influenzae*

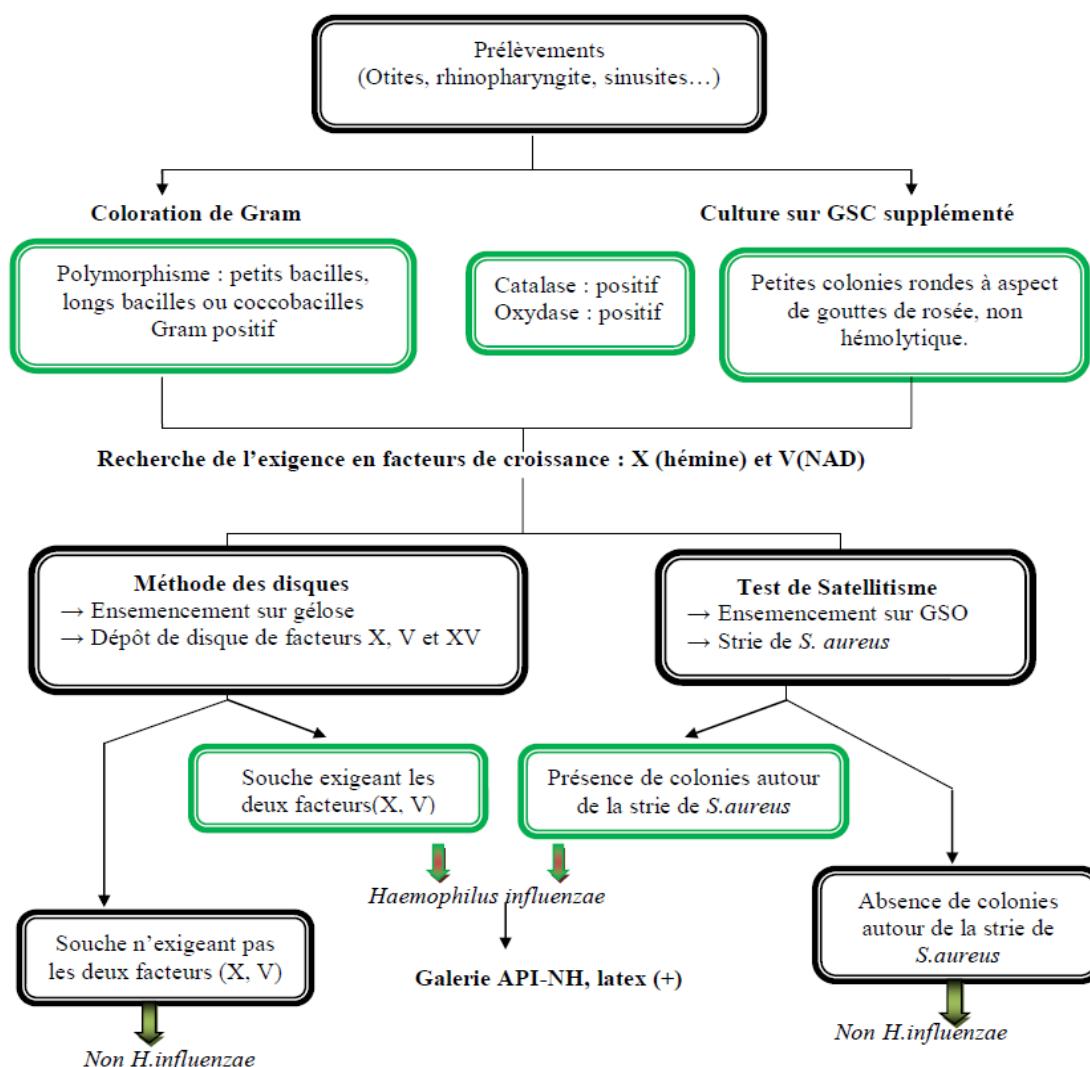


Figure 8 : Isolement et Identification de *Haemophilus influenzae* [44]

Réalisation des tests d'identification

Le prélèvement était mis en culture sur GSC + polyvitex® et incubé à 37°C sous 5% de CO₂ (produit par la bougie) pendant 16-18 heures. A l'examen macroscopique, nous avons observé de petites colonies rondes comme des gouttes de rosée et pas d'hémolyse.

- **Examen microscopique** : après coloration de Gram, on observait de petits bacilles ou de coccobacilles Gram négatif.
- **Test à la catalase** : les colonies qui étaient en contact avec la goutte d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) produisaient des bulles d'air matérialisant ainsi la libération d'oxygène.
- **Test à l'oxydase** : les colonies qui étaient prélevées et étalées sur une bandelette de papier - filtre imprégné, ont provoqué une oxydation d'où nous notions une coloration violet à noir.
- **Mise en évidence de l'exigence en facteurs X et V** : On utilisait le milieu MH et les disques de facteurs X, V et XV. Une suspension dense de bactéries à 0.5 Mc Farland était préparée à partir de colonies pures. La suspension était ensemencée en stries à l'aide d'un écouvillon stérile sur boîte de gélose MH. Puis, les disques contenant les facteurs X, V et XV étaient déposés sur la gélose à égale distance. La colonie n'avait poussé qu'autour du disque contenant les deux facteurs X et V.
- **Mise en évidence du phénomène de Satellitisme** : Ce test permettait de confirmer l'exigence en facteurs V apportés par une strie de *Staphylococcus aureus* sur gélose au sang de cheval contenant le facteur X. En effet sur une boîte de GSO, on ensemencait sous forme de stries serrées quelques colonies pures d'*H.influenzae* ; puis une strie de souche viable de *Staphylococcus aureus* de 24 heures. Le milieu GSO était incubé pendant 24

heures à 37°C sous atmosphère riche en CO₂ (5 %). Après incubation, on observait une pousse tout autour de la strie de staphylocoque et aucune pousse sur le reste de la boîte.

- **Micro méthode d'identification API NH (*Neisseria-Haemophilus*)**

Cette méthode était utilisée pour confirmer les germes identifiés. Ainsi dans la galerie API NH, on introduisait environ 50 microlitres de suspension bactérienne à 4 Mac Farland qu'on incubait pendant au moins 24 heures. Après incubation, on notait un virage de couleur spontané et celui-ci révélé par l'addition de réactifs. La lecture de la galerie se faisait à l'aide du tableau de lecture API NH.

II.3.3.3.4 Algorithme d'identification *Moraxella catarrhalis*

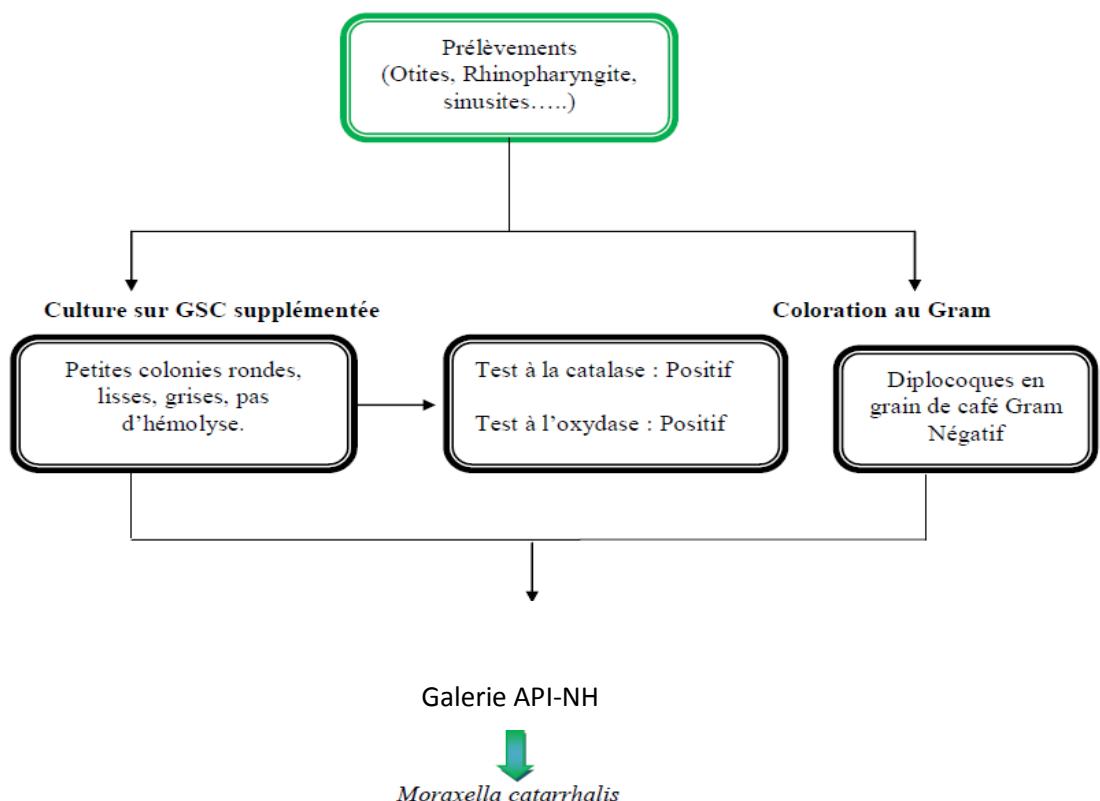


Figure 9 : Isolement et Identification de *M.catarrhalis* [44]

Réalisation des tests d'identification

Le prélèvement était cultivé sur GSC qui par la suite était incubé à 37°C sous 5% de CO₂ (produit par la bougie) pendant 16-18h. A l'examen macroscopique nous observions de petites colonies rondes, lisses et grises et pas d'hémolyse.

- **Examen microscopique :** après coloration de Gram, la lecture microscopique à l'objectif x100 avec une goutte d'huile à immersion présentait des diplocoques Gram négatif en grain de café.
- **Test de catalase :** *M.catarrhalis* avait une catalase positive.
- **Test d'oxydase :** le test à l'oxydase était positif pour ce germe.
- **Micro méthode d'identification API NH (*Neisseria-Haemophilus*) :** Cette méthode était utilisée pour isoler et pour valider l'identification de *Moraxella catarrhalis*. Cette méthode nécessitait un inoculum ajusté à 4 de Mc Farland.

La suspension bactérienne précédente était repartie dans les cupules en évitant la formation des bulles d'air. Les 7 premiers micro tubes ayant en dessous le tiret étaient remplis de 50 microlitres et recouverts d'huile de paraffine chacun, tandis que les 3 derniers étaient remplis de 150 microlitres de suspension bactérienne. Puis on incubait les galeries à l'étuve pendant 2h à 36°C en atmosphère aérobie et les résultats se traduisaient par un virage de couleur ou pas, spontané ou révélé par l'addition de réactifs. En outre, on recherche l'ODC (ornithine décarboxylase), l'uréase, l'indole et l'hydrolyse des sucres. La lecture de ces réactions se faisait à l'aide du tableau de lecture API NH.

Tableau II : RECAPITULATIF DE LA DUREE DES TESTS D'IDENTIFICATION

TEST	DUREE
Catalase	2 secondes
Oxydase	5 secondes
Sensibilité à l'Optochine	24-48 heures
Test de lyse par les sels biliaire	15-20 minutes
Test d'agglutination au latex	5 minutes
Api Strep	48 heures
Sensibilité à la bacitracine	24 heures
Par les disques imprégnées de facteurs X et V / Satellitisme	24 heures
Api NH	24 heures

III.2.3 Conservation des souches

Nous conservions les souches pures isolées par congélation à longue durée.

Les colonies pures de germes étaient prélevées à l'aide de l'anse et déposées dans un cryotube de 2 ml contenant : un bouillon cœur cervelle (BCC) + 10% de glycérol et 1 ml de sang défibriné stérile pour les souches *d'Haemophilus influenzae*. Il était nécessaire d'utiliser des cryotubes résistants à un froid extrême. Sur ces cryotubes étaient mentionnés : le numéro du prélèvement, le nom de la souche et la date de conservation. Ces cryotubes rangés dans un portoir étaient conservés au congélateur à une température de - 70°C.

III.2.4 Validation des méthodes d'identification des souches

Cette validation va porter sur l'identification de souches supposées inconnues. Elle sera basée sur la mesure de similitude entre leur profil et ceux des espèces identifiables à l'aide de données recueillies (tables diagnostiques). Cependant, nous avons utilisé les résultats de la galerie API 20 Strep et API NH comme référence [3,4].

Les tests d'identification ayant servis à la validation hormis les tests d'orientations retenus comme test différentiel de la méthode d'identification des germes étaient :

- Le test d'agglutination au latex et le test utilisant la galerie API 20 STREP pour *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes*
- Le test utilisant la micro méthode de l'API NH pour *Moraxella catarrhalis* et *Haemophilus influenzae*

III.2.4.1 Souches de référence

La validation passe par l'identification de souches références garantissant l'efficacité des différents milieux d'isolement, des galeries d'identification et des autres tests utilisés.

III.2.4.2 Autres critères de validation

Les paramètres tels que : la reproductibilité, la répétabilité, la sensibilité, la spécificité et la fiabilité servaient à confirmer de l'efficacité des méthodes d'identification.

Test de répétabilité

Une même souche pure était repiquée 3 fois sur le même lot de milieux et incubée à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 18-24 heures, puis nous observions les résultats obtenus en notant les variations obtenues au niveau des caractères

Test de reproductibilité

Une même souche était repiquée sur 3 milieux de lot différent et incubée 37°C sous 5 % de CO₂ pendant 18-24 heures. Après incubation, nous avions procédé aux méthodes d'identification citées plus haut en fonction de la souche.

La fiabilité, la sensibilité, la spécificité étaient étudiées par calcul de la probabilité. Pour cela, nous utilisions des tables diagnostiques (ou matrices de données) dans lesquelles nous retrouvions pour chaque taxon, la probabilité de positivité aux différents tests noté f et celle de négativité noté 1-f.

La détermination de la probabilité était interprétée selon les termes suivants :

Tableau III : Interprétation des résultats de probabilités relative [4]

Résultats	> 99,9 %	> 99 %	> 90 %	> 80 %	< 80 %
Interprétations	Excellent identification	Très bonne identification	Bonne identification	Identification acceptable	Identification inacceptable.

RESULTATS

I. Répartition

I.1 Nombres de prélèvements

Tableau IV : Répartition des prélèvements

Structure	Effectifs	Pourcentage
Prélèvements		
Nasal	114	65,14
pharyngé	59	33,72
Oreille	02	1,14
Total	175	100
Résultat		
Positif	34	19,43
Négatif	141	80,57
Total	175	100

Nous avons réalisé 175 prélèvements chez des enfants âgés de 2 mois à 15 ans , avec une prédominance de 114 prélèvements nasaux.

I.2 Souches isolées

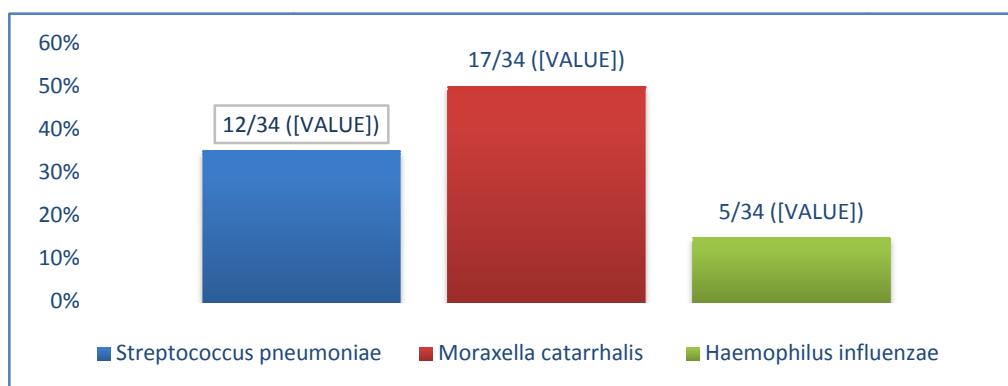


Figure 10 : Répartition des souches isolées

34 souches ont été isolées et identifiées, elles sont reparties comme suit : 12 *Streptococcus pneumoniae* (soit 35%), 17 *Moraxella catarrhalis* (soit 50%) et 05 *Haemophilus influenzae* (soit 15%).

Tableau V : Répartition des souches isolées en fonction de la pathologie

PATHOLOGIES	GERMES			Total
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	
Rhinites	10	12	04	26
Rhinopharyngites	02	03	01	06
Angines	00	02	00	02
Total	12	17	05	34

Le plus grand nombre de souches a été isolé dans les cas de rhinites. Les trois bactéries *Streptococcus pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *H. influenzae* étaient bien responsables de rhinites avec respectivement 10,12 et 4 cas.

II. Résultats de l'identification des germes

II.1 *Streptococcus pneumoniae*

Tableau VI : Résultat d'Identification de *Streptococcus pneumoniae*

Espèces	<i>S.pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>S.pneumoniae</i>	<i>S.sanguis</i>	<i>S.mitis</i>
Examen microscopique	Diplocoque G (+)	Diplocoque G (+)	Cocci G(+) en courte chaînette	Cocci G(+) en courte chaînette
Aspect des colonies	Petites plates, transparentes	Petites plates, transparentes	Petites blanches	Petites blanches
Hémolyse	Alpha	Alpha	Alpha	Alpha
Catalase	-	-	-	-
Bile esculine	-	-	-	-
BHS	-	-	-	-
Optochine	S	S/R	R	R
Test de lyse	+	+	-	-
Test d'agglutination	+	+	-	-

S : Sensible

R : Résistant

Nous avons les même résultats pour *Streptococcus pneumoniae* et la souche de référence *S.pneumoniae* ATCC 49619. Les résultats de la sensibilité à l'optochine, de la lyse par les sels biliaires ont orientés le diagnostic. Ainsi le test d'agglutination nous a permis d'identifier *Streptococcus pneumoniae* qui est différent des *Streptococcus viridans* (*S. sanguis* et *S. mitis*).

II.2 *Haemophilus influenzae*

Tableau VII : Résultat d'Identification de *H.influenzae*

Espèces	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49247	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
Examen	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille
microscopique	G(-)	G(-)	G(-)	G(-)
Aspect des	Petites, fines	Petites, fines en	Petites	Petites
colonies	en gouttelette	gouttelette de	colonies avec	colonies sans
	de pluies Sans	pluies Sans	Hémolyse	Hémolyse
	hémolyse	Hémolyse		
Catalase	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+
Exigence en	X+V	X+V	X+V	V
facteurs				
Satellitisme	+	+	+	-
UREE	+	+	-	+
ODC	-	-	-	-
INDOLE	+	+	-	-

Haemophilus influenzae est exigeant en facteurs X et V. Cependant il existe une similitude avec *H.haemolyticus* qui est aussi exigeant en facteurs X et V, mais la différence sera observée lors de l'identification par les caractères biochimiques comme l'urée et l'indole.

II.3 *Moraxella catarrhalis*

Tableau VIII : Résultats d'Identification de *Moraxella catarrhalis*

Espèces	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Neisseria lactamica</i>
Examen microscopique	Diplocoque G(-)	Diplocoque G(-)	Diplocoque G(-)
Milieu GSC	petites Colonies, lisses, sèches	Fines colonies, rondes humides	Petites colonies, glissante Fines
Catalase	+	+	+
Oxydase	+	+	+
Urée	-	-	-
Indole	+	+	+
Glucose	-	+	+
Maltose	-	+	+
Lipase	+	-	-
Bgal	-	-	+

Les colonies de *M. catarrhalis* sont très glissantes sur la gélose GSC + polyvitex®. Ce germe n'hydrolyse pas le glucose et le maltose.

III. Résultats de la validation des algorithmes

III.1 *Streptococcus pneumoniae*

Tableau IX : Caractères de validation *Streptococcus pneumoniae*

CARACTERES	ESPECES			
	<i>S.pneumoniae</i> <i>Testé</i>	<i>S.sanguis</i>	<i>S.mitis</i>	(<i>S.pneumoniae</i> probable)
colonies	100%	0%	0%	+
Transparentes				
Hémolyse α	100%	0%	0%	+
Optochine	90%	0%	0%	
Test de lyse	98%	0%	0%	
Test d'agglutination	100%	0%	0%	+
ESC	39%	42%	3%	-
ADH	57%	90%	99%	+
RAF	87%	55%	31%	+
TRE	98%	98%	1%	+

f = + 1-f = -

En respectant la démarche d'identification,

la Probabilité absolue pour que

X appartienne à *Streptococcus pneumoniae* est : **0,261**

X appartienne à *Streptococcus sanguis* est : **0**

X appartienne à *Streptococcus mitis* est : **0**

la Probabilité relative pour que

X appartienne à *Streptococcus pneumoniae* est: **100%**

X appartienne à *Streptococcus sanguis* est : **0%**

X appartienne à *Streptococcus mitis* est : **0%**

Avec cette probabilité relative de 100% nous pouvons dire l'identification de *S.pneumoniae* est excellent. (cf tableau IV)

III.2 *Haemophilus influenzae*

Tableau X : Identification de *H.influenzae*

CARACTERES	ESPECES			
	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>X(Haemophilus influenzae probable)</i>
Colonne en gouttelette de pluie	100%	0%	0%	+
Coccobacille G(-)	100%	0%	0%	+
Hémolyse	0%	100%	0%	-
Exigences en facteurs X+V	100%	100%	0%	+
Urée	92%	0%	55%	+
Indole	74%	0%	11%	+
ODC	40%	0%	73%	-
GLU	100%	100%	100%	+
MAL	2%	99%	94%	-
SACH	1%	96%	97%	-
Bgal	0%	0%	30%	-

f = +

1-f = -

En respectant la démarche pour l'identification de *H.influenzae*,

La Probabilité absolue que:

X appartienne à *Haemophilus influenzae* est : **0,35**

X appartienne à *Haemophilus haemolyticus* est : 0

X appartienne à *Haemophilus parainfluenzae* est : **0**

La Probabilité relative que :

X appartienne à *Haemophilus influenzae* est: **100%**

X appartienne à *Haemophilus haemolyticus* est : **0%**

X appartienne à *Haemophilus parainfluenzae* est : **0%**

La probabilité relative de 100% nous pousse à dire que la micro méthode API NH permet une excellente identification de *H.influenzae*. (cf. tableau IV)

II.3 *Moraxella catarrhalis*

Tableau XI : Identification de *Moraxella catarrhalis*

CARACTERES	ESPECES			
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Neisseria lactamica</i>	(<i>M.catarrhalis</i> probable)
Petites, lisses,				
Sèches glissantes	100%	0%	0%	+
Glucose	0%	97%	100%	-
Maltose	0%	90%	100%	-
LIP	100%	0%	0%	+
Bgal	0%	0%	100%	-

f = + 1-f = -

La Probabilité absolue que:

X appartienne à *Moraxella catarrhalis* est: **1**

X appartienne à *Neisseria meningitidis* est: **0**

X appartienne à *Neisseria lactamica* est: **0**

La Probabilité relative que :

X appartienne à *Moraxella catarrhalis* est: **100%**

X appartienne à *Neisseria meningitidis* est: **0**

X appartienne à *Neisseria lactamica* est: **0**

La galerie API NH nous a permis de faire une excellente identification de *Moraxella catarrhalis*. (cf tableau IV)

III.4 Répétabilité et reproductivité

Les essais réalisés 3 fois de suite ont donné des résultats identiques. C'est - à - dire un test d'agglutination positif en moyenne de 100% pour *Streptococcus pneumoniae* et le même résultat pour les tests biochimiques contenus dans la galerie API NH.

Les essais de répétabilité et de reproductibilité sont jugés satisfaisants avec un calcul de la variance égale à zéro.

DISCUSSION

Etape pré analytique

Prélèvement

Les prélèvements effectués étaient réalisés suivant le respect des règles d'hygiène et d'asepsie.

Dans notre étude, les prélèvements étaient réalisés à l'aide d'écouillon stérile à tige en bois ayant à son extrémité du coton. Arthur L. et coll. [34] ont également utilisé ce type d'écouillon afin de multiplier les chances de fixation des germes pour un bon résultat. Cependant, Uffe B. et coll [6] dans leurs études ont utilisé des écouillons en alginate de calcium sur tige en aluminium. Contrairement à nous, d'autres comme Mohamed A. [18], Bacoum M. [45] ont réalisé un prélèvement par aspiration à l'aide d'une seringue de gavage avec un embout adapté de 100µl afin d'avoir un prélèvement sans souillure externe probable.

Les écouillons utilisés étaient déposés dans un tube contenant un milieu de transport. Le milieu de transport dont la composition dérive du milieu de Stuart ou de Amies [8], permettait de préserver la vitalité des bactéries fragiles telles que *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* au minimum pendant 24h à température ambiante [24]. Le groupe de travail de vaccin contre le pneumocoque a évalué et recommandé le moyen de transport StGG à base de lait écrémé pour le transport et le stockage des prélèvements nasopharyngés pendant les essais au champ [46].

Les prélèvements étaient immédiatement conservés dans une glacière contenant un réfrigérant à une température d'environ 4° C à cause de l'extrême fragilité de certaines espèces comme *Haemophilus influenzae*. Puis, ces prélèvements étaient acheminés le même jour au laboratoire.

Examen bactériologique

Examen microscopique

L'examen microscopique permettait comme le mentionne Bacoum [45] d'orienter les investigations grâce à l'aspect de la flore. La difficulté était donc de pouvoir bien lire la lame pour apprécier la morphologie et la coloration des germes (pour déterminer le Gram).

Culture

Avant toute culture, le contrôle qualité des milieux préparés était effectué. La difficulté rencontrée était une possibilité de souillure (milieu non stérile) ou d'inefficacité du milieu.

Streptococcus pneumoniae

Streptococcus pneumoniae a été isolé sur GSN qui était à base de gélose Columbia + sang de cheval frais + acide nalidixique et sur GSC constitué de trypticase de soja + sang de cheval cuit. Sur GSN la poussée des germes déficients était inhibée. Sur ce milieu l'hémolyse, la transparence des colonies, la dépression centrale est plus visible. Cependant, Epote A. dans son étude a mentionné que la taille des colonies de *Streptococcus pneumoniae* sur GSC ne facilitait pas trop la lecture [1]. Certains auteurs comme DIOUF F. avaient utilisé le CLED et la gélose au chlorhydrate de pyridoxal pour isoler ces streptocoques, mais ce milieu ne donnait aucune information sur le type d'hémolyse [47]. GLEBBRAZA S. [3], pour l'isolement de *Streptococcus pneumoniae* a choisi le milieu GSC plus Gentamicine car, plus sélectif de ce pathogène. De même O'Brien k. [48] a aussi utilisé comme milieu sélectif pour l'isolement des pneumocoques, des plaques d'agar de sang avec la Gentamicine (G-HB agar, 5 ug gentamicine par ml, 5 % de sang de cheval.

Streptococcus pyogenes ATCC

Dans notre étude, le *Streptococcus pyogenes ATCC* poussait aisément sur milieu GSO qui est constitué de gélose Columbia et du sang de cheval frais. Ce milieu a été incubé à 37 °C sous une atmosphère enrichie en 5 % de CO₂ pendant 48 heures. GUEYE A. a montré que *cette bactérie* pousse aussi sur Mueller-Hinton additionné de 5 % de sang de cheval [4]. Ce même milieu est utilisé pour l'antibiogramme des *Streptococcus pyogenes*. Nous ne l'avons pas isolé dans notre étude.

Haemophilus influenzae

Sur GSC + polyvitex®, *H.influenzae* et *Moraxella catarrhalis* étaient mis en culture. Le GSC supplémenté était à base de trypticase de soja, de sang de cheval cuit et de polyvitex®. *Haemophilus influenzae* est un germe exigeant et à croissance difficile. Il préfère un milieu non déshydraté fraîchement préparé qui respecte les conditions d'incubation à 37°C [49]. Sa recherche se faisait sur milieu gélose chocolat contenant les facteurs X et V indispensables pour sa croissance [50]. Nous avons remarqué que ce germe ne poussait pas en absence de Polyvitex®. Sur GSC plus Polyvitex®, les colonies étaient petites, rondes bombées, grises, en forme de gouttelettes de rosée, à bord régulier et non hémolytique. Les mêmes caractères étaient visibles d'autres travaux notamment ceux de Epote A. [1], Soppo V. [5] et Magane M. [51].

GLEBBRAZA S. [3] affirme que le milieu GSC Bacitracine est un bon milieu sélectif pour l'isolement de *Haemophilus influenzae* et *Haemophilus parainfluenzae* car, il permet très souvent d'obtenir des primo cultures mono microbiennes.

Moraxella catarrhalis

Pour la culture de *Moraxella catarrhalis*, nous avons utilisé le milieu GSC. Gueye A. et coll. [4] avait cultivé ce dernier sur Gélose chocolat et avait obtenu le même résultat que nous.

Tous les milieux ensemencés étaient incubés à 37°C sous atmosphère enrichis avec 5 % de CO₂ pendant 18 à 24h. Plusieurs études l'ont également mentionnée [2, 5, 36, 52]. Cependant, d'autres auteurs [3] ont incubé les cultures pendant une nuit dans 5 % de CO₂ à 35°C et ont obtenu de bons résultats.

Méthode d'identification et validation

Pneumocoque

L'identification des pneumocoques est beaucoup plus basée sur l'aspect des colonies transparentes, l'hémolyse alpha, la sensibilité à l'optochine et la solubilité dans la bile. Ces tests ont été confirmés par l'identification par le test au latex et par le test biochimique. Uffe B [6] et O'Brien et coll. [48] l'ont confirmé en se limitant au sérotypage.

Mohamed A. et coll. ont insisté sur l'agglutination au latex et API 32 Strepto pour spécifier l'identification [18]. Gueye A. et coll [4] affirment que certaines espèces comme *S. mitis* et *S. oralis* possèdent des gènes d'enzymes similaires à ceux de *Streptococcus pneumoniae*. Les tests qui nous ont permis de faire la différence étaient le test de lyse par les sels biliaires et la sensibilité à l'optochine. Ceci a été démontré dans plusieurs travaux [4, 16, 39, 53, 54].

Des difficultés survenant lorsque le diamètre d'inhibition à l'Optochine est compris entre 7 et 13 mm, peuvent être estompées en recourant aux tests complémentaires comme le test de solubilité dans la bile ou au test d'agglutination de particules sensibilisées à un anticorps anti-pneumolysine commun à tous les sérotypes. Ce test d'agglutination présente une spécificité de

100 % et une sensibilité de 95 % [16]. A ces tests s'ajoutent d'autres tests biochimiques comme l'API[®] Strep mentionné Gueye A et coll [4] dans leurs travaux.

La détermination des antigènes capsulaires par le test d'agglutination des particules de latex est rapide et simple, mais elle présente des faux négatifs et des faux positifs. L'identification du pneumocoque peut être confirmée par la détermination du sérotypage capsulaire à l'aide d'anticorps ou par hybridation spécifique avec la sonde Accu Probe *Streptococcus pneumoniae*.

Il faut plusieurs jours pour l'identification de *Streptococcus pneumoniae*. C'est pour cette raison que Beaupère F. et coll. [8], ont trouvé nécessaire de mettre en place un test rapide et facilement réalisable pour identifier le pneumocoque et le différencier des autres streptocoques oraux directement à partir de prélèvements. Ce test consiste en effet à révéler deux activités enzymatiques différentes, l'une permettant l'identification présumptive du pneumocoque, l'autre sa différenciation avec d'autres streptocoques oraux.

Les études menées au CNRP (Centre National de Recherche des pneumocoques) concernant l'identification des *S.pneumoniae* montrent que, outre les tests phénotypiques que nous effectuons (aspect des colonies, sensibilité à l'optochine, lyse par les sels biliaires et sérotypage), l'appartenance à l'espèce *Streptococcus pneumoniae* des souches atypiques (résistantes à l'optochine, non lysées par les sels biliaires) et/ou non typables doit être vérifiée par des méthodes moléculaires telles que la PCR. Les 2 gènes dont la présence conjointe est quasi-spécifique de *S. pneumoniae* sont : le gène codant pour l'auto lysine principale (*lytA*) et le gène de la pneumolysine (*ply*) [55].

Dans les quelques cas douteux (présence d'un seul des 2 gènes), la technique de séquençage d'un panel de 7 gènes (house keeping genes ou gènes de ménage) est mise en œuvre. Il s'agit de la technique MLST (multilocus sequence type) qui est plus performante pour l'identification des souches

atypiques. Cependant c'est une technique fastidieuse et coûteuse qui relève du domaine de la recherche [56]. La technique utilisée actuellement en routine au CNRP est une agglutination au latex sur lame. Cette méthode a le double avantage de donner une agglutination observable à l'œil nu et de consommer peu d'antisérum [57]. Elle nous permet également de confirmer le diagnostic. Dans certains cas (agglutinations douteuses, discordances), la technique de référence dite de gonflement capsulaire ou encore « Quellung », méthode plus fastidieuse et coûteuse, est mise en œuvre : il s'agit de rechercher entre lame et lamelle au microscope à immersion l'agglutination directe d'une suspension de la souche de pneumocoque à étudier avec un antisérum pur et ceci successivement à l'aide d'un panel d'antisérum poolés.

Keyi Liu et coll [54] ont mentionné que l'identification des SPN dans MEF a été effectuée sur la base de la présence d'une hémolyse, l'inhibition d'optochine et confirmée par un test d'agglutination sur lame positive établit selon des procédures CLSI.

Streptococcus pyogenes ATCC

S. pyogenes ATCC était identifié à partir de ses colonies fines, lisses, translucides développant une hémolyse de type alpha, de sa négativité aux tests d'oxydase, de catalase, de bile esculine et de bouillon hypersalé, de sa sensibilité à la Bacitracine et des tests d'agglutination au latex. A l'instar de nos travaux, Gueye A. et coll. [4] ont identifié *S. pyogenes* par la présence de colonies minces et lisses qui apparaissent comme cocci à Gram positif groupés en chaînes; le test de la catalase négatif, montrant une inhibition de croissance autour d'un disque contenant 0,04 unités de Bacitracine et autres tests réalisés à l'aide (aide de l'API ® Strep BioMérieux, La Balme-les-Grottes, France).

Le test de catalase négatif différencie les streptocoques des staphylocoques qui ont une catalase positive. Celui de la bile esculine positif

caractérise les Entérocoques D, ce qui n'est pas le cas ici. Les méthodes assez différencielles telles que l'agglutination de particules de latex et le test à la Bacitracine permettent de confirmer les streptocoques bêta-hémolytiques. Seuls les streptocoques β -hémolytiques du groupe A sont sensibles à la Bacitracine, toutefois, les microcoques et les stomatocoques sont aussi sensibles [1], rendant ainsi l'agglutination au latex plus concluante [1, 2, 5].

Foumbi C. dans ses travaux ne s'est pas limité au test d'agglutination mais à prolongé sa recherche en utilisant la microméthode d'identification micro CSB [2]. Nous avons utilisé l'API 20 Strep, pour les mêmes paramètres.

Dans notre étude nous n'avons pas isolé *Streptococcus pyogenes*, peut être à cause de son absence dans le prélèvement. Cependant, l'analyse des prélèvements de gorge en cas d'angine ont mis du temps alors que grâce à l'utilisation des TDR, la prise en charge des angines Streptococciques est rapide. Certains auteurs tels que Cohen R et coll. [58] préconisent pour l'identification de *Streptococcus pyogenes*, l'utilisation des TDR qui s'avèrent plus performants pour limiter la fréquence des complications. Dans une autre étude toujours menée par Cohen R et coll. [58], L'utilisation du TDR seul avait le meilleur rapport coût-efficacité chez l'adulte comme chez l'enfant. Néanmoins, Maizia A. et col dans leurs études citent des cas où le TDR peut s'associer à la culture [59] : « la stratégie associant le TDR et la culture de prélèvement pharyngé pourrait être retenue car elle apporte aussi un surcroît d'efficacité. Dans le seul contexte à risque de RAA, un TDR négatif peut être contrôlé par une mise en culture ». Pour Cohen et col [59], le TDR apparaît comme plus simple à utiliser en pratique, notamment dans le contexte français, car la culture demande un délai d'un à deux jours, une sensibilité de 93,2 % et une spécificité de 95,3 % par rapport à la méthode de référence qui est la culture bactérienne.

Haemophilus influenzae

Nous avons identifié *H. influenzae* à partir de : ses petites colonies rondes à aspect de gouttes de rosée non hémolytiques ; sa positivité aux tests de catalase et d'oxydase ; de sa croissance autour des disques contenant les facteurs V et X uniquement, montrant son exigence pour la présence de ces facteurs. Ses réactions biochimiques (la positivité à l'uréase et au test d'indole et le non acidification du Maltose et saccharose) révélées par l'utilisation de l'Api NH qui nous a servis pour l'identification de ce germe.

Gueye A. et col [4] ont également identifié *H. influenzae* par la présence de petites colonies gris, humide et lisse ; l'absence d'hémolyse; la positivité des tests à la catalase et l'oxydase; la présence de facteurs de croissance X et V; la croissance satellite autour des stries de *Staphylococcus aureus*, et d'autres caractères biochimiques (en utilisant API NH ® galleria, Bio Mérieux, La Balme-les-Grottes, France).

L'exigence en facteurs V et X démontrée comme caractère d'identification dans notre étude a également été confirmé par : Floyd C. et coll. [60], Epote A. [1], Foumbi C. [2].

L'exigence en facteurs et le test de Satellitisme servaient de diagnostic différentiel entre *H.influenzae* et *H. parainfluenzae*, cela est également mentionné dans les travaux d'Epote A. [1], mais pas pour *H. haemolyticus* qui est aussi exigeant en facteurs. De ce fait, la galerie Api NH nous permettait de confirmer l'identification de *H. influenza*, cela a été confirmé par Gueye A [4].

Moraxella catarrhalis

Selon Gueye A. [4] *M.catarrhalis* a été identifié par la présence de petites colonies, rondes et lisses; l'absence d'hémolyse; le caractère positif catalase, les tests de la monoamine oxydase et d'autres caractères biochimiques (en utilisant l'API ® NH galleria, BioMérieux, La Balme-les-Grottes, France).

Dans notre étude, nous nous sommes également appesantis sur ces mêmes caractères pour identifier le germe, nous avons remarqué en plus que les colonies glissaient sur la gélose lors du contact avec l'anse comme l'a mentionné GLEBBRAZA S. [3].

La galerie Api a été très importante dans notre étude. Elle nous a permis de valider l'identification des germes et de faire le diagnostic différentiel de certaines espèces de *Neisseria* apparaissant également sous forme de diplocoques Gram négatif.

Selon Diagne M. [50], l'API NH utilisé était caractérisé par une bonne sensibilité, une spécificité, la reproductibilité et la rapidité des identifications. Nous pouvons dire avec Soppo V. [5] que cette micro méthode était suffisante pour différencier *M. catarrhalis* des *Neisseria*, car très sensible et spécifique surtout en présentant de manière fortuite la non acidification des sucres par *M. catarrhalis*.

Résultats

Le respect des méthodes d'identification des germes recherchés dans notre étude , nous a permis d'isoler 34 souches de germes à partir de 175 prélèvements nasopharyngés recueillis soit une fréquence de 19,43%. Ces 34 souches isolées et identifiées étaient réparties comme suit : 05 *H.influenzae* (15%), 17 *M. catarrhalis* (50%), et 12 *S. pneumoniae*. Des études similaires, ont été réalisées selon ces mêmes algorithmes par Gueye A et coll [4] à Dakar de 2007 à 2008. Ces derniers ont pu isoler et identifier sur 290 isolats bactériens : 75 *H. influenzae*, 10 *M. catarrhalis*, 105 *S. pneumoniae* et 100 *S. pyogenes*. Epote A. [1] dans son étude, a isolé 151 souches bactériennes dont : 8 souches de *S. pneumoniae* (5,29%), 4 souches de *S. pyogenes* (2,64%) 5 souches de *H. influenzae* (3,31%) et 1 souche de *H. parainfluenzae* (0,66%), 8 souches de *M. catarrhalis* (5,29%) à partir de 330 prélèvements de pus d'otite, de sinusite, de sécrétions naso pharyngés, d'xsudat de gorge.

GLEBBREZA S. [3] a pu isoler 97 souches dont : 16 *Streptococcus pneumoniae* (16,49%), 23 *Haemophilus influenzae* (23,71%), 2 *Haemophilus parainfluenzae* (2,06%), 4 *Branhamella catarrhalis* (4,12%). Soppo V. [60] avait isolé 65 souches dont 7 *H.influenzae* (10,76%), 10 *M.catarrhalis* (15,38%), 8 *S. pneumoniae* (12,30%), 40 *S.pyogenes* (61,53%) à partir de 133 prélèvements recueillis des enfants et des adultes. Ces études nous permettent d'évaluer l'efficacité des méthodes d'identification et d'apprécier la bonne reproductibilité de ces dernières. Ce qui nous permet de dire que ces méthodes sont toujours applicables et fiables.

Nous n'avons pas pu isoler de *S. pyogenes*, même dans les cas d'angines. Cela pourrait stipuler que les cas d'angines diagnostiqués dans notre étude étaient non Streptococciques.

Analyse des résultats de Validation

Afin d'apprécier la validité de la démarche, des résultats des calculs de probabilités absolue et relative ont été obtenus. Ainsi que des résultats des tests de répétabilité et de reproductibilité. Foumbi C. [2] l'a mentionné dans son travail.

Nous avons retenu certains caractères jugés essentiels et différentiels pour calculer les probabilités.

La méthode d'identification de *Streptococcus pneumoniae* a été jugée excellente avec une probabilité relative est de 100%. Ce même résultat a été trouvé par Tening Sarr [61] et Foumbi C. [2].

La méthode d'identification de *Haemophilus influenzae* a également été jugée excellente, avec une probabilité relative de 100%. Ce résultat est aussi obtenu par Foumbi C. [2].

La méthode d'identification de *Moraxella catarrhalis* également été jugée excellente, avec une non acidification des sucres assez différentiel et une libération de la lipase déterminante. La probabilité relative est de 100%. Ce résultat est aussi obtenu par Foumbi C. [2].

La méthode d'identification est validée par la stabilité des résultats obtenus. Elle est d'autant plus fiable qu'elle permet d'obtenir des résultats sans équivoque.

Les essais de répétabilité et de reproductibilité sont jugés satisfaisant avec un calcul de la variance égale à zéro. Par conséquent les résultats étaient stables et fidèles. Ceci à été confirmé par Foumbi C. [2] qui dans son étude, a obtenu une variance presque nulle qui fait montre de l'étroitesse de différence au cours des trois opérations successivement effectuées. Dans son étude elle note également que, pour tous ces germes les résultats de la variance ne sont pas significativement différents. C'est ce qui explique la stabilité des résultats lorsque la procédure est répétée. Par conséquent La stabilité des résultats montre le caractère répétable des algorithmes d'identification.

La valeur des probabilités absolues varie considérablement. Elle est parfois très faible c'est le cas des probabilités absolue pour l'identification des *Streptococcus pneumoniae* (0,261) et *Haemophilus influenzae* (0,35), ceci expliquant la difficulté d'obtention de certains résultats. C'est le cas par exemple des caractères comme l'acidification des sucres essentiellement « Raffinose » et « tréhalose » qui présentent parfois des variations de coloration ne permettant pas de conclure avec certitude de l'identité du germe. Ceci a également été confirmé par Foumbi C. [2]. Parfois elle est élevée. Cette probabilité est égale à 1 pour l'identification des *Moraxella catarrhalis*, ceci permet de noter que la méthode API NH convient a l'identification de ce germe.

Limite :

Pour certains germes, tels que *Streptococcus pneumoniae*, la probabilité absolue est très faible. Cela montre les insuffisances de la démarche de diagnostic de ces germes.



CONCLUSION

Les infections respiratoires aiguës des voies aériennes supérieures d'origine bactérienne sont très fréquentes chez les enfants. Elles désignent un groupe de maladies hétérogènes très souvent causées par les agents étiologiques tels que : *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pyogenes*.

La prise en charge de ces infections bactériennes passe par un diagnostic et une antibiothérapie adaptée et efficace. Pour ce faire, elle nécessite des techniques de laboratoire bien codifiées afin de donner des résultats fiables et précis.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude, qui avait pour but d'isoler les germes à l'origine des infections respiratoires aiguës hautes de l'enfant et de valider les méthodes d'identification de ces germes selon qu'elles sont utilisées dans nos laboratoires.

L'étude s'est déroulée à Dakar de Décembre 2011 à Mai 2012 au sein de l'unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec de Dakar (HALD) en collaboration avec le service d'Oto-Rhino-Laryngologie (ORL) de l'Hôpital Fann et de l'Hôpital d'Enfant Albert Royer de Dakar (HEAR) pour les prélèvements.

Les patients sélectionnés pour cette étude étaient des enfants âgés de 2 mois à 15 ans reçus en consultation externe, présentant des symptômes d'infections respiratoires aiguës des voies hautes de moins de 15 jours et n'ayant pas d'antibiotique. 175 prélèvements nasopharyngés et amygdaliens avaient été effectués et analysés suivant les méthodes usuelles au laboratoire. Ceci nous a donc permis d'isoler 34 souches soit: 12 souches de *Streptococcus*

pneumoniae (35%), 17 souches de *Moraxella catarrhalis* (50 %), 05 souches de *Haemophilus influenzae* (15 %), aucune souche *Streptococcus pyogenes*.

La stabilité et la fiabilité de ce résultat ont été attestées par des contrôles effectués avec des souches de référence garantissant l'efficacité des tests utilisés et le calcul des probabilités relatives et absolues pour nous permettre de valider les méthodes d'identification.

La Probabilité absolue obtenue a été de :

- 0,261 pour *Streptococcus pneumoniae*
- 0,35 pour *Haemophilus influenzae*
- 1 pour *Moraxella catarrhalis*

La Probabilité relative obtenue a été de :

- 100 % de *Streptococcus pneumoniae*
- 100 % d'*Haemophilus influenzae*
- 100 % de *Moraxella catarrhalis*

Les probabilités absolues faibles nous ont permis d'évaluer certaines difficultés rencontrées lors de l'identification. Tandis que les probabilités absolues élevées ont permis de juger de l'efficacité de certaines méthodes d'identification.

La probabilité relative obtenue à partir de la probabilité absolue nous a permis de conclure que les méthodes d'identification des germes tels que : *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* utilisées dans nos laboratoires sont excellentes car, la probabilité a été supérieure à 99,9 %. Par conséquent, les méthodes sont spécifiques et fiables lorsque la démarche est rigoureusement respectée.

Les essais de répétabilité et de reproductibilité sont jugés satisfaisants avec un calcul de la variance égale à zéro. Par conséquent la méthode est répétable et reproductible rendant ainsi les résultats stables et fidèles.

Les méthodes d'identification utilisées dans nos laboratoires de Bactériologie à Dakar, sont encore efficaces et fiables. Elles nécessitent un respect rigoureux de la démarche et un contrôle permanent.

Recommandations

Au terme de notre étude, nous pouvons ainsi recommander:

- Au laboratoire de bactériologie :

Utilisation des protocoles d'identification sous formes d'algorithme.

Faire un contrôle permanent des méthodes utilisées au laboratoire par le calcul des incertitudes.

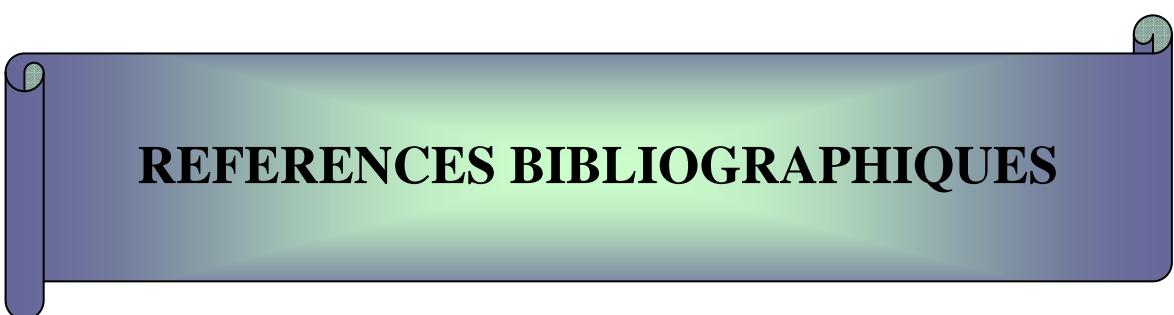
La surveillance métrologique des appareils à l'aide des cartes de contrôle.

La surveillance annuelle des souches responsables d'infection respiratoire, pour déterminer le niveau de résistance de ces souches.

- Au ministère de la santé :

Former le personnel de santé à l'utilisation des TDR, pour le diagnostic systématique des angines Streptococcique.

Une subvention des Tests de diagnostic rapide (TDR) afin de réduire le temps d'identification des Streptocoques



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. EPOTE A.

Etude de la sensibilité des souches isolées d'infections respiratoires de la sphère ORL

Thèse Pharm. Dakar 2006, n° 41.

2. FOUMBI C.

Algorithme les infections respiratoires aiguës

Thèse Pharm. Dakar 2006, n°25.

3. GLEBBRAZA S.

Haemophilus, Moraxella et Streptococcus pneumoniae dans les Infections Respiratoires basses Communautaires

Thèse Pharm. Dakar, 2000 n°83.

4. GUEYE A., BOYE C.S.B., EDWIGE H.

Antimicrobial susceptibility of select respiratory tract pathogens in Dakar, Sénégal.

J Infect Dev Ctries 2009; 3(9):660-666.

5. SOPPO V.

Etude de la sensibilité des souches de *Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes* isolées d'infections respiratoires aigues.

Thèse Pharm. Dakar : 2006, n°22.

6. UFFE B., SKOV S., SLOTVED H.C.

Une méthode simple pour la détection du portage nasopharyngé de multiples *Streptococcus pneumoniae* sérotypes.

Journal des méthodes microbiologiques Décembre 2008, Vol.75, 3 : 540-544.

7. REYT E.

Particularités anatomiques et physiologiques des voies aériennes supérieures de l'enfant.

Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation 2003, 22 : 886-889

8. Brook I.

Current issues in the management of acute bacterial sinusitis in children
International Journal of Pediatric.

Otorhinolaryngology 2007, 71: 1653-1661.

9. CARON A., SAVAGE C.

Larousse médical

Larousse, Paris Edition 2006

10. NICOLLAS R., SUDRE-LEVILLAIN I., TRIGLIA M.

Oties moyennes aiguës de l'enfant.

EMC-Médecine 2004, 1 : 433-439.

11. HEIKKINEN T., RUSKANEN O.

UPPER infection des voies respiratoires.

Encyclopédie de médecine respiratoire 2006, pages 385-388

12. BERMAN S.

Epidemiology of acute respiratory infect in children of developing countries.

Rev. Infect. Dis. 1991, 13: 54-62.

13. LAFAIX C. ET REINER PH.

Morbidité et mortalité des infections respiratoires aigues chez l'enfant de moins de 5ans dans le monde.

Med.mal infect. 1997, 27 : 507-12.

14. SOCIETE FRANÇAISE D'ORL ET DE CHIRURGIE CERVICO-FACIALE,

Les infections ORL.

Méd Mal infect 1996.

15. VONG S., GUILLARD B., BORAND L.,

Acute lower respiratory infections in ≥ 5 year old hospitalized patients in Cambodia, a low-income tropical country: clinical characteristics and pathogenic etiology.

BMC Infectious Diseases 2013, 13:97.

16. BENBACHIR M., BENREDJEB S., BOYE C.

Two-year surveillance of antibiotic resistance in streptococcus pneumoniae in four African cities antimicrobial agents and chemotherapy,

American society for microbiology © 2001, n°2, vol. 45 p. 627-629

17. BELLANGER H.

Etude des prescriptions d'antibiotiques pour infections respiratoires aigues dans les ordonnances de sortie aux urgences pédiatriques.

Thèse Médecine, Paris 7 : 08 avril 2010.

18. MOHAMED A. ELEMRAID, ANDREW D.

Pneumococcal diagnosis and serotypes in childhood community-acquired pneumonia

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2013, 76: 129–132.

19. AETAL M.

Stratégies de diagnostic de l'angine aiguë en France: une étude coût-éfficacité,

Presse Med 2011

20. AMMARI H., RAMDANI-BOUGUESSA N., BELLOUNI R.

Antibiothérapie dans les infections orl.

Médecine du Maghreb 2001 n°91 : p. 28-31

21. BINGEN E.

Résistance du streptocoque du groupe A aux macrolides.

J Pediatr Puericult 2005;18:349–53.

22. MAALEJ M., REKIK M., BOUDAOUARA M.,

Les angines aiguës de l'enfant dans la région de Sfax (Tunisie) : épidémiologie et intérêt du test de diagnostic rapide.

Médecine et maladies infectieuses 2010, 40 : 226–231.

23. GWALTNEY JR.

La sinusite aigue acquise dans la communauté
Clin. Infect. Dis., 1996, 23 : p 1209-1223.

24. KLOSSEKA J., QUINETB B., BINGEN E.,

État actuel de la prise en charge des infections rhino sinusielles aiguës de l'enfant en France.

Médecine et maladies infectieuses 2007, 37 : 127–152.

25. FRANÇOIS M., HAMRIOUI R., VAN DEN ABEELE T.,

Ethmoïdites aiguës de l'enfant traitées médicalement, à propos d'une série de 59 cas.

Réunion de printemps de l'AFOP Paris: VII; 2000. p. 11–2.

26. BOURRILLON A., BENOIST G., COHEN R.

Prescriptions actuelles de l'antibiothérapie chez le nourrisson et l'enfant.

Archives Pédiatrie 2007, 14 : 932–942.

27. Brook I.

Microbiologie et de la gestion des antimicrobiens de la sinusite.

J. Laryngol. Otol., 2005, 119 : 251-258.

28. BINGEN E.

Épidémiologie des germes et de la résistance au cours des OMA.

Med Ther Pediatr 2007; 10:163–71.

29. **GEHANNO P., PANAJOTOPoulos A., BARRY B.,**
Microbiology of otitis media in the Paris, France, area from 1987 to
1997.
Pediatr Infect Dis J 2001; 20:570 –3.
30. **MESSAI M., DOIT C., MARIANI-KURKDJIAN P.,**
Épidémiologie des otites moyennes aiguës à pneumocoque : émergence
du sérotype 19A.
Archives de pédiatrie 2008, 17: 13–1716
31. **STANDARD OPERATING PROCEDURE**
Identification Of *Streptococcus* species, *Enterococcus* Species And
morphologically Similar Organisms
Health Protection Agency 2003, 1:1-17
32. **BERTHA A.**
Streptococcus pneumoniae infections
X Pharm. 2007, Pages 1-5.
33. **UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE BACTERIOLOGIE
DCEM1 2002 – 2003**
Service de Bactériologie. Mise à jour : 24 mars 2003. Paris VI
34. **ARTHUR L., PETER C., STEVEN D.**
Strains of *Haemophilus influenzae* with Four Methods and Eight Media
Antimicrobiens Agents
La Chimiothérapie Mai 2001, n° 5, Vol. 45, p. 1585-1588.

35. BEAUPERE F., CONTANT G.

Method of identifying pneumococci brevet EP 1103621A1,

Brevet , publication 30 mai 2001

36. PINA G., RAYNAUD D.

Critères de choix d'une méthode d'identification

DES Bactériologie-Virologie, Dakar 2003

37. CARRIERE, CARACHON, SECONDY et RISPAIL

Diagnostic et suivi des infections ORL : le bon usage des examens biologiques

Cours de bactériologie 2006 – 2007, Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes

38. DIAGNE M.

Examen cytobactériologique des crachats, lavage broncho alvéolaire et aspiration bronchique dans les infections respiratoires aiguës.

Thèse Pharm., Dakar, 2005, n°56.

39. FACKLAM R., LE JUGE WASHINGTON

Streptococcus et connexes catalase négative Coccis Gram positif.

Manual of Clinical Microbiology 1991, 5th ed., p 238-257.

40. NORME ISO/CEI 17025

Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.

Juillet 2005

41. GUEYE F.

Validation de méthode d'identification des bactéries : Cocc à Gram positif

DEA de Biologie Végétale, Dakar, Décembre 2007

42. CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUEBEC

Protocole pour la validation et la vérification d'une méthode d'analyse en microbiologie,

DR-12-VMM, Québec, 6 février 2012.

43. PERILLA M., AJELLO G., BOPP C.,

Manual for laboratory Identification and Antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens of public health importance in the Developing World.

WHO/CDS/CSR/RDM/2003.6.

44. CISSE A.

Profil de sensibilité aux antibiotiques des bacilles a gram négatif isolés d'infections purulentes de la sphère orl à Dakar,

Thèse Pharm., Dakar, 2012, n°47.

45. BACOUM M.

Contrôle de qualité et validation de différente micro méthodes d'identification bactérienne.

Thèse Pharm. Dakar 2004 n°08.

46. O'BRIEN K., BRONSDON M., DAGAN R.

L'évaluation d'un milieu (StGG) pour le transport et la récupération optimale de *Streptococcus pneumoniae* à partir des sécrétions naso-pharyngés recueillies au cours des études de terrain.

J. Clin. Microbiol., 2001, 39 : 1021-1024.

47. DIOUF F.

Sensibilité des Streptocoques non groupables aux antibiotiques

Thèse Pharm., Dakar, 2002, n°67

48. O'BRIEN K., NOHYNEK H.

Rapport d'un groupe de travail de l'OMS: méthode standard de détection de transport des voies respiratoires supérieures de *Streptococcus pneumoniae*.*Pediatr.*

Infect. Dis. J. 2003, 22 : 1-11.

49. NANCIEL C.

Bactériologie médicale

Masson, Paris 2000 Édition 2000 Vol 2 pp.294.

50. DIAGNE M.

Examen cytobactériologique des crachats, lavage broncho alvéolaire et aspiration bronchique dans les infections respiratoires aiguës.

Thèse Pharm., Dakar, 2005, n°56.

51. MANGANE M.

Sensibilité aux antibiotiques de *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis* isolés d'infections respiratoires aigues.

Thèse Pharm., Dakar, 2004, n°74.

52. KRISHNAMURTHY A., MCGRATH J., CRIPPS A.

The incidence of *Streptococcus pneumoniae* otitis media is affected by the polymicrobial environment particularly *Moraxella catarrhalis* in a mouse nasal colonisation model.

Microbes and Infection. 2009, 11: 545-553.

53. HAMDADA F., CANARELLI B., ROUSSEAU F.,

Streptococcus pneumoniae meningitis in Amiens Hospital between 1990 and 2005. Bacteriological characteristics of strains isolated
Pathologie Biologie 2007, 55: 446–452.

54. LIU K., LINLIN C., KAUR R.

Transcriptome signature in young children with acute otitis media due to *Streptococcus pneumoniae* signature,

Microbes and Infection 2012.

55. PAI R., GERTZ R., BEALL B.

Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates.

Journal of Clinical Microbiology 2006. 44:124-131.

- 56. CARVALHO M.G., TONDELLA M. L., MCCAUSTRAL K.**
Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting lytA, ply, and psa A genes for detection of pneumococcal DNA.
Journal of Clinical Microbiology 2007, vol 45 N° 8 :2460-2466.
- 57. GUTMANN L., VARON E.**
Epidémiologie 2009.
Rapport d'activité du CNRP 2010, Paris
- 58. COHEN R, CHAUMETTE L, BINGEN E.**
L'avenir de l'angine : les tests de diagnostic rapide.
Méd Mal Infect 1997, 27:424–33.
- 59. MAIZIA A, LETRILLIART L. .**
Stratégies de diagnostic de l'angine aiguë en France : une étude coût-
efficacité
EMC 2011, p 195
- 60. FLOYD C.**
Infections à *Haemophilus*,
X Pharm. 2007, Pages 1-4.

WEBOGRAPHIE

61. Poletto B.

Cancers du larynx

<http://www.arcagy.org/infocancer/localisations/voies-aériennes/cancers-du-larynx/maladie/un-peu-danatomie.html>.

Consulté le 21 mars 2012

62. Nezpirateur

Anatomie du nez

[\[http://www.nezpirateur.fr/nezpirateur-aspirateur-nasal-anatomie.html\]](http://www.nezpirateur.fr/nezpirateur-aspirateur-nasal-anatomie.html), consulté le 21 mars 2012.

63. Plante S.

Oties

[\[http://www.kine-formations.com/Oties_a417.html\]](http://www.kine-formations.com/Oties_a417.html), Consulté le 21 mars 2012.

SERMENT DE GALIEN

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

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

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

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

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

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

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

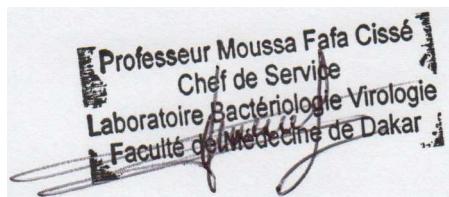
PERMIS D'IMPRIMER

Vu :

Le Président du jury

Vu :

Le Doyen de.....



Vu et Permis d'imprimer

Pour le Recteur, Président de l'Assemblée d'Université Cheikh Anta Diop de Dakar
et par délégation

Le Doyen

GOUHOUE TCHOUANCHE Josiane :

Isolement et validation des méthodes d'identification des souches : *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Moraxella catarrhalis* à l'origine d'infections respiratoires aiguës hautes de l'enfant à Dakar

Thèse Pharm., Dakar, 2013, n°70

Unité de Recherche, Biotechnologie, Bactériologie-Virologie FMPOS/UCAD

RESUME

Cette étude, menée à Dakar de décembre 2011 à mai 2012, avait pour but d'isoler les germes à l'origine des infections respiratoires aiguës hautes de l'enfant et de valider les méthodes d'identification de ces germes selon qu'elles sont utilisées dans nos laboratoires.

Au total, 34 souches ont été isolées à partir de 175 prélèvements rhinopharyngés obtenus chez des patients âgés de deux mois à 15 ans.

Ces souches étaient reparties comme suit : 12 souches de *Streptococcus pneumoniae* (35%), 17 souches de *Moraxella catarrhalis* (50 %), 05 souches de *Haemophilus influenzae* (15 %), aucune souche *Streptococcus pyogenes*.

Les méthodes d'identification utilisées pour déterminer ces souches ont été validées par le calcul de probabilités relatives, absolues et les tests de reproductibilité et répétabilité. La Probabilité absolue obtenue a été de : 0,261 pour *Streptococcus pneumoniae*, 0,35 pour *Haemophilus influenzae*, 1 pour *Moraxella catarrhalis*

La Probabilité relative obtenue a été de : 100 % de *Streptococcus pneumoniae*, 100 % d'*Haemophilus influenzae*, 100 % de *Moraxella catarrhalis*.

Les essais de répétabilité et de reproductibilité ont été jugés satisfaisants avec un calcul de la variance égale à zéro.

Ces résultats nous permettent d'affirmer que les méthodes d'identification utilisées dans nos laboratoires sont excellentes, car la probabilité relative a été supérieure à 99,9 %. Elles sont spécifiques et fiables lorsque la démarche est rigoureusement respectée et donnent des résultats stables et fidèles.

Mots-clés : Infections respiratoires hautes de l'enfant

- Validation des méthodes d'identification de *Streptococcus pneumoniae* - *Moraxella catarrhalis* - *Haemophilus influenzae* - *Streptococcus pyogenes*.