

Introduction

Les infections respiratoires aiguës sont des affections graves et fréquentes, qui en dépit des progrès de la médecine en général, des moyens de diagnostic et de traitement en particulier et nonobstant les efforts consentis ainsi que les moyens déployés en matière de recherche allant dans ce sens, demeurent un problème sérieux de santé publique.

En effet, elles sont responsables dans le monde de 1 900 000 de décès par an et constituent en France la première maladie infectieuse, sa mortalité est la sixième cause de décès et la première cause de décès par pathologies infectieuses (2, 43).

Le traitement se heurte à plusieurs difficultés parmi lesquelles on peut citer :

- La difficulté de réaliser un diagnostic précis avant toute prescription et ceci tend à augmenter la résistance aux antibiotiques par administration d'une molécule inadaptée.
- La difficulté d'une prise en charge correcte à l'hôpital à cause des infections nosocomiales surtout dans les pays en voie de développement.
- En Afrique, il ne faudrait pas oublier l'absence pratiquement de consensus thérapeutique si l'on sait que dans les pays développés se tiennent souvent des réunions, colloques, ateliers regroupant des experts dans tous les domaines concernés : cliniciens, biologistes, environnementalistes, statisticiens...

Parmi ces difficultés rencontrées, le diagnostic occupe une part importante.

En effet, si pour certains germes il a été démontré que l'examen cytbactériologique des crachats suffit pour les identifier, il n'en demeure pas moins que pour d'autres, on continue d'utiliser des méthodes invasives et contraignantes pour le malade que sont le lavage broncho-alvéolaire et l'aspiration bronchique ; qui en plus nécessite une endoscopie qui coûte cher. C'est justement

pour essayer de les contourner qu'on a mené cette étude et qui avait comme objectifs spécifiques :

- ❖ une étude comparative des différents types de prélèvement afin de dire si l'ECBC qui est de réalisation facile suffit pour identifier tous les germes responsables des infections respiratoires aiguës ;
- ❖ au cas échéant définir les conditions optimales de réalisation et de traitement du prélèvement ;
- ❖ au cas contraire dire pour chaque germe quel est le prélèvement le mieux adapté à son identification.

Généralités

I. RAPPELS SUR LES INFECTIONS RESPIRATOIRES

AIGUES

Les voies respiratoires supérieures sont colonisées par une flore commensale diverse et variée. En revanche les voies respiratoires post-pharyngées ou voies respiratoires inférieures sont normalement stériles.

L'implantation puis la multiplication d'une bactérie va entraîner une infection des voies respiratoires (trachéite, bronchite) et / ou une infection du parenchyme pulmonaire (pneumonie, abcès).

Les microorganismes responsables de ces infections sont soit des virus, soit des bactéries, soit des parasites ou encore des champignons opportunistes. Nous n'envisagerons ici que les bactéries.

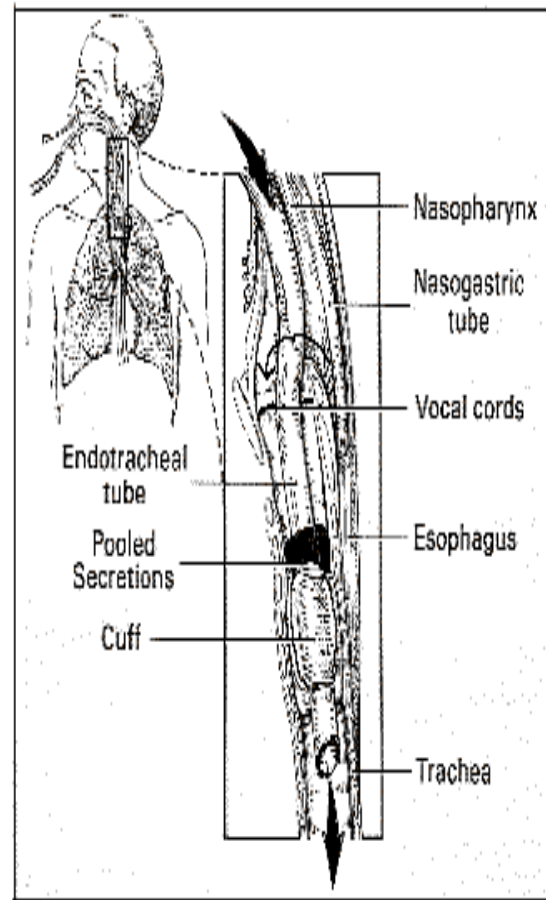
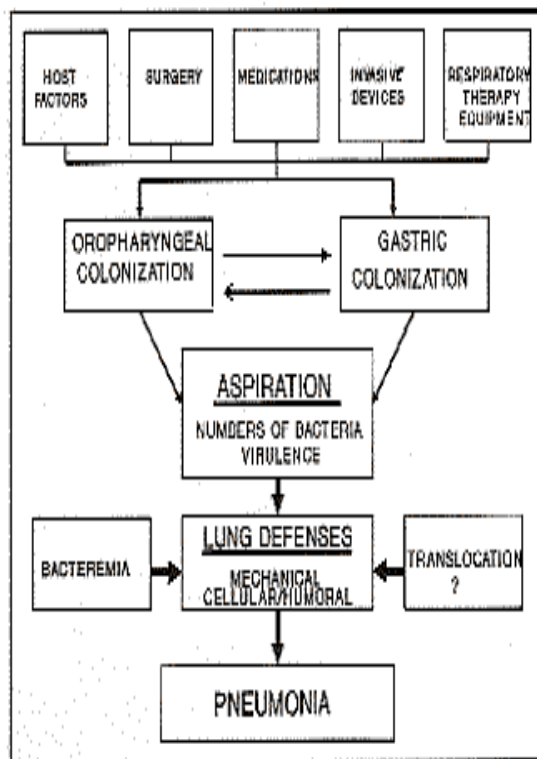


Figure 1 : Schéma de l'appareil respiratoire

I.1 MECANISMES ASSURANT LA STERILITE DES VOIES AERIENNES INFERIEURES

On note deux mécanismes assurant cette stérilité :

- ✓ Epuration mécanique

Elle est réalisée par la muqueuse ciliée trachéale, par le réflexe de toux et la production de mucus

- ✓ Phagocytose

Elle est l'œuvre des macrophages, des polynucléaires, des IgA et IgG

I.2 PROCESSUS PATHOLOGIQUE

- Inhalation de particules contaminées
- Diminution des défenses favorisée par le froid, les infections virales, la stase bronchique, le tabagisme, la mucoviscidose, et l'immunosuppression.

I.3 DEFINITIONS

I.3.1 Infections respiratoires aiguës hautes

I.3.1.1 Angines (46)

Ce sont des inflammations douloureuses et fébriles des formations lymphoïdes de l'oropharynx et essentiellement des amygdales palatines. Elles peuvent être en cause dans les complications infectieuses locorégionales, générales et inflammatoires à distance essentiellement pour les angines à Streptocoque β -hémolytique du groupe A.

I.3.1.2 Sinusites (46)

Infection d'une ou de plusieurs sinus para-nasal, compliquant en général un banal rhume ou toute autre infection virale des voies aériennes supérieures.

I.3.1.3 Otites (46)

Il s'agit presque toujours de la surinfection bactérienne d'une infection virale dont le point de départ est le rhinopharynx. C'est surtout une pathologie pédiatrique consécutive aux très nombreuses infections rhino-pharyngées de l'enfant, beaucoup moins fréquentes à partir de 6 –7 ans. On peut les observer très tôt, dès les premières semaines de la vie.

I.3.1.4 Laryngites et épiglottites (46)

C'est une inflammation de l'isthme laryngé qui peut siéger au niveau glottique, sous glottique et épiglottique.

I.3.2 Infections respiratoires aiguës basses

I.3.2.1 Bronchites aiguës

Elles sont définies par une inflammation aiguë des bronches et des bronchioles. Son origine virale est très largement prédominante. *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* apparaissent comme des agents de surinfection.

I.3..2.2 Pneumonies

Les pneumonies sont des infections du parenchyme pulmonaire habituellement localisées à un segment ou à un lobe pulmonaire. Elles réalisent des infections potentiellement sévères relativement rares par rapport aux infections bronchiques.

I.3.2.3 Bronchiolites

C'est une inflammation des bronchioles diagnostiquée chez les enfants de moins de deux ans et est le plus souvent due à un virus (VRS).

I.4 ETIOLOGIES

I.4.1 Virales

Tableau I : Espèces virales en cause dans les infections respiratoires aiguës (43)

Syndromes viraux respiratoires	Principaux virus en cause
Rhinopharyngite	<i>Rhinovirus, coronavirus, VRS, virus influenzae A et B, virus. parainfluenzae</i>
Angine	<i>Adenovirus, enterovirus, rhinovirus</i>
Laryngotracheite	<i>Virus parainfluenzae, VRS</i>
Bronchite	<i>VRS, Virus influenzae, virus. parainfluenza</i>
Bronchiolite	<i>VRS</i>
Pneumonie	<i>VRS, virus influenzae, virus parainfluenzae, adenovirus</i>

I.4.2 Bactériennes

Le tableau ci-dessous donne la fréquence des germes mis en cause dans les infections respiratoires aiguës.

Tableau II : Les espèces bactériennes mis en cause dans les pneumonies (54)

Espèces bactériennes	Fréquence (%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	30-54
<i>Haemophilus influenzae</i>	6-15
<i>Moraxella catarrhalis</i>	3-10
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0-18
<i>Legionella pneumophila</i>	2-7
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	0-6
<i>Chlamydia psittaci</i>	0-3
<i>Staphylococcus aureus</i>	0-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0-2
<i>Streptococcus ssp</i>	0-1
<i>Coxiella burnetti</i>	0-1
<i>Enterobacteriaceae</i>	0-1

I.5 EPIDEMIOLOGIE

I.5.1 Morbidité et mortalité dues aux IRA

Le nombre de décès dus aux IRA chez les enfants de moins de 5 ans dans le monde est estimé actuellement à 1 900 000 par an. Les IRA sont les infections les plus fréquentes de l'enfant. Elles sont la cause de 30 à 40% des hospitalisations d'enfants, les pneumonies et broncho-pneumonies représentant 70 à 80% des admissions pour IRA.

I.5.2 Facteurs influençant la morbidité et la mortalité imputables aux IRA

Un risque accru d'IRA est associé à :

- **des facteurs saisonniers et climatiques** : saison froide et saison des pluies dans les pays du sud, influence directe du climat (température ambiante, teneur en eau de l'atmosphère) et indirecte (mode de vie, promiscuité) ;
- **l'environnement** : surpeuplement, pollution de l'air (tabagisme, fumées domestiques) ;
- **le sexe masculin** : sex-ratio 1,7/1 ;
- **l'âge** : le risque de décès le plus élevé est chez le nourrisson de 1 à 3 mois ;
- **la prématurité** ;
- **l'état nutritionnel** : arrêt de l'allaitement maternel, malnutrition ;
- **un déficit immunologique congénital ou acquis** (infection à VIH / SIDA) ;
- **un bas niveau d'éducation**
- **un bas niveau socio-économique du pays.**

I.5.3 Transmission

Les IRA sont transmises par contact direct avec les sécrétions respiratoires (malades, porteurs sains).

I.6 TRAITEMENT

Le traitement de première intention est probabiliste (avant les résultats du laboratoire) basé sur l'administration d'antibiotique à large spectre habituellement utilisé dans les infections respiratoires. En général on utilise l'amoxicilline en raison de 3g / jour ou les macrolides.

I.7 DIAGNOSTIC AU LABORATOIRE

L'examen cyto bactériologique des sécrétions en provenance de l'appareil respiratoire fait partie des explorations qui ne donnent jamais, sauf cas particulier des résultats ayant une valeur absolue.

Ici, plus qu'ailleurs, le résultat bactériologique doit être replacé dans son contexte clinique.

I.7..1 Prélèvements

I.7. 1.1 Examen cytbactériologique des crachats

➤ Définition

L'ECBC consiste en un examen direct immédiat du crachat pour le comptage des cellules et la recherche de micro-organismes après coloration de Gram, puis sa mise en culture dont le résultat ne revient que 48 à 72 heures plus tard.

➤ Réalisation du prélèvement et mise en route de l'analyse bactériologique

Les expectorations doivent être recueillies le matin à jeun, en dehors de toute antibiothérapie, le malade doit être sensibilisé à un effort de toux de façon à ce qu'il ramène les sécrétions du poumon profond. La bouche peut être préalablement lavée à l'eau stérile pour éviter la contamination salivaire.

Tableau III : Recommandations pour le recueil et le traitement des expectorations (52)

Recommandations pour le recueil, l'acheminement et le traitement des crachats pour examen direct et mise en culture ⁽¹⁾
1. Faire tousser pour obtenir un crachat purulent provenant du poumon profond, en présence d'un médecin ou une infirmière et avant toute antibiothérapie. 2. Transport immédiat de l'échantillon qui doit être traité dès l'arrivée au laboratoire. Des retards au processus, de 2-5 heures, réduisent les possibilités d'isolement de <i>S. pneumoniae</i>, <i>S. aureus</i> et de bacilles à gram négatif, notamment. 3. Une partie est réservée à l'examen direct en microscope à immersion à fort grossissement. Il comprend : a) une analyse cytologique : la mise en culture n'est pratiquée que si le nombre de polynucléaires neutrophiles est > 25 par champ, celui des cellules épithéliales < 10 par champ. Ces critères ne sont pas indispensables si l'on recherche <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ou <i>Legionella pneumophila</i>. b) Recherche microbiologique après coloration de Gram. La présence prédominante d'un germe, au minimum 8 à 10 par champ, morphologiquement compatible avec un pathogène habituellement impliqué dans la PAC, est acceptable pour présumer de la responsabilité du germe et orienter l'antibiothérapie initiale. 4. Une partie est mise en culture. Le résultat (48 - 72 heures plus tard) est considéré positif si la concentration, bactérienne est $\geq 10^7$ CFU/ml d'un seul micro-organisme (ou à la rigueur de 2, dans certaines situations particulières).

Tableau 5

➤ **Avantages**

La réalisation est simple, accessible et n'est pas douloureuse.

➤ **Inconvénients**

La difficulté de recueil des échantillons à cause de la contamination salivaire. En effet de nombreuses espèces bactériennes responsables d'infections broncho-pulmonaire peuvent être présentes à l'état commensal dans les salives et l'oropharynx ; les germes mis en cause sont en général :

- ❖ *Haemophilus influenzae*
- ❖ *Streptococcus pneumoniae*
- ❖ *Staphylococcus aureus*
- ❖ bactéries anaérobies strictes

Certains patients n'expectorent pas assez.

I.7.1.2 Lavage broncho-alvéolaire

➤ **Définition**

C'est un prélèvement qui consiste à recueillir les sécrétions et les cellules qui bordent les bronchioles et les alvéoles dans le territoire pulmonaire.

➤ **Réalisation**

C'est un acte médical qui se fait en salle d'endoscopie ou au lit du malade éventuellement sous oxygénothérapie délivré sous pression positive contrôlée.

➤ **Avantages**

C'est un prélèvement de bonne qualité qui permet l'étude et la mise en évidence des germes, il diminue fortement la contamination par la flore salivaire.

➤ **Inconvénients**

Cette méthode de prélèvement est douloureuse et nécessite une endoscopie en plus, le prélèvement est dilué.

I.7. 1.3 Aspiration bronchique

➤ **Définition**

C'est un prélèvement qui consiste à aspirer les sécrétions à l'aide d'une sonde.

➤ **Réalisation**

C'est un acte médical strict qui se fait en introduisant une sonde d'aspiration par voie nasale.

➤ **Avantages**

Il permet d'éviter la contamination salivaire et augmente la densité des germes.

➤ **Inconvénient**

Le prélèvement est contraignant pour le malade et nécessite une endoscopie qui coûte cher.

I.7.2 Conduite de l'examen bactériologique (35)

1^{er} JOUR

- **Examen macroscopique** : consiste à apprécier l'aspect du prélèvement qui peut être muqueux, muco-purulent, purulent, hématique, salivaire.
- **Examen microscopique** : là il faut un examen après coloration au Gram pour déterminer la flore microbienne et faire une cytologie (dénombrement des cellules bronchiques, des polynucléaires etc.)
- **Ensemencement** : on utilise les milieux appropriés en tenant compte du Gram et de la cytologie.

2^{ème} JOUR

- Dénombrement des colonies
- Isolement des colonies suspectes
- Identification des souches potentiellement responsables de l'infection en cours
- Antibiogramme sur les souches pathogènes

3^{ème} JOUR

- Lecture de l'antibiogramme

I.7.3 Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats au cours des infections respiratoires est souvent difficile à cause de la contamination des expectorations par la flore bucco-pharyngée. Toute fois dans l'élaboration du diagnostic on peut :

- confirmer l'existence d'une infection par examen direct : présence de nombreux polynucléaires et des cellules bronchiques ou pulmonaires associée à une flore bactérienne abondante ou prédominant anormalement une ou plusieurs espèces habituellement peu abondantes ;
- mettre en évidence l'espèce ou les espèces bactériennes responsables grâce à la bactériologie quantitative ;
- les prélèvements salivaires doivent être rejetés (35).

II RAPPEL SUR LES GERMES EN CAUSE

II.1 *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

II. 1.1 Taxonomie et nomenclature

Streptococcus pneumoniae appartient à la famille des *Streptococceae* dans laquelle on distingue plusieurs genres :

- *Streptococcus* et *Enterococcus* (fréquemment rencontré en médecine humaine).
- *Aerococcus*, *Gemella*, *Leuconostoc* (bactéries opportunistes rares en médecine humaine).
- *Lactococcus* et *Pedicoccus* (non pathogènes).

Très récemment, le genre *Abiotrophia* a été décrit (nommé en 1995) : il regroupe deux espèces : *A. defectiva* et *A. adiacens*, antérieurement rangées avec les streptocoques.

II.1.2 Habitat (35)

Le pneumocoque est une bactérie commensale de l'oropharynx chez l'homme.

II. 1.3 Caractères bactériologiques

I1.1.3.1 Morphologie (35)

La morphologie, caractéristique dans les produits pathologiques, de diplocoques à Gram positif lancéolé capsulé permet de reconnaître le pneumocoque.

II. 1.3.2 Caractères cultureux

La culture du pneumocoque est délicate en raison de sa tendance à la lyse spontanée et exige des milieux nutritifs enrichis comme par exemple la gélose au sang de mouton ou de cheval à 5%. L'addition de gentamicine à la concentration de 6µl/ml rend le milieu sélectif au pneumocoque (25).

En culture, le germe perd facilement sa capsule et passe à forme Rought dépourvu de virulence. La culture peut se réaliser à une température comprise entre 25 et 42°C avec un pH compris entre 6,5 et 8,3. L'incubation se fait pendant 24

heures en anaérobiose ou tout au moins dans un atmosphère enrichie en CO₂ de 5%.

Les colonies des germes virulents capsulés sont lisses Smooth et entourées d'une petite hémolyse alpha verdâtre.

Les colonies des germes avirulents (Rought) non capsulés ne permettent pas la distinction avec un streptocoque (35).

II.1.4. Identification formelle

II.1.4.1 Sensibilité à l'optochine

L'optochine est l'éthylhydrocupreine dérivé proche de la quinine. Des disques de 6mm de diamètre sont chargés de 5µg d'optochine, dose calculée pour provoquer sur une culture de pneumocoque sur gélose au sang, une inhibition dont le diamètre est compris entre 12 et 35mm.

Les autres streptocoques sont résistants à l'optochine et se multiplient jusqu'au contact du disque. Cependant 0,5 à 5% des pneumocoques sont résistants à l'optochine (25).

II.1.4.2 La lyse par la bile ou phénomène de NEUFELD

A pH neutre, les pneumocoques provenant d'une culture en bouillon et mis en suspension dans de l'eau stérile sont lysés par une solution de desoxycholate de sodium de 2 à 10%. La lyse se traduit par un éclaircissement du milieu en quelques

minutes. Selon les auteurs 86 à 100% des pneumocoques sont lysés par la bile (25).

II.1.4.3 Inoculation à l'animal sensible

La souris et le lapin sont habituellement sensibles à l'infection par les pneumocoques. La méthode de choix est l'inoculation intra-péritonéale à une souris jeune ne dépassant pas 12 à 14 jours. Celle-ci meurt au bout de 24 à 48 heures à la suite de péritonite aiguë bactérienne. Cependant, 5% des souris inoculées survivent pendant une période plus longue et dans ce cas il faut les sacrifier au plus tard 96 heures après l'infection

II.1.4.4 Mise en évidence de l'antigène capsulaire (14)

Elle s'effectue à l'aide d'un sérum anti-pneumocoque polyvalent, dirigé contre tous les types capsulaires. La réaction peut s'effectuer soit à partir de culture, soit à partir du produit pathologique. Il existe plusieurs types de réactions :

- La réaction de «gonflement capsulaire » ou phénomène de **NEUFELD**.
- La réaction d'agglutination dont il existe plusieurs procédés :
 - Procédé des particules de latex sensibilisées
 - Procédé eco-agglutination (CoA) active sur les streptocoques tués.
 - La contre immunoélectrophorèse

II.1.5 La pathologie associée aux pneumocoques

Streptococcus pneumoniae est un hôte normal de la sphère oropharyngée. Selon son pouvoir pathogène, son antigénicité et l'état immunitaire du porteur, il peut être cependant responsable de sinusites, d'otites, de pneumonies, de septicémies, de méningites, de péritonites. Sa pathogénicité est associée essentiellement à sa capacité de multiplication dans les tissus (rôle de la capsule antiphagocytaire) et à la réponse inflammatoire induite.

17 types antigéniques capsulaires sont responsables de 80% des infections invasives à pneumocoques, et 23 types responsables de 90%. Après une période d'incubation de probablement 1 à 3 jours, le début de la maladie est généralement brutal, avec forte fièvre et frissons; les expectorations sont sanguinolentes ou de couleur brunâtre. Les atteintes pulmonaires se caractérisent par une infiltration de liquide fibrineux (œdème) dans les alvéoles sans que les parois de celles-ci soient lésées; dans environ 20% des cas, les pneumocoques se retrouvent dans le sang.

En l'absence d'antibiothérapie, la mortalité est de l'ordre de 20 à 40%. Elle demeure de 5 à 10% avec les antibiotiques, la mort survenant généralement dans les premiers 5 jours. Lors de la guérison, la régression des symptômes commence entre le 5^{ème} et le 9^{ème} jour avec l'apparition des anticorps spécifiques. L'antibiothérapie précoce induit généralement la guérison rapide.

II.1.6 Facteurs favorisant la pathogénicité

Certains facteurs prédisposent aux pneumonies à pneumocoques:

- Les atteintes des voies respiratoires (infections virales, obstructions, etc.)
- L'alcoolisme

- Les dysfonctions cardio-circulatoires, rénales
- L'anémie à hématies falciformes
- L'âge (enfants, personnes d'âge > 65 ans)
- La splénectomie, les dysfonctions spléniques

II.1.7 Traitement

Les antibiotiques habituellement utilisés sont : pénicillines (1^{er} choix), tétracyclines, macrolides. La résistance aux pénicillines, aux tétracyclines et aux macrolides est entrain de se propager.

II.1.8 Vaccination (42)

Un vaccin contenant le polysaccharide des 23 principaux sérotypes rencontrés est utilisé depuis quelques années. Son indication concerne les personnes à haut risque : personnes âgées (>65 ans) bronchitiques ou cardiaques, alcooliques, splénectomisés... Les enfants ne répondent malheureusement pas à ce vaccin mais un nouveau vaccin conjugué devrait apparaître prochainement.

II.2. HAEMOPHILUS INFLUENZAE

II.2.1. Taxonomie et nomenclature

Le genre *Haemophilus* appartient à la famille des *pasteurellaceae*, avec les genres *Pasteurella* et *Actinobacillus*. Le genre *Haemophilus* contient 16 espèces

d'origine animale et humaine, dont quelques unes sont pathogènes pour l'homme. *Haemophilus influenzae* est l'espèce type.

Les *Haemophilus* exigent pour leur croissance des facteurs présents dans le sang, le facteur V (NAD ou NADP) et le facteur X (hémine).

Les espèces exigeant les facteurs X et V (21) :

- *Haemophilus influenzae*,
- *Haemophilus aegyptius*,
- *Haemophilus haemolyticus*.

Les espèces exigeant le facteur X

- *Haemophilus haemoglobinophilus*,
- *Haemophilus ducreyi*.

Les espèces exigeant le facteur V

- *Haemophilus parainfluenzae*,
- *Haemophilus parahaemolyticus*,
- *Haemophilus paraphrohaemolyticus*,
- *Haemophilus pleuropneumoniae*,
- *Haemophilus paracuniculus*,
- *Haemophilus parapprophilus*,
- *Haemophilus segnis*,
- *Haemophilus parsuis*,
- *Haemophilus paragallinarum*,
- *Haemophilus avium*.

II.2.2. Habitat (35)

Haemophilus influenzae est un commensal des voies aériennes supérieures. Ainsi, 50% des enfants sont porteurs de cette bactérie dans leur naso-pharynx..

II.2.3. Caractères bactériologiques

II.2.3.1. Morphologie

Ce sont des bacilles à gram négatif immobiles. La présence d'une capsule est habituelle.

II.2.3.2. Caractères cultureux (35)

C'est une bactérie très fragile qui exige des milieux spéciaux contenant des facteurs de croissance présents dans le sang : facteur V (hémine) et facteur X (NAD).

II.2.3.3 Milieux de culture

- Gélose au sang ordinaire (GSO) : l'enrichissement en sang de cheval, de lapin ou de cobaye donne de bons résultats.
- Gélose au sang cuit (GSC)
- Gélose chocolat
- Milieu de Levinthal
- *Haemophilus* test medium (HTM)
- Milieux sélectifs

II.2.3.4 Conditions de culture

Les conditions optimales sont liées à une température de 35 à 37°C en atmosphère ordinaire. La croissance est favorisée par une atmosphère enrichie en CO₂ et une forte humidité ambiante. L'utilisation de milieux fraîchement préparés n'ayant pas encore subi de déshydratation satisfait à ce besoin.

II.2.4. Pouvoir pathogène

➤ Infections respiratoires

La bactérie est responsable d'otites, sinusite, et plus rarement, chez l'enfant, d'une affection grave l'épiglottite.

Elle est souvent impliquée dans les surinfections survenant au cours des pneumopathies chroniques. Elle est également responsable de pneumonie chez l'enfant et chez l'adulte en particulier sur les terrains fragiles.

➤ Méningites

Avant la vaccination *H. influenzae*, était la principale cause de méningite bactérienne chez le jeune enfant. La plupart des cas surviennent entre 3 mois et 3 ans et la mortalité est de l'ordre de 5% (49).

II.3. MORAXELLA CATARRHALIS

II.3.1. Taxonomie et nomenclature

Le genre *branhamella* appartient à la famille des *Neisseriaceae* avec les genres *Neisseria*, *Moraxella*, *Kingella* et *Acinetobacter*.

Le genre *branhamella* a été décrit par CATLIN en 1970 (18), par l'individualisation de *Neisseria catarrhalis*. Cette espèce ayant plus d'affinité pour les *Moraxella*, BOIVRE (15) proposa le rattachement du genre *Branhamella* au genre *Moraxella*. Il créa le sous-genre *Moraxella (Branhamella)*, par opposition à un deuxième sous-genre *Moraxella*.

Le premier sous-genre inclut *Neisseria caviae*, *Neisseria ovis* et *Neisseria cuniculi*, déterminant uniquement les infections animales, que CATLIN n'avait pas classé dans le genre *branhamella*.

La position taxonomique de *branhamella catarrhalis* est encore actuellement débattue, avec les progrès la taxonomie moléculaire. Ainsi, il a été proposé le rattachement de *M. catarrhalis* au genre *Moraxella* dans la famille des *Moraxellaceae* ou son maintien dans le genre *Branhamella*, dans la famille des *branhamellaceae*.

II.3.2. Habitat (42)

M. catarrhalis est une bactérie commensale du pharynx, qui est actuellement reconnue comme une cause rare d'otite, de sinusite et d'infection du tractus respiratoire inférieur (trachéite, pneumonie, exacerbation de bronchite chronique).

II.3.3. Caractères bactériologiques

II.3.3.1. Morphologie (42)

Diplocoques Gram négatif apparentés aux *Neisseria*. Parfois classés également dans les bacilles Gram négatifs.

II.3.3.2. Caractères cultureux

II.3.3.2.1. Milieux de culture

- Culture sur milieux de type gélose au sang ;
- Milieux spéciaux : Possibilité de réaliser un milieu sélectif en rajoutant à la gélose de la vancomycine, du triméthoprim et de l'amphotéricine B.

II.3.3.2.2. Conditions de culture

La Température optimale est de 35 à 37°C mais certaines souches de *Moraxella* tolèrent des températures plus basses de l'ordre de 28°C ; l'incubation se fait pendant 48 heures.

II.3.4. Pouvoir pathogène

La responsabilité de *M. catarrhalis* dans les bronchites aiguës est actuellement certaine et un certain nombre de faits cliniques et épidémiologiques ont pu être mis en exergue (24). Même si les mécanismes par lesquels il entraîne la maladie demeurent inconnus (53).

➤ **Bronchites aiguës et broncho-pneumonies**

Les bronchites aiguës et broncho-pneumonies à *M. catarrhalis* surviennent presque toujours sur un terrain fragilisé, principalement par une broncho-pneumopathie chronique. Même chez les sujets sans antécédents broncho-pulmonaires *M. catarrhalis* semble intervenir comme agent de surinfection d'une virose.

➤ **Pneumonies alvéolaires et pleurésie purulente**

M. catarrhalis reste considéré comme peu fréquemment responsable de pneumonies aiguës. Néanmoins, la fréquence de pneumonies à *M. catarrhalis* est élevée chez les nourrissons (24).

II.4. LEGIONELLA PNEUMOPHILA (42)

Legionella pneumophila est un bacille Gram négatif qui n'est apparenté à aucun autre groupe de bactéries.

En 1976, lors de la Convention des Vétérans de la Légion Américaine réunie à Philadelphie, 221 participants présentèrent une infection respiratoire sévère qui fut fatale pour 34 d'entre eux. Cette épidémie ne trouva pas d'emblée d'explication étiologique, mais fut rapprochée d'épidémies antérieures, notamment celle connue

sous le nom de « fièvre de Pontiac » qui représente une autre forme, plus bénigne de la maladie.

Après plusieurs mois de recherche, une bactérie jusqu'alors inconnue fut identifiée comme agent étiologique de cette épidémie et reçut le nom de *Legionella pneumophila*.

II.4.1. Habitat (54)

La niche écologique des *Legionella* est avant tout l'eau où elles sont capables de survivre dans des conditions extrêmes ; on les retrouve dans les eaux douces naturelles, dans l'eau de distribution, dans les réserves d'eau chaude des buildings modernes, dans les systèmes de conditionnement d'air...

Les aérosols d'eau contaminée constituent la voie de transmission la plus fréquente. La persistance dans l'eau est souvent liée au parasitisme des amibes qui s'y trouvent.

II.4.2 Caractères bactériologiques

II.4.2.1 Morphologie

L. pneumophila est un coccobacille à Gram négatif de 0,2 à 0,9 µm avec des formes longues de 20µm. La coloration au vert de Soudan montre l'existence de vacuoles lipidiques. Elle est flagellée, douée d'une mobilité polaire.

II.4.2.2. Caractères cultureux

II.4.2.2.1 Milieux de culture

Plusieurs milieux sont utilisés :

- La gélose Müller-Hinton
- Milieu de Feeley-Gorman (FG)
- Milieu BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) qui constitue le milieu de choix

II.4.2.2.2 Conditions de culture

La croissance de *L. pneumophila* sur milieux solides est favorisée par le CO₂ (2,5%), le pH acide <6,5 avec un optimum à 6,9 ; la température optimale est de + 35°C mais il peut cultiver à +42°C voire à 50°C.

II.4.3. Diagnostic au laboratoire

La culture des légionelles est difficile mais l'isolement reste la méthode de choix pour un diagnostic de certitude.

II.4.3.1. Diagnostic direct

➤ **Immunofluorescence directe**

C'est la méthode la plus rapide pour évoquer le diagnostic, elle nécessite de disposer d'un microscope avec filtre pour l'isothiocyanate de fluorescéine et la maîtrise de la technique. Elle est spécifique à 99,99 ; cependant elle est peu sensible (25-80%) (30).

➤ Culture

La difficulté dans l'isolement par culture de *L. pneumoniae* réside dans la lenteur de croissance et ses exigences nutritionnelles. Le succès est fonction de la qualité du prélèvement.

La culture sur milieux spécifiques demeure la méthode de certitude diagnostique, la spécificité est de 100%, elle est sensible à 50-80% et le délai minimum de réponse est de 2-3 jours (36).

➤ Ampliation génétique PCR

L'ampliation génétique par PCR consiste à amplifier une séquence de nucléotides d'un gène donné sur l'ADN mono-brin à l'aide d'une amorce de bases complémentaires.

➤ Recherche d'antigène dans les urines

II.4.3.2. Diagnostic indirect

C'est la plus fréquente des méthodes diagnostiques bien que plus tardive et rétrospective. Les anticorps apparaissent en 4 à 8 semaine après le début de la maladie (12).

Une ascension du titre d'anticorps spécifiques anti *L. pneumophila* (x 4 ou plus) entre un sérum précoce et un sérum tardif prélevé 4 semaines plus tard soit un titre unique > 256 en immunofluorescence indirecte (IFD) affirme le diagnostic (12, 39, 44).

Plusieurs méthodes sont utilisées : l'immunoadhérence, l'hémagglutination passive, les méthodes ELISA, la microagglutination (MA), l'IFI (méthode de référence) (36).

Deux types de préparations antigéniques sont utilisés :

- Des antigènes de culture sur milieu gélosé thermo-inactivé : ce sont les antigènes utilisés dans la MA. Le seuil de positivité est un titre d'anticorps > 32 .
- Des antigènes formolés obtenus par l'inoculation par voie vitelline d'œufs embryonnés : ce sont les antigènes utilisés dans l'IFD. Le seuil de positivité est de 128.

Des réactions croisées non réciproques ont été rapportées avec *M. pneumoniae* et *chlamydia*.

La légionellose se traduit habituellement par une pneumopathie aiguë de sévérité variable. On estime que les Légionelles sont responsables de 2 à 5% des pneumopathies aiguës.

II.4.2. Traitement

Le traitement des formes non sévères fait généralement appel à l'érythromycine ou à d'autres macrolides plus récents comme l'azithromycine ou la clarithromycine. Lors de légionelloses sévères, on utilise des fluoroquinolones (ciprofloxacine, ofloxacine, péfloxacine, lévofloxacine) ou l'azitromycine ou des associations macrolides + rifampicine ou fluoroquinolones + rifampicine.

II.5. MYCOPLASMA PNEUMONIAE

II.5.1. Taxonomie et nomenclature

M. pneumoniae appartient à la classe des *Mollicutes* (regroupant des bactéries dépourvues de paroi), et à l'ordre des *mycoplasmatales*, famille des

Mycoplasmataceae qui comprend 85 espèces de genre *Mycoplasma* et 5 espèces de genre *Ureaplasma*.

II.5.2. Habitat (11)

La bactérie colonise la muqueuse des voies respiratoires. La transmission est inter-humaine et se fait par voie aérienne.

II.5.3. Caractères bactériologiques

II.5.3.1. Morphologie (11)

Ce sont des bactéries de petites tailles qui ont la particularité d'être dépourvues de paroi et d'être non colorable au Gram.

II.5.3.2. Caractères cultureux

II.5.3.2.1. Milieux de culture

Plusieurs milieux sont proposés :

- ✓ Milieu de Hayflick
- ✓ Milieu SP4
- ✓ Milieu PPLO

II.5.3.2.2 Conditions de culture

Le pH requis est compris entre 7,3 et 7,8. L'incubation se fait à 37°C en atmosphère microaérophile (95% N₂, 5% CO₂) ou sous 5% de CO₂. La culture est longue en moyenne elle dure 3 à 21 jour.

II.5.4. Diagnostic au laboratoire

➤ Mise en évidence de la bactérie

Elle peut se faire à partir des sécrétions pulmonaires. La culture est peu pratiquée en raison de ses difficultés. Des méthodes permettant de détecter des antigènes de la bactérie ont été proposées, ainsi des méthodes d'amplification génétique.

➤ Sérologie

On observe parfois au cours de l'infection des agglutinines froides (auto-anticorps capable d'agglutiner les hématies du groupe 0 à 4°C). Ce test n'est pas spécifique. Les anticorps anti-*M. pneumoniae* apparaissent plus tardivement que les agglutinines froides. L'ascension du taux des anticorps et la présence d'IgM sont des arguments en faveur d'une infection récente.

II.5.5. Pouvoir pathogène (42)

M. pneumoniae est une cause fréquente de pneumonies ou de trachéobronchites. On parlait avant de « pneumonie atypique primitive » parce que c'était une forme de pneumonie pour laquelle aucune étiologie bactérienne n'était connue, et qui ne répondait pas à la pénicilline. Il touche de préférence les

adolescents et les jeunes adultes chez qui il constitue 20% de tous les cas de pneumonie.

II.6. CHLAMYDIA PNEUMONIAE

II.6.1. Taxonomie

Chlamydia pneumoniae appartient à l'ordre des *Chlamydiales* qui comprend une famille : *Chlamydiaceae* elle même comprenant un seul genre *Chlamydiae* qui comprend plusieurs espèces :

- ✓ *Chlamydia trachomatis*
- ✓ *Chlamydia psittaci*
- ✓ *Chlamydia pneumoniae*
- ✓ *Chlamydia pecorum*

II.6.2. Habitat

C'est un cytoparasite obligatoire donc ne peut vivre que dans une cellule vivante.

II.6.3. Caractères bactériologiques

II.6.3.1 Morphologie

Chlamydia pneumoniae est une bactérie Gram négatif, composée d'une membrane interne et d'une membrane externe séparées par un espace périplasmique, cependant il n'y a pas de peptidoglycane.

II.6.3.2. Caractères cultureux

C. pneumoniae ne cultive pas sur milieu acellulaire, car c'est un cytoparasite obligatoire. L'isolement est possible sur œuf embryonné en inoculation par voie intra vitelline

II.6.4. Diagnostic au laboratoire

II.6.4.1. Détection des antigènes

La détection des antigènes dans les produits pathologiques se fait par plusieurs méthodes :

➤ Les tests immunoenzymatiques

L'anticorps est conjugué à une enzyme capable de transformer un substrat en composé coloré. L'intensité de la coloration est évaluée par les mesures de densité optique (DO) au spectrophotomètre.

➤ L'immunofluorescence directe (IFD)

Le frottis du prélèvement est coloré à l'aide d'anticorps conjugués à l'isothiocyanate de fluoresceine. L'examen au microscope à fluorescence révèle les CE vert-brillant sur fond de cellules épithéliales rouges.

➤ Il existe également des tests rapides sur membrane plus utilisés pour le diagnostic des infections génitales à *C. trachomatis*.

La sensibilité des tests dépend de la nature monoclonale ou polyclonale des anticorps utilisés mais aussi de l'antigène visé. Pour l'IFD, la sensibilité dépend de l'examineur et du seuil de positivité retenu. Un test de confirmation est alors nécessaire (5).

II.6.4.2. Isolement

➤ **Culture cellulaire**

C. pneumoniae ne cultive pas sur milieu acellulaire. Etant un cytoparasite obligatoire, l'isolement en culture est spécifique mais fastidieux et peu sensible. Elle est possible sur œuf embryonné en inoculation par voie intravitelline .

Les lignées cellulaires les plus sensibles à l'infection par *C. pneumoniae* sont les cellules HEP-2 et Hela. De multiples passages sont cependant requis. La sensibilité augmente après une centrifugation préalable de l'inoculum et l'adjonction de cyclohexinidine dans le milieu de culture (23).

➤ **Identification**

La cytologie en culture au MGG est supplantée par l'utilisation d'anticorps monoclonaux conjugués à de la fluoresceine (23, 48).

Des méthodes immunologiques, d'extraction des antigènes et l'utilisation de sondes moléculaires sont également proposées pour l'identification.

II.6.4.3. Détection des acides nucléiques

La détection des acides nucléiques est d'actualité. Elle permet la confirmation des résultats d'investigation directe ; elle a l'avantage d'être plus sensible que la culture.

Elle utilise un broyat de bactéries fixées dans les puits d'une microplaque. La réaction antigène-anticorps est révélée par une enzyme qui transforme un substrat en produit coloré.

Matériel et méthode

I. MATERIELS

➤ Matériels de laboratoire

- Bec bunsen
- Réfrigérateur
- Congélateur à -20 et à -80°C
- Microscope optique et à fluorescence
- Microscope à contraste de phase
- Vortex
- Autoclave
- Balance de précision
- Hotte à flux laminaire
- Lames porte-objet
- Lame couvre-objet
- Lame IF à 2 puits
- Anse de platine
- Micropipettes
- Embouts stériles
- Tubes nunc
- Filtres de $0,2\mu\text{m}$
- Seringues à usage unique
- Flacon 500ml
- Tubes à hémolyse
- Boite de pétri de 90mm

- Masque
- Gants
- Tubes coniques stériles de 50mm
- Centrifugeuse
- Flacon de culture

➤ **Réactifs de coloration des lames**

Colorant pour le Gram

- Violet de gentiane
- Lugol
- Fuschine de Ziehl

Réactifs pour la coloration de May Grunwald Giensa

- Flacon 1 : fixateur RAL
- Flacon 2 : fixateur Eosine
- Flacon 3 : bleu RAL

➤ **Culture de *Chlamydia pneumoniae***

Réactifs utilisés pour l'entretien des cellules SP

▪ **Solution de trypsine- EDTA**

Composition :

EDTA sodium02g

Glucose.....	1g
Rouge de phénol.....	0,58g
NaCl	0,02g
Bicarbonate de sodium.....	0,58g
Trypsine.....	0,5g
Eau distillée.....	1000ml

La solution est conservée à – 20°C mais avant toute utilisation la température est ramenée à 37°C.

▪ **Solution de bleu trypan**

Bleu trypan.....	1g
BPS.....	100g

Cette solution est préparée extemporanément. Elle est utilisée comme colorant afin de tester la viabilité des cellules. En effet le bleu trypan est un colorant qui ne pénètre que dans les cellules mortes dont la membrane ne peut plus l'exclure.

▪ **Matériels pour l'entretien des cellules SP**

- Gants
- Etuve à 37°C
- Microscope à contraste de phase
- Flacon de culture cellulaire
- Pipettes graduées à 5 ml et à 10 ml stériles
- Plaque de culture cellulaire

- Bacs à déchets
- Hotte à flux laminaire

➤ **Matériel pour l'isolement**

- Gélose Müller-Hinton (MH)
- Gélose chocolat de base
- Gélose Colombia
- Gélose trypticase soja
- Anse de platine
- Botes de pétri
- Sang de cheval lysé
- Sang de mouton
- Gentamicine
- Bacitracine
- Polyvitex
- Jarre d'incubation
- Générateur de CO₂ ou bougie
- Etuve à 37°C
- Autoclave

➤ **Matériel pour l'identification**

- Disque d'optochine
- Galeries CSB Streptocoque
- Extrait de levure à 200µg/ml
- Solution d'hémine (chlorhydrate) à 200µg/ml
- Galerie API NH

II METHODES

II.1 PRELEVEMENTS

II.1.1 Conditions de réalisation des prélèvements

II.1.1.1. Les expectorations

Les prélèvements ont été réalisés le matin à jeun en dehors de toute antibiothérapie, les malades ont été sensibilisés à un effort de toux de façon à ce qu'ils ramènent les sécrétions du poumon profond.

II.1.1.2 Le lavage bronchoalvéolaire

C'est un acte médical strict qui a été réalisé par un médecin.

II.1.1.3 L'aspiration bronchique

C'est un acte médical strict.

II.1.2. Transport des prélèvements

Le transport s'est effectué en récipient isotherme à 4°C (à l'aide de glacière).

II.1.3. Conservation des prélèvements

Les prélèvements ont été conservés à 4°C au réfrigérateur.

II.2 EXAMEN MACROSCOPIQUE

Cet examen a consisté à l'appréciation de l'aspect des prélèvements.

- Expectoration purulent et mucopurulent : appropriée aux investigations bactériologiques.
- Expectoration spumeuse : c'est un prélèvement impropre à l'analyse bactériologique. Elle a été rejetée.

II.3 TRAITEMENT DES EXPECTORATIONS

- Laver l'expectoration avec de l'eau physiologique stérile,
- Retirer complètement l'eau de lavage,
- Ajouter un volume égal de N-acétylcystéine 1% (MUCOMYST) ou utiliser un volume égal de digesteur EURO BIO (ce qui correspond à une dilution au $\frac{1}{2}$)
- Mélanger au vortex deux minutes et laisser reposer dix minutes à quinze minutes,
- Calibrer, prélever 10 ml d'homogénéisat et diluer dans 5ml d'eau),
- Homogénéiser.

Remarque :

On a réalisé le frottis destiné à la coloration au bleu de méthylène avant d'ajouter le N-acétylcystéine car ce dernier digère les cellules.

II.4 EXAMEN APRES COLORATION AU GRAM ET AU BLEU DE METHYLENE

A partir du produit pathologique préalablement traité on a réalisé deux frottis, l'un coloré au Gram, l'autre coloré au bleu de méthylène.

L'examen microscopique à l'objectif 100 permet d'apprécier :

- Le nombre de polynucléaire,
- L'aspect de la flore,
- Le nombre de cellules épithéliales.

Le rapport nombre de polynucléaire sur le nombre de cellules épithéliales permet de distinguer différentes situations (Figure 2).

Cet examen était une étape incontournable au diagnostic car, non seulement elle permettait de juger l'acceptabilité du prélèvement, mais il servait surtout à orienter les investigations grâce à l'aspect de la flore.

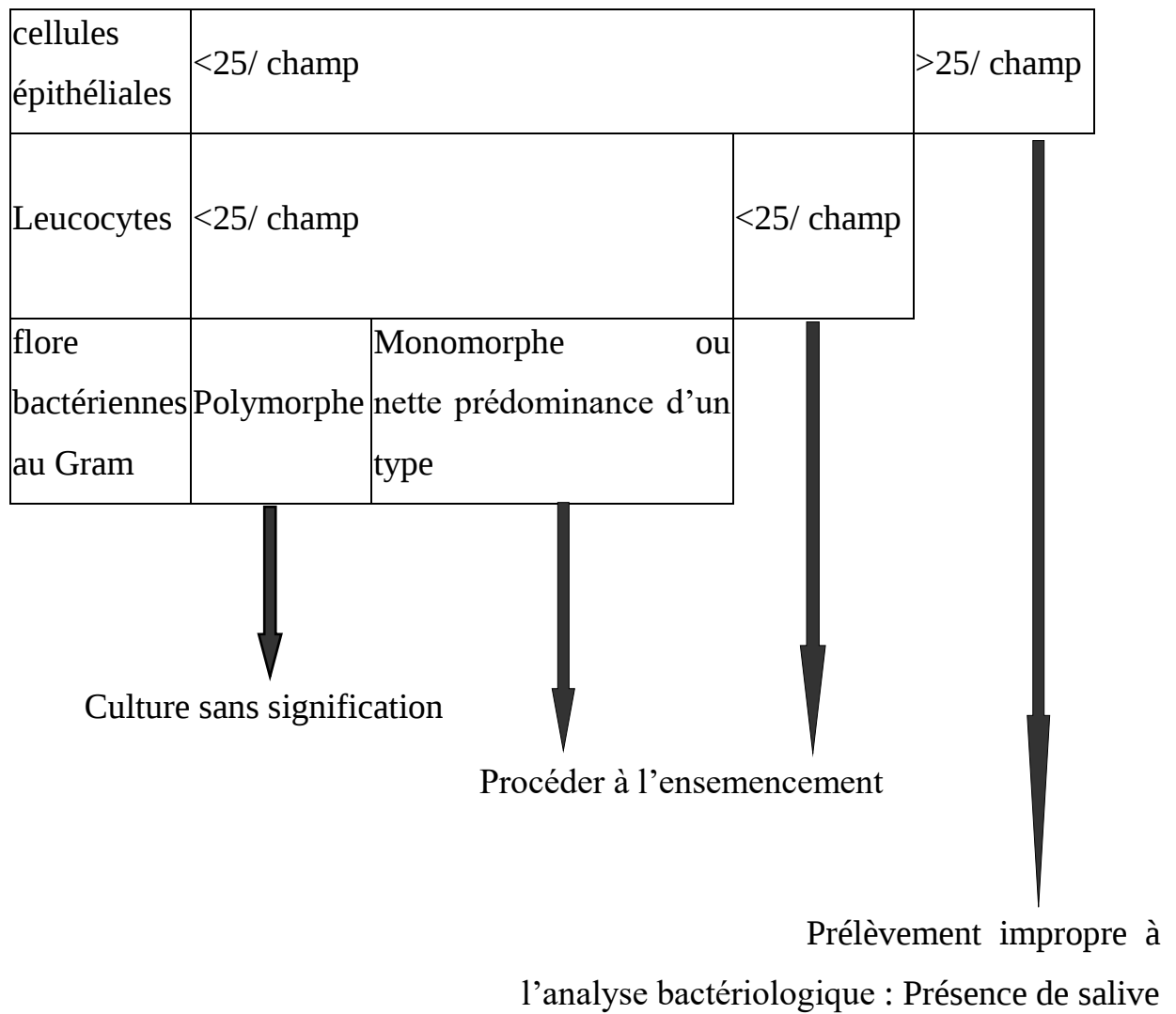


Figure 2 : Critères d'acceptabilité des prélèvements (21)

II.5 ISOLEMENTS

II.5.1. Ensemencement

On aensemencé 10µl d'échantillon à l'aide d'une anse en platine.

II.5.2. Milieux utilisés

II.5.2.1. Pour *Streptococcus pneumoniae* ;
Haemophilus influenzae ;
Moraxella catarrhalis

Les prélèvements ont étéensemencés dans les milieux suivants (Tableau IV)

Tableau IV : Différents milieux utilisés en fonction des germes recherchés

Bactéries	Produits pathologiques	Milieux utilisés pour la culture	Modalités d'incubation
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Expectorations	GSC+ gentamicine à 6mg/ml	37°C + 5% CO ₂ pendant 24 à 48 heures
	LBA		
	Aspiration		
<i>Hemophilus influenzae</i>	Expectorations	GSC + bacitracine	37°C + 7% CO ₂ pendant 24 à 48 heures
	LBA		
	Aspiration		
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Expectorations	GSC + Polyvitex	37°C + 5 à 10% CO ₂ pendant au
	LBA		

	Aspiration		moins 48 heures
--	------------	--	-----------------

II.5.2.2. Pour Legionella pneumophila

Il s'agit des milieux BCYE α et BCYE α / VC.

- **Milieu de base**

Il s'agit du milieu de base de Bio Mérieux prêt à l'emploi disponible en flacon de 200 ml et dont la composition g/l est la suivante :

Extrait de levure	10 g/l
Charbon activé	1,5 g/l
Tampon ACES (2-[amino-oxoéthyl-amino]éthane sulfonique)	10 g/l
KOH	2,8 g/l
Agar	17 g/l

- **Suppléments d'enrichissement**

Les suppléments sont incorporés stérilement au milieu de base préalablement régénéré au bain-marie bouillant et refroidi à 50°C.

- SVF 5 ml
- Solution de L-cystéine, HCl à 0,4 g/ml stérilisé par filtration : 2 ml
- Solution d'αcétoglurate monopotassique à 1 g/10 ml stérilisé par filtration : 2 ml

Le pH du milieu a été ajusté à 6,9 par HCl 1N stérile avant la répartition en boîtes de Pétri rondes de 90 mm de diamètre à raison de 30 ml par boîte.

La stérilité a été testée en incubant une boîte à l'étuve à +37°C pendant 18 h puis les milieux ont été conservés au réfrigérateur à +4°C en sachets plastiques.

Le milieu BCYE α / VC a été préparé en incorporant stérilement au milieu BCYE α le supplément sélectif lyophilisé (Bio-Mérieux) régénéré avec 2ml d'eau distillée stérile. La composition du supplément sélectif pour 200 ml de milieu de base est la suivante :

- Vancomycine	200 μ g
- Colistine	9000 UI

II.5.2.3. Mycoplasma pneumoniae

Il s'agit de milieux préparés au laboratoire s'inspirant des différents milieux existants (Hayflick, PPLO). Les principes de culture de *Mycoplasma pneumoniae* (exigence en stérols apportés par le SVF; pH de croissance 7,3-7,8) ont été respectés.

La proportion de SVF a été augmentée à 300 ml pour 1000 ml de milieu.

Les milieux ont été rendus sélectifs par des inhibiteurs : la pénicilline G à 1000000 UI/l, la colistine à 500 000 UI/l pour les bouillons et le milieu gélosé et l'amphotéricine B à 100 mg/l pour le milieu gélosé.

➤ **Bouillon glucosé (BG)**

BCC (Oxoïd)	42g
Peptone papaïnique de soja	10g
NaCl	3g
Glucose anhydre	10g
Rouge de phénol 1%	2 ml

Eau distillée qsp	1000 ml
-------------------	---------

Les différents constituants ont été mélangés et dissous à la chaleur puis le pH ajusté à 7,8 par NaOH 1N.

Après autoclavage pendant 15 mn à 121°C, le milieu a été laissé à refroidir jusqu'à 50°C puis, à 600 ml de cette solution, ont été ajoutés stérilement sous la hotte, le supplément suivant constitué par :

- | | |
|---------------------------------|--------|
| - SVF stérile | 300 ml |
| - Extrait de levures à 25% | 100 ml |
| - Pénicilline G 1000000 UI/4 ml | 4 ml |
| - Colistine 1000000 UI/4 ml | 2 ml |

Le pH a été vérifié et ajusté à 7,8 par NaOH 1N stérile puis le milieu a été réparti en aliquotes de 50 ml et conservé à -20°C.

➤ **Bouillon à l'arginine (BA)**

- | | |
|------------------------------|---------|
| - BCC (Oxoïd) | 42g |
| - Peptone papaïnique de soja | 10g |
| - NaCl | 3g |
| - Arginine, HCl | 10g |
| - Rouge de phénol 1% | 2 ml |
| - Eau distillée qsp | 1000 ml |

Les constituants ont été dissous à feu doux comme pour le BG ; ici le pH a été ajusté à 7,3 par NaOH 1N.

Après autoclavage à +121°C pendant 15 mn, le milieu a été refroidi jusqu'à 50°C puis à 600 ml de cette solution a été incorporé, sous la hotte, le même supplément que pour le BG :

- SVF stérile	300 ml
- Extrait de levures à 25%	100 ml
- Pénicilline 1000000 UI/4 ml	4 ml
- Colistine 1000000 UI/4 ml	2 ml

Le pH a été vérifié et réajusté à 7,3 par NaOH 1N stérile avant la répartition en tubes stériles de 50 ml puis les milieux ont été conservés à -20°C.

➤ Milieu diphasique H. Agar

Il est constitué de deux phases : une phase solide et une phase liquide constituée par le BG.

▪ Phase solide

- BCC (Oxoïd)	42g
- Peptone papaïnique de soja	10g
- Na Cl	3g
- Glucose anhydre	10g
- Rouge de phénol 1%	2 ml
- Eau distillée qsp	580 ml

Après dissolution des différents constituants, le pH a été ajusté à 7,5 par NaOH 1N puis 10g d'Agar ont été incorporés au milieu qui a été porté à ébullition pendant 1 mn pour dissoudre l'Agar.

Ensuite, le supplément suivant a été ajouté stérilement sous la hotte au milieu préalablement autoclavé à 121°C pendant 15 mn et refroidi jusqu'à 50°C :

- SVF stérile	300 ml
- Extrait de levures à 25%	100 ml
- Pénicilline 1000000 UI/4 ml	4 ml
- Colistine 1000000 UI/4 ml	2 ml
- Amphotéricine B 50 mg/10ml	20ml

Le pH a été ajusté à 7,5 par NaOH 1N stérile puis le milieu coulé sous la hotte dans des flacons de culture cellulaire de 50 ml à raison de 8 ml par flacon.

Les milieux ont été laissés à solidifier puis la stérilité a été testée en incubation à l'étuve à +37°C pendant 24 h avant la conservation au réfrigérateur à +4°C.

▪ Phase liquide

Il s'agit du bouillon glucosé ajouté à raison de 3 ml par milieu gélosé au moment de l'emploi.

II.5.2.4 *Chlamydia pneumoniae*

Chlamydia pneumoniae étant un cytoparasite obligatoire, la culture utilise des lignées cellulaires ici on a utilisé des cellules HEP-2 et Hela qui sont plus

sensibles à l'infection à *C. pneumoniae*. Cependant plusieurs passages dans ces cellules sont requis.

Milieux utilisés : ML 15 + 8% SVF + 1% ATB qui convient à l'entretien des cellules.

Cellules utilisées : SP

➤ **Entretien des cellules SP**

Les cellules sont entretenues dans des flacons de culture cellulaire de 200ml contenant le MEM et incubées à 37°C. le ML 15 est utilisé pour l'entretien et la croissance des cellules SP sa composition est la suivante :

- Sels inorganiques
- Acides aminés essentiels
- Acides aminés non essentiels
- Vitamines et co-facteurs de croissance
- Substrats tel que le glucose

Le milieu ML 15 est supplémenté de 8% SVF pour favoriser la croissance des cellules. L'incubation des cellules dans le milieu ML 15 se fait à 37°C sans CO₂.

Ces milieux sont additionnés à un supplément antibiotique-antifongique ce qui permet d'éviter la contamination lors de l'entretien des cellules.

Lorsque les cellules se multiplient, des liens protéiques se forment entre les cellules. Ces liens dépendent de la présence d'ion. Il se forme un tapis confus au fond de la boîte de culture cellulaire. L'observation de ce tapis se fait au microscope à contraste de phase.

La solution trypsine-EDTA est utilisée pour disperser les cellules du tapis.

La trypsine agit en brisant les liens protéiques intercellulaires alors que l'EDTA agit comme un accepteur des ions.

➤ Trypsination des cellules SP

La trypsination permet de décoller les cellules du tapis formé au fond de la boîte de culture :

- Le milieu ML 15 +8%SVF + 1% antibiotique dans lequel les cellules ont été incubées et rejetées dans le bac à déchet.
- Le tapis cellulaire est levé avec le ML 15 + 8% SVF deux fois
- 5ml de solution de trypsine sont ajoutés et la boîte est agitée doucement pendant une minute.
- La solution de trypsine est rejetée et une petite quantité est laissée au fond de la boîte.
- La boîte est ensuite incubée à l'étuve pendant 1 à 2mn
- A l'aide du microscope, on observe s'il y a décollement du tapis cellulaire. S'il y a décollement, on tapote sur la boîte pour séparer les cellules.

Puis 5ml du ML 15 + 8% SVF + 1% antibiotique sont ajoutés dans la boîte.

Sur la boîte, la date et le numéro de passage sont marqués puis l'incubation s'est faite à 37°C pendant 48 h ou 72 h selon le nombre de cellules.

II.6 IDENTIFICATION

II.6.1 *Streptococcus pneumoniae*

II.6.1.1 Examen macroscopique des colonies

Les colonies sont de petite taille, rondes, transparentes avec une hémolyse de type alpha (*alpha-viridans*).

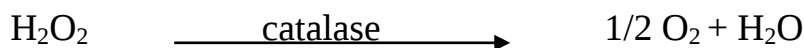
II.6.1.2. Examen microscopique

Nous avons réalisé un frottis coloré au Gram à partir d'une colonie. L'observation au microscope optique à l'objectif 100 avec une goutte d'huile à immersion a montré des diplocoques Gram positif à forme lancéolée, en flamme de bougie.

II.6.1.3. Test à la catalase

➤ Principe

La catalase est une enzyme qui décompose le peroxyde d'hydrogène 3% en oxygène gazeux et en eau.



➤ Technique

Nous avons réalisé un frottis à partir des colonies isolées. Ensuite quelques gouttes d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) y sont déposées. La libération d'oxygène s'est matérialisée par la production de bulles.

➤ Résultats

Streptococcus pneumoniae est catalase négative. Nous n'avons pas observé la production de bulles lors du test à la catalase.

NB : Le test ne se fait que sur des souches viables où l'enzyme est présente. De plus, il faut éviter de prélever de la gélose qui est à base de sang car les globules rouges contiennent de la catalase.

II.6.1.4. Test de sensibilité à l'optochine

➤ **Principe**

Streptococcus pneumoniae est généralement sensible à l'optochine (Chlorhydrate d'éthyl hydrocupréine) contrairement aux autres streptocoques en particulier les streptocoques non groupables alpha-hémolytiques.

➤ **Technique**

Nous avons inondé avec une suspension du germe isolé une boîte de gélose au sang.

Après séchage, un disque d'optochine a été appliqué à l'aide d'une pince à la surface de la gélose. L'incubation s'est faite à 35°C en atmosphère enrichie en CO₂ pendant 18 heures au bout desquelles nous avons recherché la présence ou non de zone d'inhibition matérialisée par un halo clair et nous avons mesuré le diamètre.

➤ **Résultats**

Pour les pneumocoques, une zone d'inhibition supérieure à 14mm a été observée alors que les autres streptocoques ne sont pas inhibés.

Si le diamètre < 14mm, on fait des tests complémentaires.

NB : Certaines souches de *Streptococcus pneumoniae* ne sont pas inhibées par l'optochine alors que certains streptocoques *viridans* donnent de faibles zones d'inhibition.

II.6.1.5. Test de lyse par les sels biliaires

➤ **Principe**

Les colonies de *Streptococcus pneumoniae* sont « dissoutes » ou lysées en 30mn en présence d'une suspension de bile. Le rôle de la bile sur les bactéries peut être rapporté à celui des sels de sodium d'acides organiques. Le désoxycholate de sodium à 10% agit comme la bile sur les bactéries.

➤ **Technique**

Nous pouvons utiliser deux méthodes :

- Une méthode en boîtes de pétri
- Une méthode en tube

La méthode en boîte de Pétri

Sur une colonie alpha-hémolytique caractéristique nous avons déposé une ou deux gouttes d'une solution de désoxycholate de sodium à 10%.

La boîte de pétri a été incubée à l'étuve à 35°C pendant 2 heures avec le couvercle légèrement entrouvert pour favoriser l'évaporation du réactif.

Au bout de deux heures nous avons examiné l'endroit où le réactif a été déposé afin de rechercher la présence ou la lyse de la colonie présumée de *Streptococcus pneumoniae*.

L'hémolyse *alpha-viridans* demeure mais la colonie disparaît.

La méthode en tube

Nous avons utilisé comme référence le tube 1.0 de Mac Farland. Ainsi avec 1ml de NaCl à 0,85%, nous avons préparé une suspension bactérienne de turbidité comparable à celle du tube 1.0 de Mc Farland.

Dans chacun des deux tubes test et témoin, nous avons mis 0,5ml de la suspension.

En plus, dans le tube test nous avons ajouté 3 à 4 gouttes de désoxycholate de sodium à 10% et dans le tube témoin nous avons ajouté 3 à 4 gouttes de NaCl à 0,85%.

Après cela, nous avons procédé à l'incubation à 35°C pendant deux heures au bout desquelles nous avons comparé l'éclaircissement du tube test (par dissolution du trouble) avec celui du témoin.

NB : La sensibilité à l'optochine et la lyse par les sels biliaires sont spécifiques des pneumocoques.

II.6.1.6 Microméthode d'identification

Nous avons eu à utiliser des microplaques CSB streptocoques comme test de confirmation.

Les galeries CSB streptocoques permettent la mise en évidence d'activités enzymatiques ou d'assimilation de substrats carbonés en milieu approprié (fermentation) ou hostile. Les microplaques sont ensemencées avec un inoculum qui reconstitue le milieu. Après incubation, la lecture est effectuée directement ou après addition de réactifs de révélation.

La lecture des réactions est faite à l'aide d'un tableau de lecture microplaque CSB system.

II.6.2 *Haemophilus influenzae*

II.6.2.1. Examen macroscopique des colonies

Les colonies sont fines, lisses, rondes en gouttelettes de rosée. Elles sont volumineuses avec une tendance à s'étaler.

II.6.2.2. Examen microscopique

A la coloration de Gram nous avons observé des bacilles à Gram négatif, isolés, de petite taille, polymorphes immobiles avec parfois une prédominance de coccobacilles au Gram.

II.6.2.3. Test à la catalase (voir identification

Streptococcus pneumoniae)

Haemophilus influenzae est catalase positif.

II.6.2.4. Test au cytochrome oxydase

➤ **Principe**

Le phényl diamine oxydase va agir sur un substrat chromogénique incolore pour donner un composé rouge semi-quinolone instable qui va s'oxyder pour donner un composé noirâtre.

➤ **Interprétation**

Haemophilus influenzae est cytochrome oxydase positif.

II.6.2.5. Mise en évidence de l'exigence en facteur X (hémine) et en facteur V (NAD)

On utilise deux procédés :

Procédé en milieu liquide

On a utilisé 4 tubes :

- un tube témoin qui ne reçoit aucun facteur de croissance
- un tube avec hémine seule (chlorhydrate d'hémine à 200µg/ml)
- un tube avec extrait de levure (apporte NAD)
- un tube test dans lequel on a introduit une goutte d'extrait de levure + une goutte d'hémine.

Nous avonsensemencé les tubes avec une goutte de la suspension bactérienne, préparée à partir d'une culture au sang cuit diluée au centième.

Après homogénéisation les tubes sont incubés à 37°C en position inclinée pour assurer une bonne aération.

Au bout de 18 heures à 24 heures on a procédé à la lecture :

- Le tube témoin ne doit présenter aucun trouble (le milieu est carencé ce qui prouve que la souche ne se développe pas sans facteur).
- Les bactéries se développent dans le tube test (nous avons un trouble).

Ainsi *Haemophilus influenzae* a besoin des facteurs X et V car dans les tubes ne contenant qu'un seul facteur de croissance nous n'avons pas eu de trouble.

Procédé sur milieux gélosés

Ce procédé a consisté à identifier la souche après repiquage sur 4 milieux.

- GSC polyvitex contenant de l'hémine et du NAD.
- Gélose au chocolat contenant de l'hémine
- Gélose trypticase soja + polyvitex contenant du NAD
- Gélose trypticase soja : sans facteur

On a incubé les géloses sous CO₂ à 37°C sauf la gélose trypticase soja qui est incubé sans CO₂ à 37°C.

Nous avons lu au bout de 24 heures à 48 heures d'incubation que *Haemophilus influenzae* ne poussait que sur GSC polyvitex seulement.

II.6.2.6. Microméthode d'identification API NH **(*Neisseria-Haemophilus*)**

Nous avons eu à les utiliser pour des résultats plus fiables. Ainsi nous avons eu recours aux galeries API NHensemencées avec une suspension bactérienne dans de l'eau physiologique.

II.6.3 *Moraxella catarrhalis*

II.6.3.1. Examen macroscopique des colonies

Les colonies sont lisses, parfois rugueuses légèrement aplaties et d'allure muqueuse.

II.6.3.2. Examen microscopique

Il a été fait après coloration de Gram. On a recherché des cocci Gram négatif, à face adjacente aplatie, avec tendance à résister à la décoloration.

II.6.3.3. Test à la catalase

Moraxella catarrhalis est catalase positive.

II.6.3.4. Test au cytochrome-oxydase

Moraxella catarrhalis est oxydase positive.

II.6.3.5. Microméthode d'identification

Nous avons utilisé la microgalerie API NH (cf. technique décrite pour identification de *Haemophilus influenzae*)

II.6.4. *Chlamydia pneumoniae*

➤ culture cellulaire

C. pneumoniae ne cultive pas sur milieu acellulaire, car c'est un cytoparasite obligatoire. L'isolement en culture est spécifique mais fastidieux et peu sensible. Elle est possible sur œuf embryonné en inoculation par voie intra vitelline.

Les lignées cellulaires les plus sensibles à l'infection à *C. pneumoniae* sont les cellules HEP-2 et Hela. De multiples passages sont cependant requis. La sensibilité augmente par une centrifugation préalable de l'inoculum et de l'adjonction de cycloheximide dans le milieu de culture. La cytologie en coloration au May Grunwald Giensa a été supplantée par l'utilisation d'Ac monoclonaux conjugués à la fluorescéine.

➤ Prélèvement

Le prélèvement doit ramener le maximum de cellules infectées. Les prélèvements ont été conservés à 4°C pendant 48h et au delà à -80°C. Cependant la culture a été immédiatement mise en œuvre après la collecte pour une optimisation du résultat.

➤ Technique d'isolement de *C. pneumoniae*

La culture s'est effectuée dans les plaques de culture cellulaire. Les prélèvements conservés à -80°C sont ramenés à la température ambiante.

Puis après ensemencement des plaques pour culture cellulaire avec 100µl prélèvement, il s'en suit :

- La centrifugation : une vitesse comprise entre 2500 à 3000 tours à 37°C pendant une heure permet l'absorption des corps bactériens sur les cellules.
- La révélation des inclusions par des anticorps monoclonaux marqués, spécifiques de genre ou d'espèce.

Les cultures observées au microscope à inverse de phase et à contraste de phase montre des inclusions intra-cytoplasmiques correspondant à des corps élémentaires (CE) de *C. pneumoniae*. La présence d'une seule inclusion permet d'affirmer l'infection à *C. pneumoniae*.

Il est recommandé de réaliser une subculture pour augmenter les chances de succès (jusqu'à 5).

II.6.5. *Mycoplasma pneumoniae*

L'examen direct en coloration de Gram là encore n'a pas été utile.

L'identification a été réalisée grâce à la culture.

➤ Principe de la culture

M. pneumoniae cultive sur milieu acellulaire contenant des stérols et des extraits de levures.

- En bouillon on étudie le métabolisme vis-à-vis de substrats tels que le glucose et l'arginine. Ces bouillons contiennent un indicateur de pH, le rouge de phénol qui est responsable du virage du milieu du rouge-orangé au jaune lors d'une acidification et du rouge-orangé au rouge s'il y a alcalinisation.

M. pneumoniae fermente le glucose et acidifie le BG. Il n'hydrolyse pas l'arginine, le BA reste rouge-orangé.

- Sur milieu solide, *M. pneumoniae* donne des colonies œuf sur le plat qui ont la propriété d'agglutiner des cellules.

➤ **Titration en série**

Des dilutions en série de raison $\frac{1}{2}$ ont été réalisées en bouillon glucosé (BG) et bouillon à l'arginine (BA) afin d'étudier le métabolisme de *M. pneumoniae* vis-à-vis du glucose et de l'arginine.

- 100 µl de bouillon ont été distribués à la micropipette dans chaque cupule.
- Dans la première cupule, ont été incorporés et mélangés, 100 µl de prélèvement
- Puis 100 µl de la première dilution ont été mélangés au bouillon dans la deuxième cupule, ainsi de suite jusqu'à la 30^{ème} dilution.
- Les cupules ont ensuite été recouvertes de para film et incubées dans l'étuve à CO₂ à +37°C
- Les cultures ont été régulièrement observées tous les jours à partir du quatrième jour.

➤ **Culture sur milieu diphasique**

- Le milieu diphasique a été reconstitué en ajoutant 3 ml de BG décongelé et préincubé à +37°C au milieu gélosé également préincubé à l'étuve à +37°C
- L'inoculum a été préparé comme suit :
 - dans un tube à hémolyse, une dilution au 1/10^e en eau distillée stérile de l'expectoration a été réalisée
 - Le mélange a été homogénéisé au Vortex 2 à 4 mn

- A la micropipette, le milieu diphasique a étéensemencé avec 100 µl de l'inoculum
- L'incubation a été faite à 37°C sous CO₂, le flacon en position horizontale de sorte que le bouillon recouvre la gélose
- Les cultures ont été observées tous les 5 jours pendant 3 semaines.

➤ **Lecture des cultures**

- Repiquage des bouillons

L'absence de souillures bactériennes dans le bouillon glucosé (+) par un examen direct à l'état frais entre lame et lamelles a été effectuée.

Une subculture sur milieu diphasique des dilutions BG (+) et BA (-) a été réalisée.

- Lecture du milieu diphasique

A partir des cultures de 21 jours ainsi que celles de moins de 21 jours dont la phase liquide a viré, la quantité de bouillon a été diminuée jusqu'à environ 200 µl sur la gélose puis colonies caractéristiques de *M. pneumoniae* ont été recherchées au microscope à contraste de phase.

Les critères suivants ont été retenus en faveur d'une culture positive de *M. pneumoniae* : virage du sans trouble BG en un délai relativement long (plus de 8 jours), non virage du BA (BA (-)), colonies œuf sur la plat sur milieu solide.

- Confirmation des colonies

M. pneumoniae est capable de produire du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) responsable de la β hémolyse sur les hématies .

Cette propriété a été utilisée pour confirmer les colonies de *M. pneumoniae* .Les cultures positives sur bouillon glucosé et sur H-Agar sont repiquées sur gélose au sang . Puis les boîtes incubées sous CO_2 dans une jarre pendant 24 heures. Des zones d'hémolyse sont observées autour des colonies de *M. pneumoniae*.

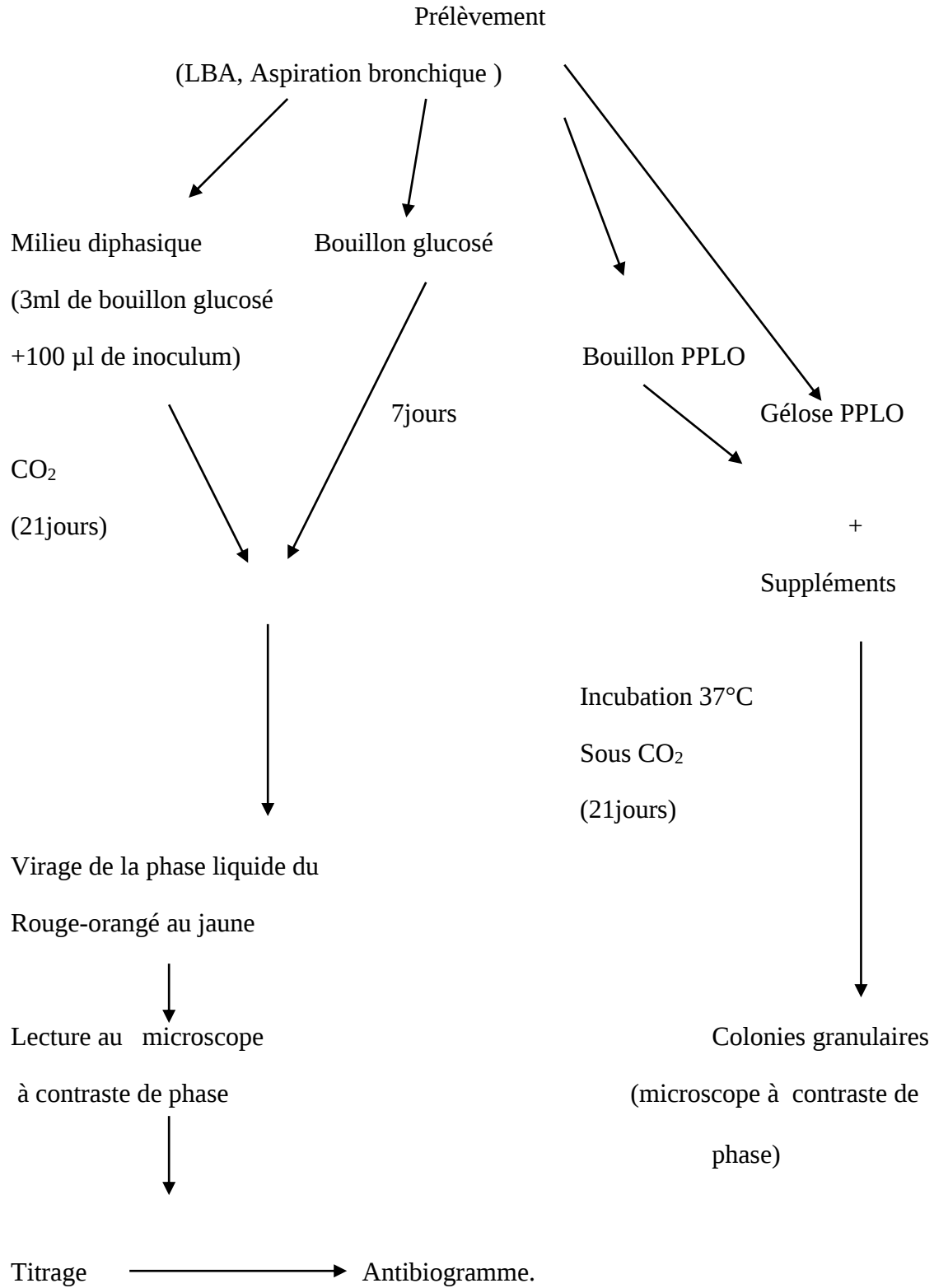


Figure 3 : Isolement, Identification et Titrage des *Mycoplasma pneumoniae* (40)

II.6.6 L. pneumophila

II.6.6.1. Examen des prélèvements en coloration de Gram

Il a permis de rechercher des bacilles et coccobacilles faiblement Gram négatif le plus souvent intracellulaires, parfois extracellulaires cependant cet examen direct s'est révélé décevant.

II.6.6.2. Immunofluorescence directe (IFD)

Elle a été réalisée selon le protocole du CDC (31) qui est le suivant :

- Etaler les parties purulentes des prélèvements sur les lames préalablement rincées à l'alcool éthylique à 95° et séchées.
- Sécher à l'air
- Fixer à la flamme
- Recouvrir de formol neutre à 10%, incuber 10 mn en atmosphère humide constituée par une boîte de Pétri contenant de l'eau dans laquelle on dépose deux baguettes sur lesquelles repose la lame.
- Rincer à l'eau distillée stérile puis sécher à l'air
- Ajouter 50 µl de conjugué.
- Incuber 20 mn à la température ambiante en atmosphère humide
- Laver deux fois 5 mn avec du tampon phosphate pH 7,6 stérile
- Immerger dans du tampon phosphate pH 7,6
- Laver à l'eau distillée stérile, sécher à l'air

- Mettre une goutte de tampon carbonate glycérol à pH 9
- Recouvrir d'une lamelle, ajouter à nouveau une goutte de tampon carbonate glycérol
- Lire au microscope équipé d'un filtre pour l'isothiocyanate de fluorescéine, la présence de spots vert-fluorescents intra ou extracellulaires.

L'IFD positive a permis une orientation en vue de la culture sur milieux BCYE α spécifiques pour *Legionella*.

Nous avons également réalisé quatre lames-témoins avec les souches de référence du CDC que nous avons régénérées à l'eau distillée stérile, toujours suivant le même procédé.

II.6.6.3. Culture

➤ Principe de la culture

L. pneumophila a des exigences nutritionnelles en fer et en L-cystéine, son pH optimum de croissance est de $6,9 \pm 0,05$, conditions réalisées dans le milieu BCYE α .

➤ Culture proprement dite

- Dans un tube à hémolyse, une dilution au $1/10^e$ en eau distillée stérile des parties purulentes des prélèvements IFD (+) a été réalisée et homogénéisée au vortex pendant 4mn, les milieux sélectifs et non sélectifs étant préincubés à l'étuve à $+37^{\circ}\text{C}$ pendant 30 mn.
- Pour chaque prélèvement, l'inoculum précédemment préparé a étéensemencé en stries sur 1 BCYE α et 1 BCYE α / VC à l'anse de platine

- L'incubation a été faite à l'étuve à +37°C en jarre sous 5% CO₂.
- L'examen des cultures a été faite à partir du 3^e jour puis quotidiennement jusqu'au 10^e jour.

Résultats

I. POPULATION D'ETUDE

Notre étude s'est portée sur un échantillon de 78 patients

Tableau V : Répartition des patients selon les structures

Structures	Hôpital principal de Dakar	CHU Fann
Nombre de patients	55	43

Les prélèvements issus de l'hôpital principal de Dakar étaient composés pour chaque patient d'un LBA et d'une aspiration tandis que ceux de l'hôpital Fann étaient un mélange de différents types de prélèvement ; le tout était constitué comme suit :

Tableau VI : Répartition des prélèvements HPD

Nature du prélèvement	Nombres
LBA	25
Aspirations	21
expectorations	3

Tableau VII : Répartition des prélèvements de Fann

Nature du prélèvement	Nombres
LBA	25

Aspirations	21
expectorations	31

II. SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES

Tableau VIII : Résultat des isolements bactériens

Germes Prélèvements	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>L. pneumophila</i>	<i>M. pneumoniae</i>	<i>C. pneumoniae</i>
LBA	0	0	2	7	4
Aspirations	0	0	2	7	5
Expectorations	1	3	0	0	0

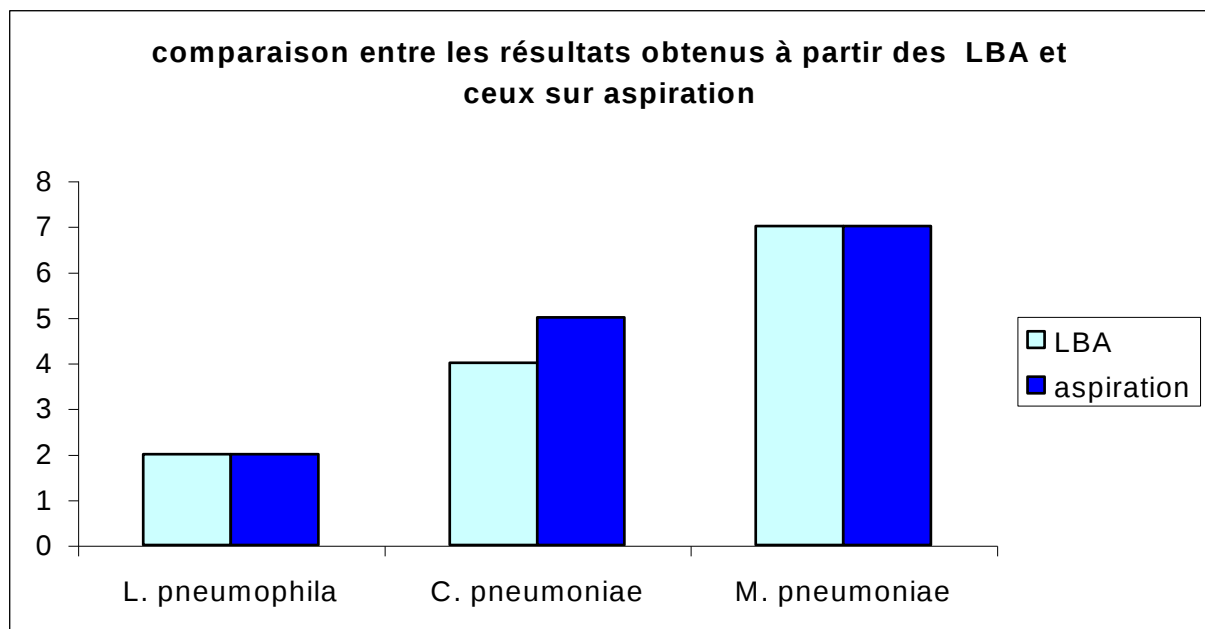


Figure 3 : Diagramme comparatif des résultats des isolements bactériens sur

LBA et sur aspiration

III. CYTOLOGIE

La plupart des lames qu'on a observé était de type 4 ou 5 selon la classification de Murray Washington ; Cependant un grand nombre était pauvre en cellules et pourtant la culture était contributive.

IV VALIDATION DE L'IDENTIFICATION (51, 55)

Après l'identification de ces germes on a essayé de la valider comme le veut une bonne démarche scientifique.

Cette validation va passer par l'identification de souches supposées inconnues. Cette identification est basée sur la mesure de similitude entre son profil et celui des espèces identifiables à l'aide de données recueillies (table diagnostique).

Cependant nous avons utilisé les résultats de galerie API strepto et API NH comme référence.

Dans les tables diagnostiques (ou matrice de données) sont contenues, pour chaque taxon, la probabilité de positivité (f) aux différents tests. Si la réponse de la souche est positive, on retient la valeur f ; si elle est négative on retient la valeur $1-f$ (probabilité de négativité). Le produit des valeurs (probabilité cumulée) donne la différence théorique de la souche dans l'espèce ou la probabilité absolue.

Cette fréquence théorique est ensuite divisée par la somme des fréquences théoriques pour chaque taxon soumis à la comparaison. Le résultat ($\times 100$) donne la probabilité d'appartenance à l'espèce ou la probabilité relative.

Probabilité absolue = Produit des valeurs obtenues pour chaque espèce

$$\text{Probabilité relative} = \frac{\text{Probabilité absolue}}{\text{Somme des probabilités absolues}}$$

On considère généralement les seuils suivants :

- ✓ supérieur 99,9% :excellente identification
- ✓ supérieur 99% : très bonne identification
- ✓ supérieur 90% :bonne identification
- ✓ supérieur 80% :identification acceptable
- ✓ inférieur 80% :identification inacceptable

C'est ainsi que nous allons exploiter les résultats de quelques souches identifiées pour essayer de valider cette identification.

IV.1 IDENTIFICATION DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Tableau IX : Identification de *streptococcus pneumoniae*

Espèces Caractères	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	(<i>Streptococcus Pneumoniae</i> Probable X)
Gram	100%	100%	100%	+
Catalase	0%	0%	0%	-
Optochine	98%	0%	0%	+
Sels bilaires	98%	0%	0%	+

+ = (f)

- (1- f)

La probabilité absolue pour que :

X appartient à *Streptococcus pneumoniae* : 0,96

X appartient à *Streptococcus sanguis* : 0

X appartient à *Streptococcus mitis* : 0

La probabilité relative pour que :

X appartient à *Streptococcus pneumoniae* : 100%

X appartient à *Streptococcus sanguis* : 0%

X appartient à *Streptococcus mitis* : 0%

La probabilité pour que X appartienne à *Streptococcus pneumoniae* est de 100% donc on peut dire que cette approche permet une excellente identification de *S. pneumoniae*.

IV.2 IDENTIFICATION DE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

TableauX : Identification *Haemophilus influenzae*

Espèces Caractères	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Haemophilus aphrophilus</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	(<i>Haemophilus Influenzae</i> probable X)
Gram	100%	100%	100%	+
Cyto ox	100%	0%	0%	+
catalase	100%	0%	0%	+
hémine	100%	0%	0%	+
NAD	100%	100%	100%	+
glucose	100%	100%	100%	+
fructose	89%	96%	94%	+
maltose	12%	100%	94%	-
saccharose	1%	96%	97%	-
ODC	40%	0%	73%	-
URE	92%	0%	55%	+
LIP	0%	0%	0%	-
PAL	100%	100%	97%	+
βGAL	0%	88%	30%	-
PRO	0%	0%	0%	-
GGT	5%	29%	5%	-
IND	74%	0%	11%	+

$$+ = (f)$$

$$- = (1 - f)$$

La probabilité absolue pour que :

X appartient à <i>Haemophilus influenzae</i>	:	0,53
X appartient à <i>Haemophilus aphrophilus</i>	:	0
X appartient à <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	:	0

La probabilité relative pour que :

X appartient à <i>Haemophilus influenzae</i>	:	100%
X appartient à <i>Haemophilus aphrophimus</i>	:	0%
X appartient à <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	:	0%

La probabilité relative pour que X appartienne à *Haemophilus influenzae* est de 100% ce qui permet d'affirmer que cette méthode permet une excellente identification de *H. influenzae*.

Discussion

I. LES PRELEVEMENTS

L'échantillon devait être correctement collecté en ce qui concerne les expectorations l'effort de toux était indispensable pour éviter des prélèvements salivaires impropres à l'analyse bactériologique.

Streptococcus pneumoniae, *Hemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis* sont des germes fragiles une fois le prélèvement effectué la prolifération des bactéries de la flore commensale peut entraîner la mort de ses bactéries fragiles les résultats de l'examen cytotbactériologique se retrouveraient ainsi biaisés. Afin de réduire le délai entre la réalisation du prélèvement et sa prise en charge les patients sélectionnés étaient tous prélevés au même moment à la fin de la consultation il était impératif de placer le produit pathologique à plus 4 °C immédiatement après son recueil, et de le prendre en charge dans les quatre heures.

Pour le lavage bronchoavéolaire et l'aspiration bronchique, le prélèvement étant un acte médical strict, on a procédé au traitement dès la réception des échantillons.

Le liquide de LBA et d'aspiration qui sont des prélèvements monomicrobiens sont mieux adaptés à l'isolement des bactéries intracellulaires car ramènent beaucoup de cellules épithéliales (40).

II. L'EXAMEN MICROSCOPIQUE DIRECT

L'examen direct en coloration de Gram était essentiel pour juger de l'acceptabilité de l'échantillon. Les critères d'acceptabilité des prélèvements ont été scrupuleusement respectés (**Figure2**).

Les prélèvements qui, à l'objectif x 100 contenait plus de 25 cellules épithéliales par champ ont été éliminées : il s'agissait de prélèvement salivaire. En revanche, les prélèvements sans cellules épithéliales et contenant plus de 25 polynucléaires par champ ont été analysés : c'étaient des prélèvements purulents.

La plupart du temps, l'aspect de la flore était évocateur du ou des germes bactériens en cause ; l'examen direct au Gram permettait de prédire les résultats de la culture.

III. METHODES D'ISOLEMENT

- **GSC gentamicine.**

Toutes les colonies *alpha-viridans* obtenues sur GSC gentamicine n'étaient pas des colonies de pneumocoque. En effet les streptocoques déficients de la flore rhino-pharyngée donne des colonies semblables sur ce milieu. La plupart du temps nous avons des mélanges bactériens avec des pneumocoques et des streptocoques déficients la grande difficulté résidait dans l'isolement des colonies de pneumocoque.

À l'examen macroscopique des colonies, les pneumocoques apparaissent sous forme de colonies transparentes , plates, avec une hémolyse *alpha-Viridans*, alors que les streptocoques déficients ont des fines colonies légèrement bombées blanchâtres avec une hémolyse *alpha-viridans*. Il n'est pas toujours aisé de faire cette distinction (9).

Nous étions inspirés par le travail réalisé sur ce germe par Clegbaza S. qui a obtenu de bons résultats d'identification à partir de cette gélose (21).

- **GSC Bacitracine**

Nous n'avons pas eu de difficulté particulière pour l'isolement des *Haemophilus* sur ce milieu, la GSC Bacitracine s'est révélée être un bon milieu sélectif pour l'isolement et *Haemophilus influenzae*.

Cependant les *Haemophilus* sont des germes à croissance difficile et il est indispensable d'utiliser un milieu non déshydraté, fraîchement préparé, et de respecter les conditions d'inoculation (26).

- **GSC polyvitex**

Sur ce milieu riche nous avons obtenu la plupart du temps des primocultures polymicrobiennes. Un examen macroscopique permettait de distinguer et de dénombrer les différentes colonies. Ce travail bien que facilité par les travaux effectués sur ces germes ainsi que la littérature également disponible a été tout de même fastidieux. Les colonies observées sur GSC gentamicine et sur GSC Bacitracine se retrouvaient également sur GSC polyvitex.

Dans notre méthodologie, la GSC polyvitex était destinée à l'isolement de *Moraxella catarrhalis* cependant on a pas identifié de germe.

IV. METHODES D'IDENTIFICATION

- **Identification des pneumocoques**

L'identification des pneumocoques a été essentiellement basée sur la sensibilité à l'optochine ainsi que l'étude des caractères biochimiques (25).

Nous n'avions pas eu de problème particulier mais pour confirmer le diagnostic on a tout de même eu recours aux microplaques streptocoques CSB.

- **Identification de *Haemophilus influenzae***

Nous avons eu recours à la mise en évidence de l'exigence en facteurs de croissance soit sur milieu gélosé soit en bouillon. La mise en évidence de l'exigence en milieu gélosé a donné des résultats satisfaisants.

En milieu liquide, le trouble, synonyme de culture bactérienne, était parfois difficile à apprécier. Ce phénomène s'explique par le fait que les souches R de *Haemophilus influenzae* forme en milieu liquide un dépôt granuleux sans modifier la transparence du milieu, contrairement aux souches S qui donnent un milieu trouble homogène et un dépôt plus ou moins important (22).

La galerie API NH qui nous a servi de recours dans ces cas a donné de bons résultats.

- **Identification de *M. catarrhalis***

Selon la littérature et les travaux antérieurs disponibles sur ce germe, l'API NH qu'on a utilisé est caractérisé par la sensibilité, la spécificité, la reproductibilité et la rapidité des identifications (21).

- **Recherche de *L. pneumophila***

L'immunofluorescence directe a nécessité un lourd investissement technique. Cependant sa spécificité est bonne (99,9%) (30).

- **Recherche de *Chlamydia pneumoniae***

La culture de *C. pneumoniae* est spécifique mais fastidieuse et peu sensible (50 à 80% en fonction des laboratoires). Les limites à la culture

cellulaire sont : la difficulté de l'entretien des cellules et les risques de contaminations (40).

- **Recherche de *M. pneumonia***

Elle a été longue et fastidieuse ; cependant la certitude diagnostique est garantie par les exigences nutritionnelles particulières des mycoplasmes qui ont été prises en compte par l'amélioration apportée aux milieux standards disponibles (10, 7, 8, 41). Ainsi *M. pneumoniae* a été isolé sur B.G et H.Agar.

La confirmation des colonies a été effectuée grâce à la propriété de production de peroxyde d'hydrogène, qui est responsable de la β -hémolyse observée sur les hématies de cheval.

M. pneumoniae est considéré comme le seul mycoplasme humain possédant cette propriété (40).

Cependant une autre méthode de confirmation des colonies utilise la particularité d'adhésion de *M. pneumoniae* vis-à-vis de différents supports par cyto-adhérence (5).

V. LES GERMES IDENTIFIES ET LES METHODES DE PRELEVEMENT

- **Les germes intracellulaires**

Ces germes ont été retrouvés uniquement dans les LBA et les aspirations avec une plus grande densité microbienne au niveau des aspirations bronchiques. Ceci est sans doute dû à la dilution que subit le LBA au cours du prélèvement.

Ces résultats recoupent ceux d'une étude qui a été réalisée et qui a montré de manière claire l'indication du LBA pour la détection de ces bactéries intracellulaires (34).

Dans notre étude tous les germes identifiés sur LBA l'ont été sur aspiration à l'exception d'un prélèvement d'aspiration où on a trouvé une souche de *C. pneumoniae* absent du LBA du même patient.

La majorité des prélèvements où on a identifié *C. pneumoniae* présentait une inflammation avec une nette élévation des lymphocytes et des polynucléaires neutrophiles qui était plus perceptibles avec les expectorations.

- **Les germes banaux**

Ces germes ont été retrouvés dans tous les types de prélèvement. Ceci confirme quelques études réalisées sur *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, et *Moraxella catarrhalis* qui sont unanimes quant à la possibilité de les identifier à partir des expectorations (21, 26).

Conclusion

Les infections respiratoires aiguës constituent la 1^{ère} cause de mortalité d'origine infectieuse en l'absence de toute autre pathologie associée, avec une prévalence de 15/1000 habitants aux Etats-Unis.

Dans les pays en développement, elles sont une des causes les plus fréquentes de mortalité surtout chez l'enfant. Sur une mortalité estimative annuelle de 15 millions chez les enfants de moins de 5 ans, 4 millions de décès leur sont attribuables.

Leur diagnostic a toujours constitué un problème majeur, surtout en ce qui concerne l'identification des germes intracellulaires.

En effet le LBA et l'aspiration bronchique coûtent cher car nécessitant une endoscopie qui n'est disponible à Dakar qu'à l'hôpital principal, en plus ceux sont des méthodes invasives donc contraignantes pour le malade.

La sérologie quant à elle donne des résultats rétrospectifs, d'où donc la nécessité de déterminer si L'ECBC qui est de réalisation facile, accessible a tout le monde suffit pour l'identification de tous germes en cause dans les infections respiratoires aiguës qui constituent, soit rappelé, un réel problème de santé publique au vu des données épidémiologiques.

C'est dans cette perspective que nous avons mené cette étude à l'unité de recherche et de biotechnologie médicale du laboratoire de bactériologie et virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec.

Le recrutement clinique des patients s'est effectué à l'Hôpital Principal de Dakar et au CHU Fann entre juin 2003 et décembre 2004.

Nous avons entrepris d'isoler *M. pneumoniae* sur bouillon glucose et H. Agar et de confirmer les colonies en utilisant la propriété de production de peroxyde d'hydrogène de la bactérie.

L'isolement de *C. pneumoniae* s'est faite par culture sur cellule SP.

L. pneumophila quant à lui a été cultivé sur BCYE α et BCYE α / VC.

En ce qui concerne les germes extracellulaires *H. influenzae* a été isolé sur GSC Bacitracine et identifié grâce aux test de catalase et de peroxydase en plus de la mise en évidence de l'exigence en facteurs X (NAD) et V (hémine). La confirmation a été réalisée par l'utilisation de la galerie API NH.

S. pneumoniae a été isolé sur GSC Gentamicine et identifié par sa sensibilité particulière à l'optochine, le test de lyse par les sels biliaires et par sa catalase ainsi que son aspect caractéristique au Gram et son hémolyse α *viridans*.

La recherche de *M. catarrhalis* sur GSC polyvitex a été vaine.

Sur 72 prélèvements obtenus on eu pu identifié :

- 1 souches de *S. pneumoniae* à partir des expectorations soit 1,38% ;
- 3 souches de *H. influenzae* à partir des expectorations soit 4,16% ;
- 2 souches de *L. pneumophila* à partir des liquides de LBA et d'aspiration soit 2,77% ;
- 4 souches de *C. pneumoniae* à partir des LBA soit 5,55% et 5 souches dans les aspirations soit 6,94% ;
- 7 souches de *M. pneumoniae* à partir les LBA et des aspirations soit 9,72%.

A l'issu de cette étude il apparaît que :

- Les germes intracellulaires à savoir : *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* et *Legionella pneumophila* s'identifient mieux dans les LBA et les aspirations que dans les expectorations.
- Les germes extracellulaires : *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae* se retrouvent aussi bien dans les expectorations que dans les autres types de prélèvements. La réalisation de l'ECBC étant plus facile il serait donc plus simple de s'y limiter pour la recherche de ces germes.

En effet, dans les pneumopathies communautaires, il serait difficile de vouloir, à chaque fois qu'une infection est suspectée, faire un LBA ou une aspiration bronchique.

La sensibilité de l'ECBC est médiocre mais il constitue une alternative si on optimise les conditions de réalisation. Ainsi il faudrait :

- effectuer un lavage préalable de la bouche ;
 - recueillir les crachats du poumon profond en sensibilisant le patient à un effort de toux intense ;
 - réaliser l'ECBC immédiatement afin d'éviter la prolifération des germes banaux ;
 - respecter les critères d'acceptabilité des prélèvements (**figure 2**).
- La cytologie est plus perceptible dans l'expectoration que dans les autres types de prélèvement.

Nous avons axés nos recherches sur *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *M. pneumoniae*, *L. pneumophila* et *C. pneumoniae* une étude complémentaire intégrant les autres espèces responsables des infections respiratoires aiguës pourrait être envisagée.

Bibliographie

**1. ALBERT B. ; WILLIAM J. H. J. R.; KENNETH L. H. ; HENRY D. J. ;
SHADOMY H. J.**

Manual of Clinical Microbiology.

5th edition, ASM 1991 : 243-244

2. ALGARET X., MORITIER E.

Maladies infectieuses

Ed ESM 1994 243 1-19

3. ANONYME

Identification of *Neisseria* and related species.

Centers for Disease Control and prevention Atlanta, Georgia, USA, 1998.

4. AVRIL J. L. ; BADERNA H. ; DENIS F. ; MOURTEIL H.

Bactériologie clinique

2^{ème} Ed.. Paris, Ellipse, 1992

5. AYIKO-GAVOAH D. A.

C. pneumoniae, *M. pneumoniae* et *L. pneumophila* dans les infections respiratoires basses communautaires de l'adulte (données d'une étude multicentriques à Dakar)
Thèse, Pharm, Dakar, 2000; n° 87

6. BARTLETT J. G. ; BREIMAN R. F. ; MANDELL L. A. ; FILE P. M.

Community-acquired *pneumonia*
N. Engl. J. Med., 1995 333 : 1618-1624.

7. BASEMAN J. B.

The cytotadhesins of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*.
In : ROTTEM S., KAHANE I., eds. Subcellular biochemistry. New York.
Plenum Press, 1993 ; 243-59

8. BASEMAN J. B. ; TULLY G. J.

Mycoplasma, sophisticated reemerging and burdened by their notoreity.
Emerging infectious diseases, 1997 ; 3 (1) : 21-32.

9. BATHILY C. T.

Etude de la sensibilité aux antibiotiques de différentes souches de pneumocoques isolées a Dakar

Thèse Pharm. Dakar, 1995 ; n°30

10. BEBEAR C. ; DE BARBEYRAC B.

Les Mycoplasmes

In : FRENEY J. eds. Manuel de bactériologie clinique.

Elsevier, Amsterdam, 1994 ; 1443 -63

11. BEBEAR C., LATRILLE J.

Les Mycoplasmes

In : LE MINOR L. VERON M.

Bactériologie médicale, Flammarion 1989 1088-1097

12. BERCHE P.

Legionella.

In : BERCHE P., GAILLARD J. L.

Eds Bactériologie: les bactéries des infections humaines.

Flammarion Médecine-Science, France, 1988 ; 244 -50

13. BERG R. A. ; BARTLEY D. L.

Pneumoniae associated with *Moraxella catarrhalis* in infants.

Pediatr. Infect. Dis. J., 1987 569-573

14. BIGERT T. ; LARD B. ; EVA D. ; RAGNAR N.

Serotyping in *Streptococcus pneumoniae* strains by agglutination
and counter immunoelectrophoresis

J. Clin. Microb., 1983 : 978-80

15. BOVRE K.

Family *Neisseriaceae*.

In : KRIEG N. R. HOLT J. G. Bergey's Manual of systematic Bactériology

Vol.1 WILLIAMS WILKINS Baltimore, 1984 : 228 - 290

16. BUSSARD A.

Description d'une technique combinant simultanément l'électrophorèse
et la précipitation immunologique dans un gel l'électrophorèse Bioch- Biophys.

Actuall. 1954; 34 258-263

17. CADOZ M.

General aspect of acute respiratory infection in black africa

Rev. Ins. Pasteur Lyon 1982 1: 7-15

18. CATLIN B. W.

Moraxella catarrhalis an organism gaining respect as a pathogen.

Clin. Microbiol. Rev. 4 293-320

19. CHARBON C. ; CHEMAL K. ; SIEUX-LEVEIL M. L.

Livre de l'interne en pathologie infectieuse

Med-sc. Flammarion et cie éditeurs

Ed Aout 1997 306 : 3-24

20. CHARBONNELLE B. ; AUBRAY-RIPOCHE C.

Examen bactériologique des sécrétions trachéo-bronchiques.

In CHARBONNELLE B. et COLL .Bactériologie médicale technique usuelle.

2ème Ed. ;-Paris : SIMEP , 1987 : 67-72

21. CLEGBAZA S. F.

Srteptococcus Pneumoniae, Haemophylus influenzae et Morexella catarrhalis

dans les infections respiratoires aiguës basses communautaires à Dakar.

Thèse pharm. Juillet 2000 ; n° 81 : 124

22. DABERNAT H. ; SANSON-LEPORS M. J.

Haemophilus influenzae

In LE MINOR., VERON M.-Bactériologie médicale. 2ème ed.-PARIS ;

Med. Science Flammarion 1990 , 521-544.

23. DE BARBEYRAC B. ; DUPON M. ; BEBEAR C.

Infection à *Chlamydia*.

Encycl. Med. Chir.(Elsevier, Paris), maladies infectieuses 8-037-A-10,

Dermatologie,12-670-B-20, 1997, 15p

**24. DENAMUR E. ; SURMONOT G. ; LAURANS G. ; ORFILA J. ;
RIOU J. Y.**

Les infections à *Moraxella catarrhalis*.

Sem. Hôp. Paris, 1988, 63-70

25. DENIS F.

Actualités bactériologiques et épidémiologiques du pneumocoque.

Le Pharm. Biol. 1983 (145) : 35

26. DJEDJI-AHIMON H. N.

Détermination de la sensibilité de souches *d'haemophilus influenzae* par E-test et étude des variations de la sensibilité à l'association Amoxicilline + Acide clavulanique.

Thèse Pharm., Dakar, 1996 n° 56

27. DONISSOL

Schéma d'isolement des souches de mycoplasmes humaines

In: MARCHAL N. BOURDON J. L eds les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries

Doin ed. Paris , 1987

28. DRONNE S. ;BIDET P. ; VUTHIEN H. ; GARDER C. A.

Infections respiratoires a *C. pneumoniae* et *M. pneumoniae*

Feuillet de biol. 2001 vol XXXXII n° 242 11-19

29. DUTAU G.

Infections broncho-pulmonaires d'origine bactérienne.

The Third Mkassed Medical Congress, 2000 : 1-13

30. EDELSTEIN P. H.

Legionella

In: LENNETTE E.H., BALOWS A. eds. Manual of Clinical Microbiology

4th edition, Washington, D.C., 1985 ;373-9

31. EDESLEIN P. H.

Legionella.

In LENNETTE E.H., BALOWS A.

Eds. Manuel of Clinical Microbiology 4th edition, Washington, D.C., 1985; 373-97

33. ENRIGTH M. C. ; Mc KENZIE H.

Moraxella (branhamella) catarrhalis –

Clinical and molecular aspects of rediscover pathogen.

J. Med. Microbiol. 1997; 46: 3606-71

34. ERSCH J. ; SPEICH R.; WEBER R. ; ALTWEGG M. ; HAUSER M.

The value of bronchoalveolar lavage in the clarifying of HIV-associated lung disease.

Dtsch Med Wochenschr. 2000 Jun 23; 125 (25-26) : 789-93.

35. FERRON A.

Bactériologie médiale

Ed. C et R 12^{ème} Ed. 1984

36. FLEURETTE J. ; DEVEZE L.

Les légionelloses

Le pharmacien Biologiste, 1983; 147: 967-73

37. GAILLARD J. L.

Les *Chlamydia*

In: BERCHE P. eds. Bacteriol. Les bactéries des infections humaines

Med-sc. Flammarion 1988 494-504

38. GAUDELUS J. DIEU-OSIKA S. ; BELASCO C. ; CANAR O.

L'enfant et *M. pneumoniae*

Semaine des hôpitaux de Paris 1998;

39. Guide d'investigation d'un ou de plusieurs cas de légionelloses

Circulaire DGS n°97 / 311 Bull .

*Epidémiol. Hebdo.*20-22/97

40. GUEYE N. M.

Données microbiologiques sur *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae* à l'origine des infections respiratoires basses (isolements bactériens et sensibilité aux antibiotiques)

Thèse pharm., 2002 n° 69

41. HU P. C. ; COLE R. M. ; HUANG Y. H. et al.

Mycoplasma pneumoniae infection : role of a surface protein in the attachement organelle.

Science, 1982 ; 216 : 313.

42. M. DELMEE

Microbiologie médicale

Fac. Méd. Univ. Catholique de Louvain 2003 - 2004 276 : 75-100

43. MEDECINE TROPICALE

www.medicinetropicale.free.fr/cours/infrespi.htm

(Consulté le 20 Avril 2005)

44. MEMORANDUM.

Les légionelloses, épidémiologie et lutte

Mémorandum d'une réunion de l'OMS. Bull. OMS, 1990; 48:101-10

45. MOUTON Y. ; BIGNOLA S. ; CHIDIAC C. et al

Recommandation sur la prise en charge de la pathologie infectieuse respiratoire

Med. Mal. Inf. 1995; 1021-28

46. NAUCIEL C.

Bactériologie médicale

Ed. Masson Paris 5 275 : 83-233

47. NDOYE R.

Algorithme d'identification des entérobactéries et des bacilles a gram négatif
non fermentaires

Thèse pharm. Dakar, 2004 n 83 : 67-74

48. PEELING R.W., BRUNHAM R.C.

Chlamydia es pathogens : news species and news issues.

Emerging infectious diseases, 1996 ; 2 (4) : 307-19

**49. PILLET C. ; BOUDON J. L. ; TOMA B. ; MARCHALL N. ;
BALBASTRE C.**

Bactériologie Médicale et Vétérinaire.

Systématique bactérienne.

Doins éditeurs, Paris, 2ème ed.. 1983

50. PILLY E.

Maladies infectieuses

12^{ème} Ed. 1992 Ed.2M2 671 : 93-108

51. PINA G. ; RAYMOND D.

Critères de choix d'une méthode d'identification.

CES Bactériologie-Virologie ; 2003 : 1- 27

52. PNEUMOPATHIE

www.urgence-pratique.com/2articles/medic/Pneumopathie.htm

(consulté le 17 Avril 2005)

53. RAHMAN ; MOTUR.

Characterization of surface components of *Moraxella Catarrhalis* and pathogenic *Neisseria*

Karolinska Institutes, Avhandlingsdatabs, 1997

54. READ R. C. ; PENNINGTON J. E.

Respiratory Tract Infections.

First Publisced. Oxfo : Heath Press, 1998 ; 8

55. SARR T.

Algorithme d'identification des staphylocoques à coagulase négative et des streptocoques non groupables

Thèse pharm. Dakar 2004 n° 84 : 49-57

56. WAITES K. B., TAYLOR-ROBINSON D.

Mycoplasma et Ureaplasma

Manuel of clinical Microbiology, ASM, 7th ed 1999, 56: 782-794

