

# UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

\*\*\*\*\*

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE

\*\*\*\*\*



ANNEE 2013

N<sup>o</sup> 70

**ISOLEMENT ET VALIDATION DES METHODES D'IDENTIFICATION  
DES SOUCHES : *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*,  
*Streptococcus pyogenes*, *Moraxella catarrhalis* A L'ORIGINE D'INFECTIONS  
RESPIRATOIRES AIGUES HAUTES DE L'ENFANT A DAKAR**

## THÈSE

**POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
(DIPLÔME D'ETAT)**

**Présentée et soutenue publiquement le 11 Juillet 2013**

**Par**

**Mlle Josiane GOUHOUE TCHOUANCHE**

**Née le 02 Septembre 1985 à Yaoundé (Cameroun)**

### MEMBRES DU JURY

<b>PRESIDENT :</b>	<b>M. Moussa Fafa</b>	<b>CISSE</b>	<b>: Professeur</b>
<b>MEMBRES:</b>	<b>M. Cheikh Saad Bouh</b>	<b>BOYE</b>	<b>: Professeur</b>
	<b>M. Mounibé</b>	<b>DIARRA</b>	<b>: Professeur</b>
	<b>M. Bara</b>	<b>NDIAYE</b>	<b>: Professeur</b>
<b>DIRECTEUR DE THESE :</b>	<b>M. Cheikh Saad Bouh</b>	<b>BOYE</b>	<b>: Professeur</b>
<b>CO-DIRECTEUR DE THESE :</b>	<b>M. Abdoulaye</b>	<b>SECK</b>	<b>: Assistant</b>

# UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

## FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTO – STOMATOLOGIE

### DECANAT & DIRECTION

**DOYEN**

**M. ABDARAHMANE DIA**

**PREMIER ASSESSEUR**

**AMADOU DIOUF**

**DEUXIEME ASSESSEUR**

**M. ABDOUL WAKHABE KANE**

**CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS**

**M. SEYBATOU MAGATTE NDAW**

**DAKAR, LE 03 JUIN 2013**

## LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR GRADE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2012–2013

### I. MEDECINE

#### PROFESSEURS TITULAIRES

M.	Mamadou	BA	Pédiatrie
M.	Mamadou	BA	Urologie
Mme	Mariame GUEYE	BA	Gynécologie-Obstétrique
M.	Serigne Abdou	BA	Cardiologie
M.	Seydou Boubakar	BADIANE	Neurochirurgie
M.	Boubacar	CAMARA	Pédiatrie
M.	Cheikh Ahmed Tidiane	CISSE	Gynécologie-Obstétrique
M.	Moussa Fafa	CISSE	Bactériologie-Virologie
§M.	Jean Marie	DANGOUE	Anatomie et Cytologie Patho.
M.	Abdrahamane	DIA	Anatomie-Chirurgie Générale
Mme	Anta TAL	DIA	Médecine Préventive
M.	Baye Assane	DIAGNE	Urologie
+ *M.	Ibrahima	DIAGNE	Pédiatrie
M.	Bay Karim	DIALLO	O.R.L
*M.	Mame Thierno	DIENG	Dermatologie
M.	Amadou Gallo	DIOP	Neurologie
M	EL Hadj Malick	DIOP	O-R-L
M.	Saliou	DIOP	Hématologie Clinique
Mme	Thérèse MOREIRA	DIOP	Médecine Interne I
M.	Alassane	DIOUF	Gynécologie-Obstétrique
M.	Boucar	DIOUF	Néphrologie
Mme.	Elisabeth	DIOUF	Anesthésiologie-Réanimation
M.	Mamadou Lamine	DIOUF	Hépatologie / Gastro-Entérologie
M.	Raymond	DIOUF	O.R.L
M.	Souvasin	DIOUF	Orthopédie-Traumatologie
M.	Babacar	FALL	Chirurgie Générale
M.	Ibrahima	FALL	Chirurgie Pédiatrique
M.	Pape Ahmed	FALL	Urologie
Mme	Sylvie	SECK GASSAMA	Biophysique
Mme	Gisèle	WOTO GAYE	Anatomie Pathologique
M.	Oumar	GAYE	Parasitologie
§ M.	Lamine	GUEYE	Physiologie
*M.	Serigne Maguèye	GUEYE	Urologie
+*M.	Mamadou Mourtalla	KA	Médecine Interne
M.	Abdoul	KANE	Cardiologie
M.	Assane	KANE	Dermatologie
M.	Oumar	KANE	Anesthésie-Réanimation
M.	Jean Charles	MOREAU	Gynécologie-Obstétrique

M.	Abdoulaye	NDIAYE	Anatomie-Orthopédie-Trauma
M.	Issa	NDIAYE	O.R.L
*M.	Madoune Robert	NDIAYE	Ophtalmologie
M.	Mouhamadou	NDIAYE	Chirurgie Thoracique&Cardio-vasculaire
M.	Mouhamadou Mansour	NDIAYE	Neurologie
M.	Ousmane	NDIAYE	Pédiatrie
M.	Papa Amadou	NDIAYE	Ophtalmologie
M.	Alain Khassim	NDOYE	Urologie
*M.	Mamadou	NDOYE	Chirurgie Infantile
*M.	Abdou	NIANG	CM / Néphrologie
M.	El Hadji	NIANG	Radiologie
Mme	Mbayang	NDIAYE NIANG	Physiologie
*M.	Youssoupha	SAKHO	Neurochirurgie
M.	Mohamadou Guélaye	SALL	Pédiatrie
M.	Niama DIOP	SALL	Biochimie Médicale
M.	Abdoulaye	SAMB	Physiologie
M.	Mamadou	SARR	Pédiatrie
M.	Moustapha	SARR	Cardiologie
§Mme	Awa Marie COLL	SECK	Maladies Infectieuses
M.	Moussa	SEYDI	Maladies Infectieuses
M.	Seydina Issa Laye	SEYE	Orthopédie-Traumatologie
M.	EL Hassane	SIDIBE	Endocrinologie-Métabolisme
			Nutrition-Diabétologie
*M.	Masserigne	SOUMARE	Maladies Infectieuses
M.	Ahmad Iyane	SOW	Bactériologie-Virologie
M.	Mamadou Lamine	SOW	Médecine Légale
+* M	Papa Salif	SOW	Maladies Infectieuses
Mme.	Haby SIGNATE	SY	Pédiatrie
M.	Mouhamadou Habib	SY	Orthopédie-Traumatologie
§M	Cheickna	SYLLA	Urologie
*M.	Cheikh Tidiane	TOURE	Chirurgie Générale
M.	Meïssa	TOURE	Biochimie Médicale

---

+ Disponibilité

\* Associé

§ Détachement

## MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M.	Abdoulaye		BA	Physiologie
Mme	Aïssata		LY BA	Radiologie
M.	EL Hadj Amadou		BA	Ophtalmologie
M.	Momar Codé		BA	Neurochirurgie
M.	Mamadou Diarrah		BEYE	Anesthésie-Réanimation
M.	Mamadou Lamine		CISSE	Gynécologie-Obstétrique
M.	Ahmadou		DEM	Cancérologie
M.	Djibril		DIALLO	Gynécologie-Obstétrique
*+M.	Issakha		DIALLO	Santé Publique
M.	Saïdou		DIALLO	Rhumatologie
* M.	Babacar		DIAO	Urologie
M.	Maboury		DIAO	Cardiologie
*M.	Oumar		DIARRA	Chirurgie Thoracique & Cardio-Vasculaire
§ M.	Alassane		DIATTA	Biochimie Médicale
M.	Charles Bertin		DIEME	Orthopédie-traumatologie
M.	Madieng		DIENG	Chirurgie Générale
M.	Yémou		DIENG	Parasitologie
M.	El Hadj Ibrahima		DIOP	Orthopédie-Traumatologie
M.	Ibrahima Bara		DIOP	Cardiologie
M.	Mamadou		DIOP	Anatomie
M.	Saïd Norou		DIOP	Médecine Interne II
Mme.	Sokhna		BA DIOP	Radiologie
M.	Saliou		DIOUF	Pédiatrie
Mme	Awa Oumar	TOURE	FALL	Hématologie Biologique
M.	Babacar		FAYE	Parasitologie
§ Mme	Mame Awa		FAYE	Maladies Infectieuses
M.	Oumar		FAYE	Parasitologie
M.	Oumar		FAYE	Histologie-Embryologie
M.	EL Hadj Fary		KA	Clinique Médicale/Néphrologie
M.	Ousmane		KA	Chirurgie Générale
M.	Abdoulaye		LEYE	Clinique Médicale / Médecine Interne
Mme	Fatimata		LY	Dermatologie
*M.	Mouhamadou		MBENGUE	Hépatologie / Gastro-Entérologie
§ M.	Mamadou		MBODJ	Biophysique
*M.	Claude		MOREIRA	Pédiatrie
M.	Philippe Marc		MOREIRA	Gynécologie
M.	Moustapha		NDIAYE	Neurologie
+ * M.	Papa		NDIAYE	Médecine Préventive
*M.	Souhaïbou		NDONGO	Médecine Interne
*M.	Cheikh Tidiane		NDOUR	Maladies Infectieuses
M.	Jean Marc Ndiaga		NDOYE	Anatomie
Mme	Marie		DIOP NDOYE	Anesthésie-Réanimation
M.	Oumar		NDOYE	Biophysique
M.	Gabriel		NGOM	Chirurgie Pédiatrique
Mme	Suzanne Oumou		NIANG	Dermatologie
M.	Abdoulaye		POUYE	CM / Médecine Interne
Mme	Paule Aïda	NDOYE	ROTH	Ophtalmologie

M.	André Daniel	SANE	Orthopédie-Traumatologie
Mme	Fatou Samba D. NDIAYE	SENE	Hématologie Clinique
M.	Abdourahmane	TALL	O.R.L
M.	Mamadou Habib	THIAM	Psychiatrie

—  
+ Disponibilité

\* Associé

§ Détachement

## MAITRES-ASSISTANTS

Mme	Fatou Diallo	AGNE	Biochimie Médicale
Mme	Ndèye Méry DIA	BADIANE	Maladies Infectieuses
M.	El Hadj Souleymane	CAMARA	Orthopédie-Traumatologie
M.	Amadou Gabriel	CISS	Chirurgie Thoracique & Cardio. Vasc.
Mme.	Mariama Safiétou KA	CISSE	Médecine Interne
M.	Mamadou	CISSE	Chirurgie Générale
M.	André Vauvert	DANSOKHO	Orthopédie-Traumatologie
M.	Daouda	DIA	Hépatologie / Gastro-Entérologie
Mme	Ndèye Ramatoulaye	DIAGNE	Pédiatrie
M.	Abdoulaye Séga	DIALLO	Histologie-Embryologie
*Mme	Marie Edouard Faye	DIEME	Gynécologie Obstétrique
M.	Abdoulaye Ndoye	DIOP	Radiodiagnostic
M.	Pape Saloum	DIOP	Chirurgie Générale
M.	Sylvie Audrey G.	DIOP	Maladies Infectieuses
M.	Ansoumana	DIATTA	Pneumophtisiologie
M.	Amadou Lamine	FALL	Pédiatrie
M.	Lamine	FALL	Pédopsychiatrie
Mme	Mame Coumba GAYE	FALL	Médecine du Travail
M.	Papa Lamine	FAYE	Psychiatrie
*M.	Serigne Modou Kane	GUEYE	Gynécologie-Obstétrique
M.	Adama	KANE	Cardiologie
Mme	Yacine Dia	KANE	Pneumophtisiologie
*M.	Abdoul Aziz	KASSE	Cancérologie
M.	Ibrahima	KONATE	Chirurgie Générale
M.	Noël Magloire	MANGA	Maladies Infectieuses
M.	Alassane	MBAYE	Cardiologie
Mme	Aminata	DIACK MBAYE	Pédiatrie
M.	Magatte	MBAYE	Gynécologie-Obstétrique
Mme	Ndèye Maïmouna NDOUR	MBAYE	Médecine Interne
M.	Amadou Koura	NDAO	Neurologie
M.	Assane	NDIAYE	Anatomie
M.	Jean Louis Abdourahim	NDIAYE	Parasitologie Médicale
* M.	Malick	NDIAYE	O.R.L.
M.	Mor	NDIAYE	Médecine du Travail
M.	Mouhamadou Bamba	NDIAYE	Cardiologie
M.	Ndaraw	NDOYE	Neurochirurgie
M.	Lamine	NIANG	Urologie

Mme	Marguerite Edith D.	QUENUM	Ophtalmologie
M.	Jean Claude François	SANE	Orthopédie-Traumatologie
Mme	Anne Aurore	SANKALE	Chirurgie plastique et reconstructive
Mme	Anna	SARR	Médecine Interne
Mme	Fatou Bintou	SAR SARR	Physiologie
M.	Ndéné Gaston	SARR	Biochimie Médicale
M.	Gora	SECK	Physiologie
*M.	Ibrahima	SECK	Médecine Préventive
M.	Mohamed Maniboliot	SOUMAH	Médecine légale
Mme	Aïda	SYLLA	Psychiatrie
M.	Assane	SYLLA	Pédiatrie
M.	Kamadore	TOURE	Santé Publique
Mme	Nafissatou Oumar	TOURE	Pneumologie
M.	Silly	TOURE	Stomatologie
Mme	Aïssatou Magatte	WANE	Ophtalmologie
M.	Issa	WONE	Médecine Préventive

## ASSISTANTS

Mme	Nafissatou Ndiaye	BA	Anatomie Pathologique
M.	El Hadji Amadou Lamine	BATHILY	Biophysique
Mme	Fatou	CISSE	Biochimie Médicale
M.	Boubacar Samba	DANKOKO	Médecine Préventive
M.	Mouhamadou Lamine	DIA	Bactériologie-Virologie
M	Sidy Akhmed	DIA	Médecine du Travail
M.	Chérif Mohamed M.	DIAL	Anatomie Pathologique
Mme.	Awa Ba	DIALLO	Bactériologie-Virologie
Mme.	Mama SY	DIALLO	Histologie-embryologie
M.	Mor	DIAW	Physiologie
Mme.	Marie Joseph	DIEME	Anatomie Pathologique
M.	Abdoulaye Dione	DIOP	Radiologie
Mme.	Aïssatou Seck	DIOP	Physiologie
M.	Dialo	DIOP	Bactériologie-Virologie
M.	Ousseynou	DIOP	Biophysique
Mme.	Abibatou	SALL FALL	Hématologie
M.	Blaise Félix	FAYE	Hématologie
Mme	Roughyatou	KA	Bactériologie – Virologie
M.	Mamadou Makhtar Mbacké	LEYE	Médecine Préventive
M.	Aïnina	NDIAYE	Anatomie
M.	Boucar	NDONG	Biophysique
M.	Khadim	NIANG	Médecine Préventive
M.	Moussa	SECK	Hématologie
M.	Doudou	SOW	Parasitologie Médicale
M.	Khadim	SYLLA	Parasitologie Médicale
M.	Ibou	THIAM	Anatomie Pathologique
M.	Roger Clément Kouly	TINE	Parasitologie Médicale

## **CHEFS DE CLINIQUE-ASSISTANTS DES SERVICES UNIVERSITAIRES DES HOPITAUX**

M.	Idrissa	BA	Pédopsychiatrie
Mme	Aïssatou	BA	Pédiatrie
M.	Papa Salmane	BA	Chirurgie Thoracique & Cardio -vasculaire
M.	Mamadou Diawo	BAH	Anesthésie-Réanimation
Mlle.	Marie Louise	BASSENE	Hépto-gastroentérologie
M.	Malick	BODIAN	Cardiologie
M.	Momar	CAMARA	Psychiatrie
M	Mouhamadou Moustapha	CISSE	Néphrologie
Mme	Ndèye Fatou	COULIBALY	Orthopédie-Traumatologie
M.	Mamadou	COUME	Médecine Interne
M.	Abdoulaye	DANFA	Psychiatrie
M.	Richard Edouard Alain	DEGUENONVO	O-R-L
M.	Mohamed Tété Etienne	DIADHIOU	Gynécologie-Obstétrique
Mme.	Nafissatou	DIAGNE	Médecine Interne
M.	Ngor Side	DIAGNE	Neurologie
M.	Moussa	DIALLO	Dermatologie
M.	Demba	DIEDHIOU	Médecine Interne II
Mme	Mame Salimata	DIENE	Neurochirurgie
*M.	Mamadou Moustapha	DIENG	Cancérologie
M.	Pape Adama	DIENG	Chirurgie Thoracique & Cardio-Vasculaire
Mme.	Seynabou FALL	DIENG	Médecine Interne I
Melle.	Evelyne Siga	DIOM	O.R.L.
M.	Rudolph	DIOP	Stomatologie
M	Assane	DIOP	Dermatologie
M.	Abdoul Aziz	DIOUF	Gynécologie-Obstétrique
M.	Assane	DIOUF	Maladies Infectieuses
M.	Doudou	DIOUF	Cancérologie
M.	Boubacar	FALL	Urologie
M.	Mohamed Lamine	FALL	Anesthésie-réanimation
Mm.	Anna Modji Basse	FAYE	Neurologie
M.	Atoumane	FAYE	Médecine Interne
*M.	Papa Moctar	FAYE	Pédiatrie
Mme.	Louise	FORTES	Maladies Infectieuses
M.	Pape Macoumba	GAYE	Cancéro-radiothérapie
M.	Modou	GUEYE	Pédiatrie
M.	Aly Mbara	KA	Ophtalmologie
M.	Daye	KA	Maladies Infectieuses
M.	Amadou Ndiassé	KASSE	Orthopédie-Traumatologie
M.	Charles Valérie Alain	KINKPE	Orthopédie-Traumatologie
Melle.	Ndèye Aïssatou	LAKHE	Maladies Infectieuses
M.	Ahmed Tall	LEMRAVOTT	Néphrologie
M.	Papa Alassane	LEYE	Anesthésie-réanimation
M.	Yakham Mohamed	LEYE	Médecine Interne
Mme.	Indou DEME	LY	Pédiatrie
M.	Lamine	NDIAYE	Chirurgie Plastique et Reconstructive
M.	Maodo	NDIAYE	Dermatologie

M.	Papa Ibrahima	NDIAYE	Anesthésie Réanimation
Mme	Ndèye Dialé Ndiaye	NDONGO	Psychiatrie
M.	Oumar	NDOUR	Chirurgie Pédiatrique
M.	Cyrille	ZE ONDO	Urologie
M.	Aloïse	SAGNA	Chirurgie Pédiatrique
Mme.	Magatte Gaye	SAKHO	Neurochirurgie
M.	Alioune	SARR	Urologie
Mme	Lala Bouna	SECK	Neurologie
M.	Sokhna	SECK	Psychiatrie
Mme.	Marième Soda	DIOP SENE	Neurologie
M.	Abdou Khadir	SOW	Physiologie
M.	Aboubacry Sadikh	SOW	Ophtalmologie
Melle	Adjaratou Dieynabou	SOW	Neurologie
M.	Djiby	SOW	Médecine Interne II
M.	Yaya	SOW	Urologie
M.	Abou	SY	Psychiatrie
M.	Alioune Badara	THIAM	Neurochirurgie
Mme.	Khady	THIAM	Pneumologie
M.	Mbaye	THIOUB	Neurochirurgie
M.	Alpha Oumar	TOURE	Chirurgie Générale

---

—  
+ Disponibilité  
\* Associé  
§ Détachement

## II. PHARMACIE

### PROFESSEURS TITULAIRES

M.	Emmanuel	BASSENE	Pharmacognosie et Botanique
M.	Cheikh Saad Bouh	BOYE	Bactériologie-Virologie
M.	Aynina	CISSE	Biochimie Pharmaceutique
Mme	Aïssatou Gaye	DIALLO	Bactériologie-Virologie
Mme	Aminata SALL	DIALLO	Physiologie Pharmaceutique
M.	Mounibé	DIARRA	Physique Pharmaceutique
M.	Alioune	DIEYE	Immunologie
* M.	Amadou Moctar	DIEYE	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M.	Pape Amadou	DIOP	Biochimie Pharmaceutique
M.	Yérim Mbagnick	DIOP	Chimie Analytique
M.	Amadou	DIOUF	Toxicologie
*M.	Souleymane	MBOUP	Bactériologie-Virologie
M.	Bara	NDIAYE	Chimie Analytique
* M.	Omar	NDIR	Parasitologie
Mme.	Philomène LOPEZ	SALL	Biochimie Pharmaceutique
M.	Guata yoro	SY	Pharmacologie et Pharmacodynamie

### MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Melle	Thérèse	DIENG	Parasitologie
M.	Tandakha Ndiaye	DIEYE	Immunologie
M.	Djibril	FALL	Pharmacie Chimique & Chimie Orga.
M.	Mamadou	FALL	Toxicologie
M.	Daouda	NDIAYE	Parasitologie
Mme.	Maguette D.	SYLLA NIANG	Immunologie
M.	Mamadou	SARR	Physiologie Pharmaceutique
M.	Oumar	THIOUNE	Pharmacie Galénique
M.	Alassane	WELE	Chimie Thérapeutique

### MAITRES DE CONFERENCES

M.	Matar	SECK	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
----	-------	------	--

### MAITRES-ASSISTANTS

Mme.	Rokhaya Ndiaye	DIALLO	Biochimie Pharmaceutique
M.	Amadou	DIOP	Chimie Analytique
M.	Pape Madièye	GUEYE	Biochimie Pharmaceutique
M.	Modou Oumy	KANE	Physiologie
M.	Gora	MBAYE	Physique Pharmaceutique
*M.	Augustin	NDIAYE	Physique Pharmaceutique

*Mme Halimatou Diop	NDIAYE	Bactériologie – Virologie
*M. Mamadou	NDIAYE	Pharmacologie et Pharmacodynamie
Mme Rita B.	NONGONIERMA	Pharmacognosie
M. Serigne Omar	SARR	Chimie Analytique & Bromatologie
Mme. Awa Ndiaye	SY	Pharmacologie

## ASSISTANTS

Melle Aïda Sadikh	BADIANE	Parasitologie
Mme Kady Diatta	BADJI	Botanique
M. Mamadou	BALDE	Chimie Thérapeutique
*M Firmin Sylva	BARBOZA	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M. Makhtar	CAMARA	Bactériologie-virologie
M. William	DIATTA	Botanique
M. Adama	DIEDHIYOU	Chimie Thérapeutique & Organique
M. Cheikh	DIOP	Toxicologie
M. Ahmédou Bamba K.	FALL	Pharmacie Galénique
M. Alioune Dior	FALL	Pharmacognosie
*M. Babacar	FAYE	Chimie Générale
M. Djiby	FAYE	Pharmacie Galénique
M. Macoura	GADJI	Hématologie
Mme. Rokhaya Sylla	GUEYE	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
M. Babacar	MBENGUE	Immunologie
Mme Arame	NDIAYE	Biochimie Médicale
M. Mouhamadou	NDIAYE	Parasitologie
M. Idrissa	NDOYE	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
Mme. Mathilde M. P. Cabral	NDIOR	Toxicologie
M. Abdoulaye	SECK	Bactériologie – Virologie
* M. Mame Cheikh	SECK	Parasitologie
M. Mbaye	SENE	Physiologie Pharmaceutique
M. Madièye	SENE	Pharmacologie
Mme. Fatou Guèye	TALL	Biochimie Pharmaceutique
Mme Aminata	TOURE	Toxicologie

## ATTACHES

M. Louis Augustin D.	DIOUF	Physique Pharmaceutique
----------------------	-------	-------------------------

---

\* Associé

## II. CHIRURGIE DENTAIRE

### PROFESSEUR TITULAIRE

*M.	Falou	DIAGNE	Orthopédie Dento-Faciale
M.	Boubacar	DIALLO	Chirurgie Buccale
M.	Papa Demba	DIALLO	Parodontologie
M	Malick	SEMBENE	Parodontologie

### MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mme	Khady DIOP	BA	Orthopédie Dento-Faciale
M	Henri Michel	BENOIST	Parodontologie
Mme	Adam Marie	SECK DIALLO	Parodontologie
M.	Daouda	FAYE	Odontologie Préventive et Sociale
M.	Abdoul Wakhabe	KANE	Odontologie Cons. Endodontie
§ Mme	Charlotte	FATY NDIAYE	Chirurgie Buccale
Mme	Fatou gaye	NDIAYE	Odontologie Conservatrice Endodontie
* M.	Papa Ibrahima	NGOM	Orthopédie Dento-Faciale
Mme	Soukèye	DIA TINE	Chirurgie Buccale
M.	Babacar	TOURE	Odontologie Conservatrice Endodontie

### MAITRES ASSISTANTS

Mme	Aïssatou	TAMBA BA	Pédodontie-Prévention
M.	Daouda	CISSE	Odontologie Prév. et Sociale
Mme	Fatou	DIOP	Pédodontie-Prévention
M.	Joseph Samba	DIOUF	Orthopédie Dento-Faciale
M.	Babacar	FAYE	Odontologie Cons. Endodontie
M.	Malick	FAYE	Pédodontie
Mme	Fatou	LEYE	O.C.E.
M.	Cheikh Mouhamadou M.	LO	Odontologie Prév. Sociale
M.	Malick	MBAYE	Odontologie Cons. Endodontie
M.	El Hadj Babacar	MBODJ	Prothèse Dentaire
M.	Paul Débé Amadou	NIANG	Chirurgie Buccale
Mme	Farimata youga DIENG	SARR	Matières Fondamentales
M.	Mouhamed	SARR	Odontologie Cons. Endodontie
M.	Mohamed Talla	SECK	Prothèse Dentaire

## ASSISTANTS

Mme. Adjaratou Wakha	AIDARA	O.C.E.
M. Abdou	BA	Chirurgie Buccale
M Alpha	BADIANE	Orthopédie Dento-Faciale
M. Khaly	BANE	O.C.E.
Mme Binetou C.	GASSAMA BARRY	Chirurgie Buccale
*M. Khalifa	DIENG	Odontologie Légale
*M. Lambane	DIENG	Prothèse Dentaire
M. Abdoulaye	DIOUF	Parodontologie
M. Massamba	DIOUF	Odontologie Prév. et Sociale
Mme Ndèye Nguiniane Diouf	GAYE	Odontologie Pédiatrique
*M. Moctar	GUEYE	Prothèse Dentaire
*M. Mouhamadou Lamine	GUIRASSY	Parodontologie
Melle. Aïda	KANOUTE	Santé Publique Dentaire
M. Alpha	KOUNTA	Chirurgie Buccale
M. Papa Abdou	LECOR	Anatomo- Physiologie
M. Edmond	NABHANE	Prothèse Dentaire
M. Cheikh	NDIAYE	Prothèse Dentaire
M. Oumar Harouna	SALL	Matières Fondamentales
M. Babacar	TAMBA	Chirurgie Buccale
M. Amadou	TOURE	Prothèse Dentaire
M. Saïd Nourou	TOURE	Prothèse Dentaire

---

—

\* Associé

§ Détachement



**DÉDICACES**

### **A l'Éternel, mon Dieu**

Mon âme exalte le Seigneur et n'oublie aucun de ses bienfaits à mon égard. Père Éternel je te rends grâce de ce que tu as accomplis dans ma vie et de ce que tu me permets par le biais de ce travail d'être promu au grade de Docteur en pharmacie. Merci et que ton nom soit toujours glorifié. Amen.

### **A la mémoire de mon père TCHOUANCHE Samuel**

Papa tu ne peux pas savoir à quel point j'aurais aimé qu'en ce jour tu sois présent pour me voir soutenir. Mais le Seigneur en a décidé autrement et tout ce qu'il fait est bon. Je te remercie pour les valeurs que tu m'as inculquées comme celle de toujours travailler, de respecter son prochain et d'être serviable. Merci pour ton amour. Repose en paix, à jamais dans nos cœurs tu demeures.

### **A ma grand-mère chérie maman Rebecca NGOWE,**

Repose en paix.

### **A ma maman Jeannette TCHOUANCHE**

La meilleure des mamans.

Maman enfin ce jour est arrivé, je tiens à te dire merci de tout mon cœur pour tout ce que tu as fait pour moi. Sans ton courage, ta foi, ta détermination, ton amour, tes encouragements quand c'était difficile, je ne serai pas arrivé. Je remercie le Seigneur de m'avoir donné une maman comme toi et je lui demande encore de me permettre de profiter de ta présence encore très longtemps.

Maman je t'aime et ce travail est pour toi.

### **A mon oncle tonton Olivier**

Mon deuxième papa, tu as toujours été là pour moi, tu m'as toujours soutenu, encouragé et surtout tu as toujours cru en moi. En ce jour solennel je te dis Merci et te dédie ce travail.

### **A tonton Camille PEUDIEU**

Merci pour ton affection, ta présence, tes encouragements, ton soutien. Ce travail est pour toi mon tonton chéri.

**A Samy, Michel, Ulrich et Nathan**

On est enfin arrivé, merci beaucoup pour votre soutien, vos encouragements, vos motivations qui ont été les miennes aussi. Je vous aime et vous dédie ce travail. Persévérez toujours, c'est la clé de la réussite.

**A toute la famille TCHOUANCHE**

Elvyre, Solange, Hermine, Mireille, Eloge, Samy, je vous dédie ce travail, que le Seigneur renforce le lien qui nous unit.

**A Eric KOUAM**

Merci pour le soutien et les conseils.

Pendant tout ce temps tu as toujours été là pour moi et je te remercie pour cela. Je te dédie ce travail.

**Au Dr Sandra FONKUI**

Ma grande sœur chérie, merci pour tout ton accueil, ta disponibilité, tes encouragements. Je te dédie ce travail.

**A Nathalie, Linda**

Merci pour vos encouragements, vos prières. En tout cas le Seigneur a exaucé qu'il vous bénisse.

**A Carine, Linda, Fanny, Charlie, Johanna, Donald, Gilles**

Merci beaucoup pour tout ce qu'on a partagé ensemble. Que Dieu vous bénisse

**A toute la famille BO TATE**

Merci de nous avoir inculqué l'amour du travail et la persévérance.

**A mes oncles : Tonton Samuel, Django, Dieudonné, Jean Pierre ...**

Je vous remercie tous pour les encouragements et le soutien.

**A mes tantes : Tata Suzanne, Justine, Evelyne, Florence, Céline...**

Je vous remercie beaucoup pour le soutien et les conseils

**A mes cousins : Armand, Pierre, Paul, Antoine , André, Pache, Guy , Willy ,Yannick, Le Jeune, Dangla, Pernel, Ludovic, Dagobert, Thierry,**

**Romain ...** Merci pour le soutien et vos encouragements. Que le Seigneur vous bénisse.

**A mes cousines : Sylvie, Clarisse, Ariane, Amélie, Arlette, Pierrette, Stéphanie, Diane, Eugénie ...** Je vous aime.

**A mon futur époux et mes futurs enfants**

**A tous ceux qui me sont chères : Patrick, Tanguy, Gael, Mariane, Sandra ; Larissa, Pechens, Laeti, Blandine, Aicha, Dominique, Djemila, Fanny, Flora, Hilaire, Bocclair, Willy, Felix, Yannick, Philippe, Lloyd, Pamela, Rodrigue, Hermann, Kennedy, Arnaud, Sika ...** Merci pour tous les moments bons comme mauvais partagés ensemble, pour les encouragements, le réconfort. Que Dieu nous donne tous d'avoir de réussir dans la vie.

**A la famille KUEMO : papa Siméon, Maman, Esther, Emmanuel**

**A la famille Coulibaly :** Lassina, Madeleine, Mariam, Maïmouna, Brigitte, Sephora, Rosine. Je vous remercie beaucoup pour vos encouragements et le soutien que vous m'avez apporté. Merci beaucoup.

**A tous les membres de l'église du point E**

Merci pour les prières et les encouragements.

**A mes camarades de promotion : Silué, Habib, Lydia, Fatim, Sandra, Djibril, Nadia, Sandrine, Manel, Francis, Davy, Albert, Achimi, Christian, Nadège, Marie Ange ...**

Soyons ce que nous avons rêvé, que le Seigneur nous donne de réussir dans toutes nos entreprises.

**A mes collègues et amis du PFS**

Merci de vos encouragements.

**A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail**



**REMERCIEMENTS**

## **Sincères remerciements**

### **A notre Directeur de Thèse, le professeur Cheikh Saad Bouh BOYE**

Il nous est particulièrement agréable, à l'issue de ce travail que vous avez bien voulu diriger, de vous adresser nos remerciements indéfectibles.

Aucun mot ne pourra traduire ce que nous ressentons... si ce n'est que de vous dire « merci ».

### **A Mon Co-directeur DR Abdoulaye SECK**

Merci pour votre contribution et votre disponibilité.

**A tout le personnel du laboratoire de Bactériologie - Virologie du CHU Aristide Le Dantec particulièrement l'équipe Micro CSB Système: Khady Thiam, Amadou Diop, Dr Assane Dieng, Omar Sagna, Pa Badji, Djibi, Michel, Diop M. ...** Merci de votre disponibilité et de votre participation dans l'élaboration de ce travail.

**A tout le personnel du service des consultations externes de l'HEAR de Fann : Dr Liliane, Dr Aminata, Dr Madiguene, la major, les infirmières....**

Merci pour votre contribution dans l'élaboration de ce travail. Par votre collaboration, vous m'avez permis d'avoir des échantillons et d'apprendre des pathologies infectieuses chez les enfants. Merci beaucoup.

**A tout le personnel de l'unité de recherche et de biotechnologie microbienne du laboratoire de Bactériologie – virologie de l'hôpital Aristide Le dantec : Diop A., Diop M., Oumar ....**

Merci de votre disponibilité et de votre participation dans l'élaboration de ce travail.

**Au Dr Assane Dieng,** merci beaucoup pour vos encouragements.

**Au Dr TCHANTCHOU Tanguy de Dieu,** merci pour ta disponibilité, tes encouragements et ton aide.

**Au Docteurs Guindo, Géril, Claude, Mougang ,** merci pour votre disponibilité et pour votre esprit critique.

**A Donald Wandji et Patrick Baleng** merci pour votre aide et vos encouragements.

**A tout le personnel de la Pharmacie le Goeland : Dr Daou, Dr Mingou Romain, Massene Diallo, Vincent Mendy,** merci pour vos encouragements et votre compréhension.

Vous avez tous particulièrement contribué à ce travail, soyez assurés de ma reconnaissance.



**A NOS MAÎTRES ET JUGES**

## **A notre Maître et Président de jury**

### **Monsieur, le Professeur MOUSSA FAFA CISSE**

Vous nous avez fait l'honneur de présider ce jury.

Nous avons apprécié la spontanéité avec laquelle tout au long de notre cursus universitaire, votre compétence, votre rigueur et votre goût du travail bien fait.

Que ce travail soit l'expression de ma profonde et déférente reconnaissance pour la considération que vous avez toujours bien voulu nous manifester.

## **A notre Maître et Directeur de thèse**

### **Monsieur le Professeur Cheikh Saad-Bouh BOYE**

Vous nous avez fait un grand honneur en acceptant d'être notre Directeur de thèse et de faire partie de ce jury.

Il est difficile de résumer en quelques mots toute l'admiration et la reconnaissance que nous vous portons.

Malgré vos multiples occupations, vous avez toujours trouvé le temps pour nous guider et nous encourager dans le travail.

Nous vous remercions et tenons à vous exprimer notre profonde reconnaissance.

## **A notre Maître et Juge**

### **Monsieur le Professeur BARA NDIAYE**

C'est un grand privilège que vous nous avez accordé en acceptant de juger ce travail.

Votre simplicité et votre courtoisie nous ont toujours fasciné.

Nous profitons de ce jour solennel pour vous témoigner toute notre considération. Soyez assuré de notre grande admiration.

## **A notre Maître et Juge**

### **Monsieur, le professeur MOUNIBE DIARRA**

Nous avons été touchées par la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail. C'est un grand honneur que vous nous faites.

Et nous vous remercions vivement de votre disponibilité.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et notre considération.

**« Par délibération, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation »**

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ADH :</b>	Arginine dihydrolase
<b>AFSSAPS :</b>	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
<b>ATCC:</b>	American Type Culture Collection
<b>BGAL :</b>	Béta galactosidase
<b>BT :</b>	Bouillon thioglycolate
<b>CLED:</b>	Cystine Lactose Electrolyt Deficient
<b>CLSI:</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CNRP:</b>	Centre National de Recherche des Pneumocoques
<b>CO<sub>2</sub> :</b>	Dioxyde de carbone
<b>ESC :</b>	Esculine
<b>FRU :</b>	Fructose
<b>G:</b>	Gram
<b>GLU :</b>	Glucose
<b>GNA:</b>	Glomérulo Néphrite aigue
<b>GSC :</b>	Gélose au Sang Cuit
<b>GSN :</b>	Gélose au sang additionnée d'acide nalidixique
<b>GSO :</b>	Gélose au Sang Ordinaire
<b>HALD :</b>	Hôpital Aristide Le Dantec
<b>HEAR:</b>	Hôpital d'Enfant Albert Royer
<b>IND :</b>	Indole
<b>IRA :</b>	Infections Respiratoires Aigues
<b>ISO :</b>	Organisation Internationale de Normalisation
<b>LIP :</b>	Lipase
<b>LOS:</b>	Lipo Oligo Saccharides
<b>LPS:</b>	Lipo Poly saccharides
<b>MAL:</b>	Maltose
<b>MEF:</b>	Middle ear fluid

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

## **LISTES DES FIGURES**

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

## **LISTES DES TABLEAUX**

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



# TABLE DES MATIÈRES

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>PREMIÈRE PARTIE : GÉNÉRALITÉS</b> .....	4
<b>I/PARTICULARITES ANATOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DES VOIES AERIENNES SUPERIEURES DE L'ENFANT</b> .....	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
<b>II/ INFECTIONS RESPIRATOIRES AIGUES HAUTES D'ORIGINES BACTERIENNES</b> .	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
<b>III/ VALIDATION</b> .....	<b>21</b>
III.1. Procédure de validation.....	22
III.2. Paramètres de validation .....	23
III.2.1 Répétabilité .....	23
III.2.2 Reproductibilité.....	23
<b>DEUXIÈME PARTIE : TRAVAIL EXPÉRIMENTAL</b> .....	<b>24</b>
<b>I. CADRE D'ETUDE</b> .....	<b>25</b>
<b>II. OBJECTIFS DE L'ETUDE</b> .....	<b>25</b>
<b>III. MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>25</b>
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
<b>RESULTATS</b> .....	43
<b>I. REPARTITION</b> .....	44
I.1. Nombres de prélèvements.....	44
I.2 Souches isolées.....	44
<b>II. RESULTATS DE L'IDENTIFICATION DES GERMES</b> .....	46
II.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	46
II.2 <i>Haemophilus influenzae</i> .....	47
II.2.3 <i>Moraxella catarrhalis</i> .....	48

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

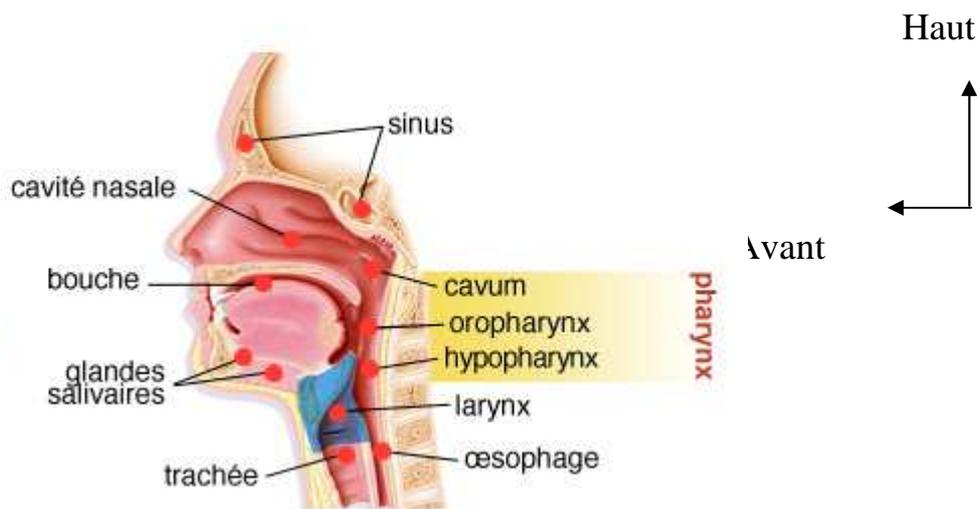
# I. Particularités anatomiques et physiologiques des voies aériennes supérieures de l'enfant

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 cranio-faciale. La base du crâne est alignée sur un plan quasi-horizontale 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].

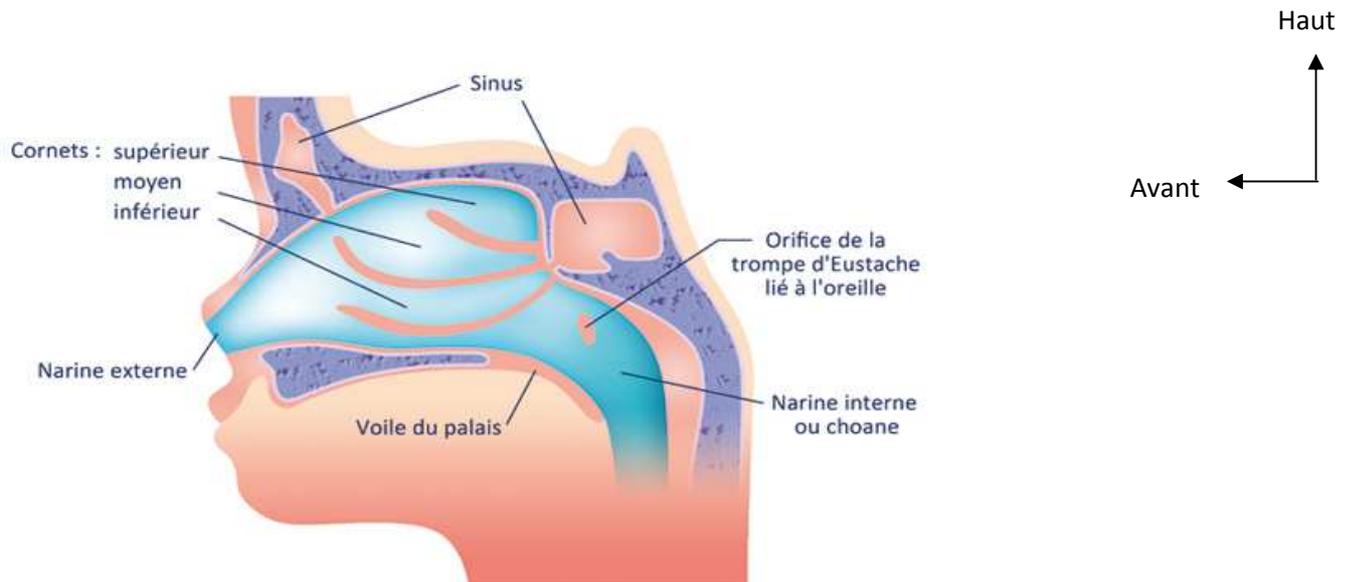
## **I.1. La cavité nasale**

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]**

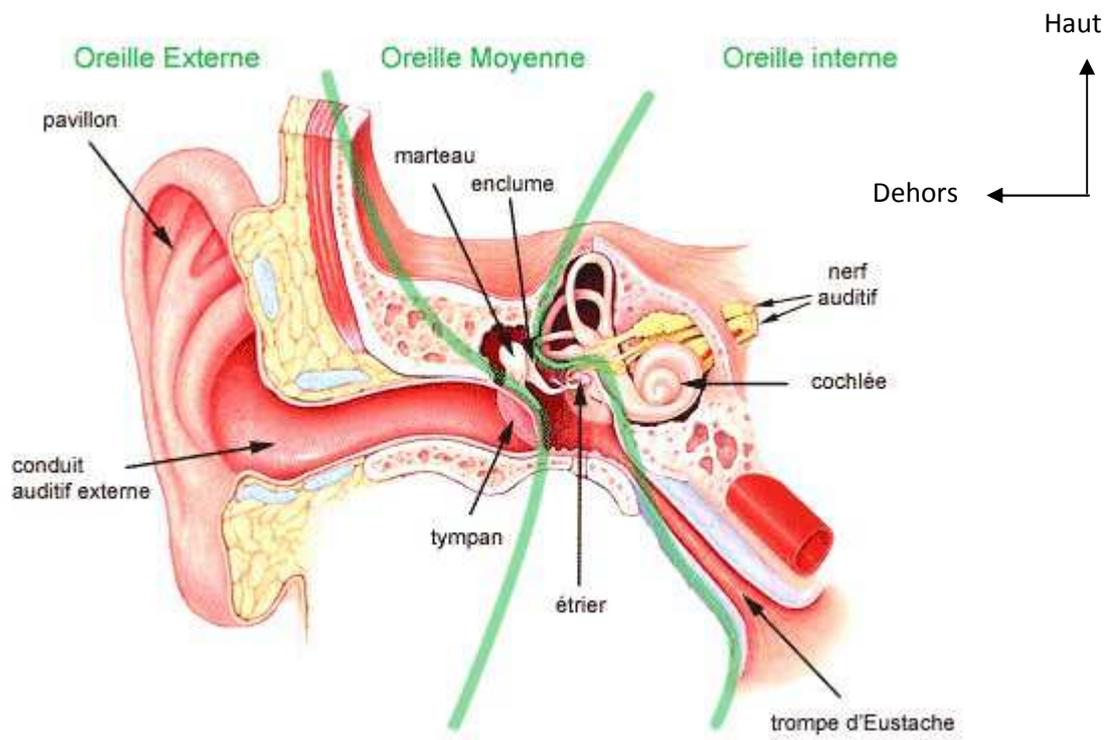
Organe de la phonation situé dans le cou, entre le pharynx et la trachée. Il s'élargit avec l'âge de l'enfant. Pour éviter le passage des aliments dans les poumons, le larynx est surmonté d'un clapet appelé épiglotte qui l'obstrue lors de la déglutition et se relève lors de la respiration. Sa paroi est 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 aiguë), 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  $\beta$ -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 aiguës 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 aiguë (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 sinusiennes.

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 aiguë extériorisée est la principale complication sinusienne des rhinosinusites 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 mastoïdite, 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 aiguës	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>
Otites moyennes aiguës	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> ,
Laryngites aiguës	<i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> .
Les sinusites aiguës	<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 lancéolés, 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 CO<sub>2</sub>. 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 lipoteichoïque possède une capsule polysidique 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 CO<sub>2</sub>. 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 endotoxinique, 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  $\mu$ ) 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) ; culturels (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 troupes 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 me 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 (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 (aérobie, anaérobie, enrichi en CO<sub>2</sub>), de température et de culture favorable au développement microbien.

Le type de géloseensemencé 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 prêtes 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**

- Ecouillons stériles
- Abaisse-langue
- Seringues
- Sonde
- Aspirateur
- Gants
- Oscope
- Glacière

- Réfrigérants

### **Matériels d'isolement**

- 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 CO<sub>2</sub>)
- 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.

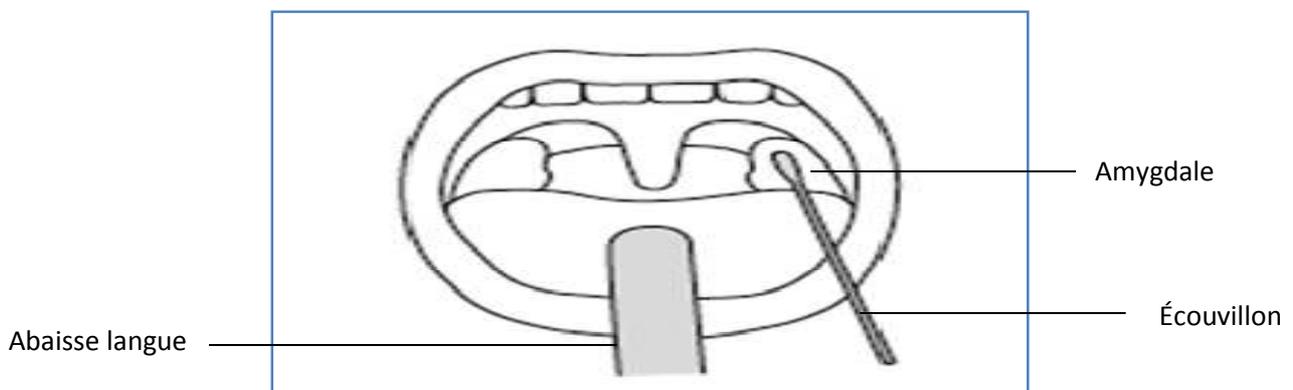
#### Prélèvement des fosses nasales



**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'écouvillon 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 avons utilisé des germes conservés et isolés lors des recherches antérieures.

#### **III.2.3.2.2 Culture proprement dite**

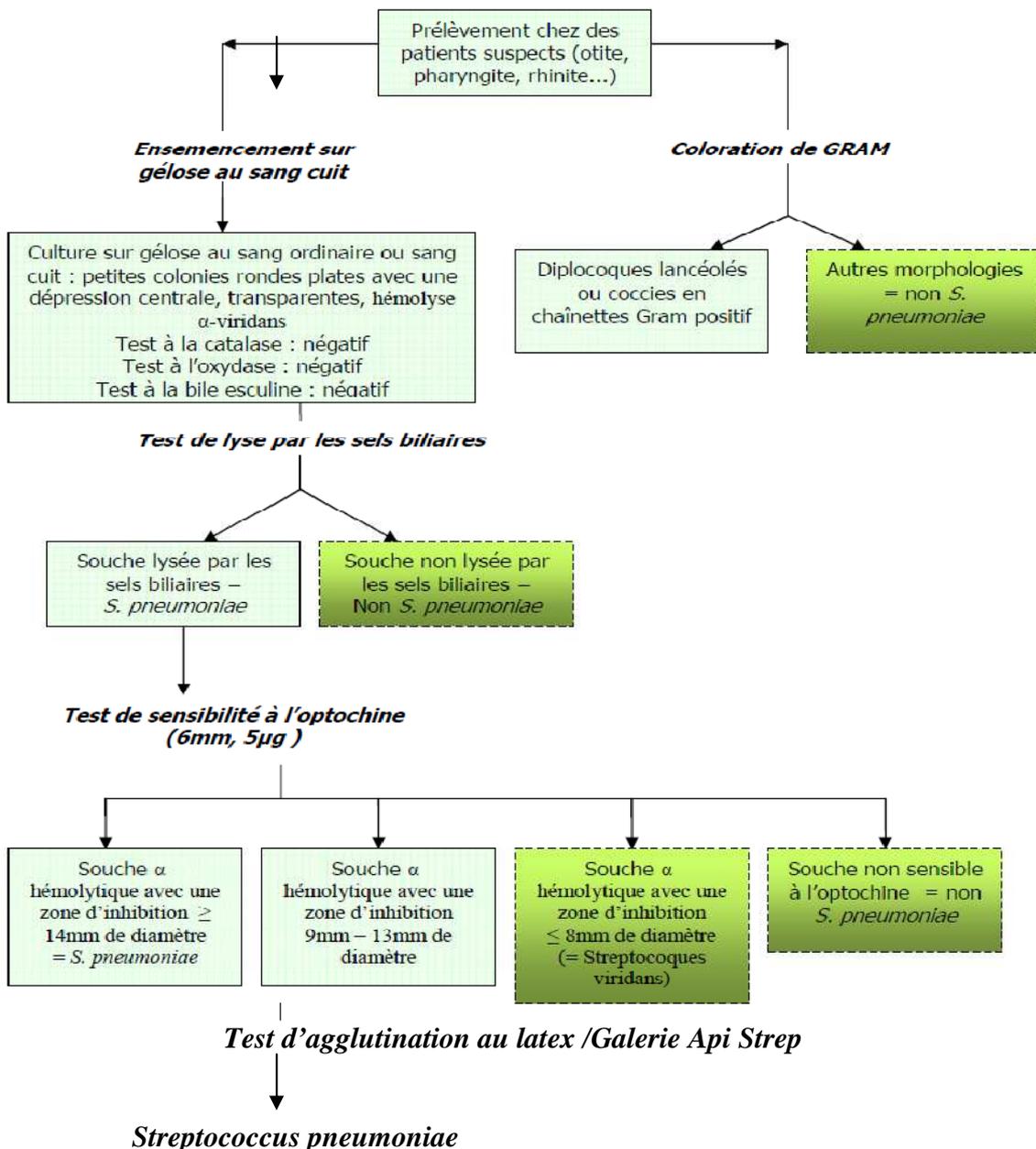
Différents milieux étaient ensemencés selon le germe recherché à l'aide d'une anse en platine. Ces milieux étaient :

- 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 CO<sub>2</sub> 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'issue 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 CO<sub>2</sub> (créée 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.

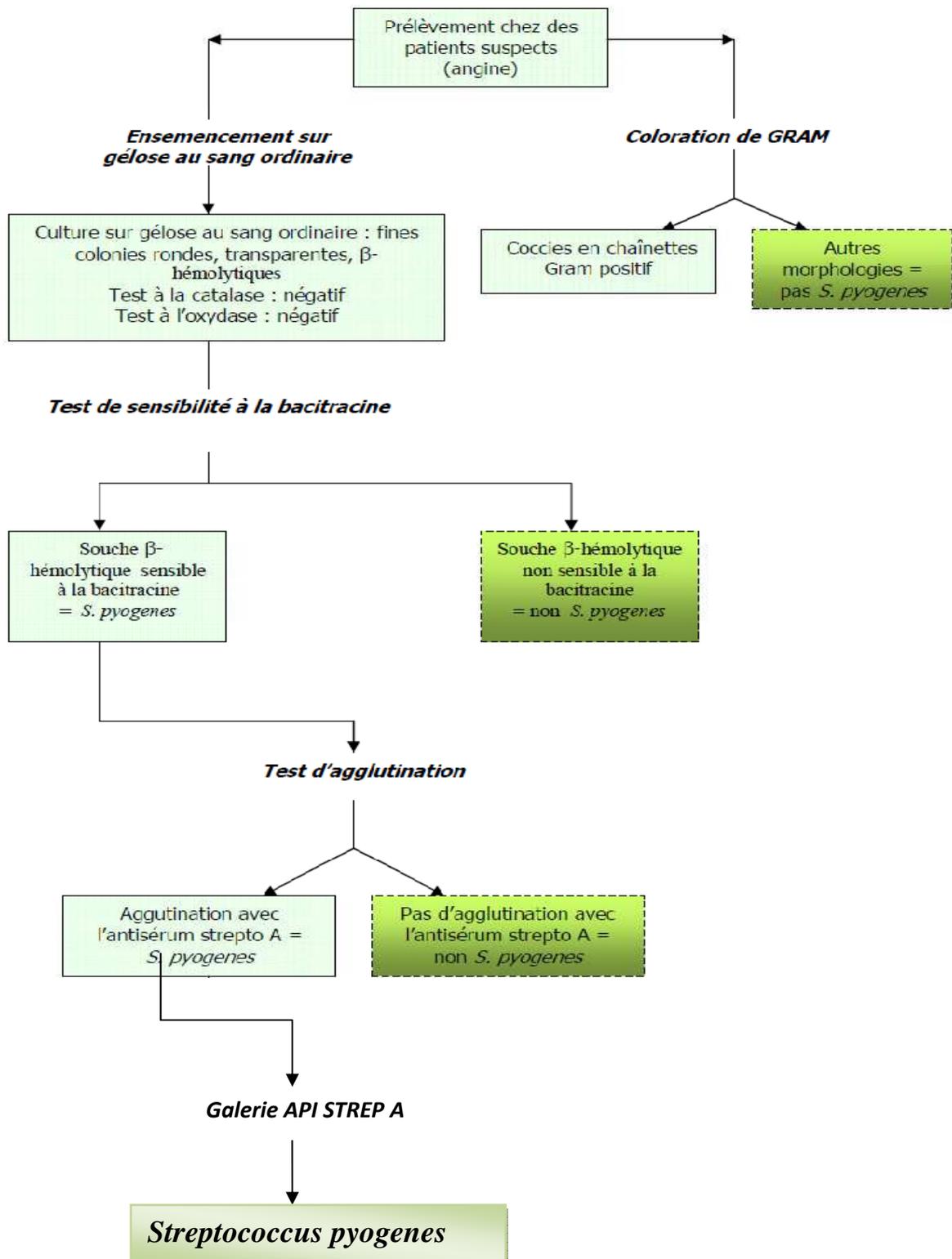
### **Test de lyse par les sels biliaires**

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 avons 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 pyogènes* [43]

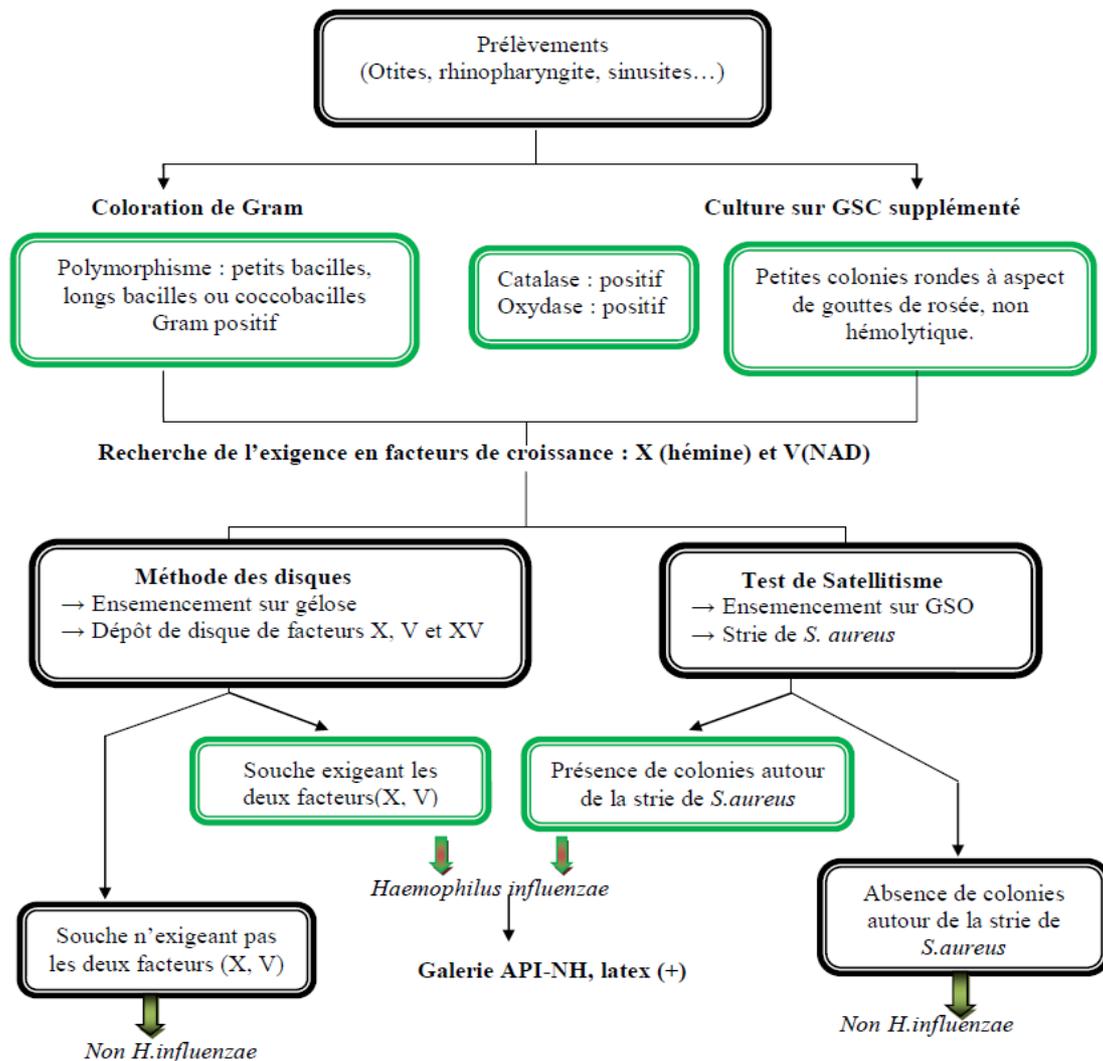
## Réalisation des tests d'identification

Le prélèvement était mis en culture sur GSO que l'on incubait à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> (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 CO<sub>2</sub>, 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 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 CO<sub>2</sub> (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** :

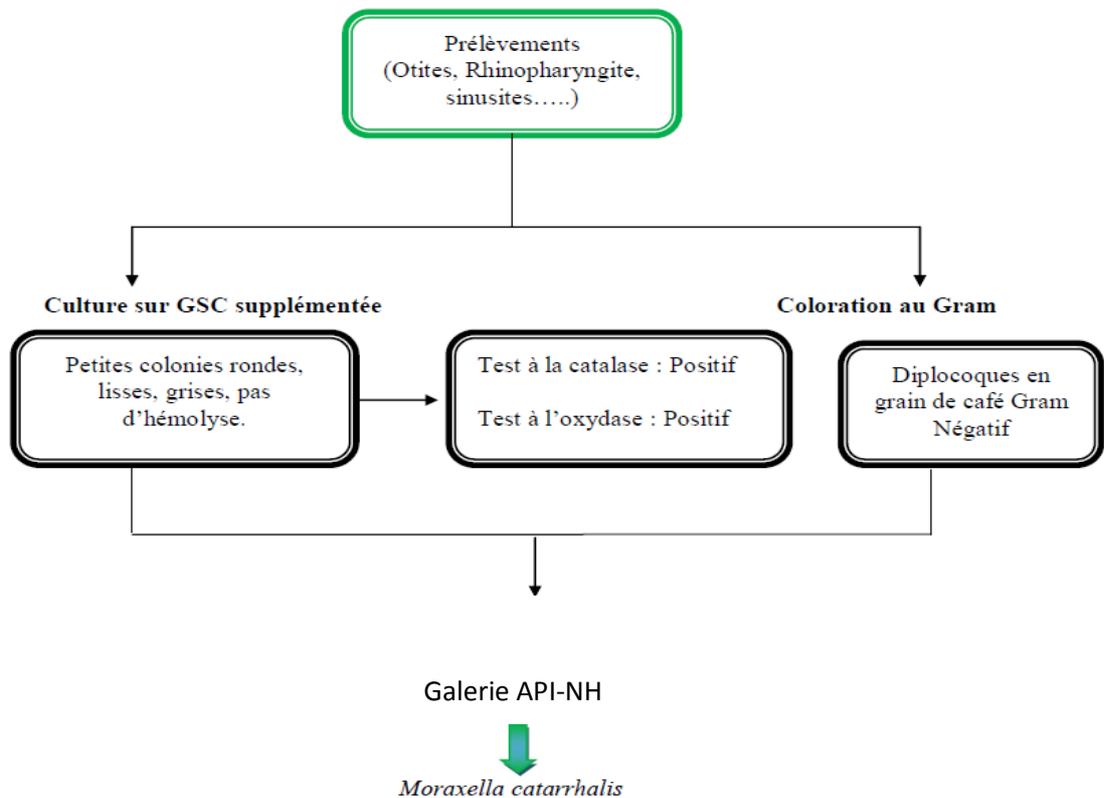
Ce test permettait de confirmer l'exigence en facteurs V apportés par une strie de *Staphylococcus aureus* sur gélose au sang de cheval contenant le facteur X. En effet sur une boîte de GSO, on ensemencait sous forme de stries serrées quelques colonies pures d'*H.influenzae* ; puis une strie de souche viable de *Staphylococcus aureus* de 24 heures. Le milieu GSO était incubé pendant 24

heures à 37°C sous atmosphère riche en CO<sub>2</sub> (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 CO<sub>2</sub> (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 répartie 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

<b>TEST</b>	<b>DUREE</b>
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 cerveau (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 CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> pendant 18-24 heures. Après incubation, nous avons 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 utilisons des tables diagnostiques (ou matrices de données) dans lesquelles nous retrouvons 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	<b>Excellente</b> identification	<b>Très bonne</b> identification	<b>Bonne</b> identification	Identification <b>acceptable</b>	Identification <b>inacceptable.</b>



**RESULTATS**

# I. Répartition

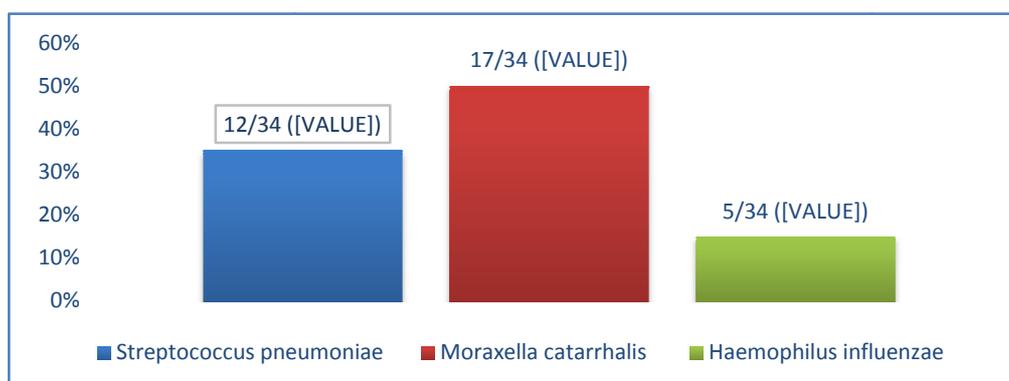
## I.1 Nombres de prélèvements

**Tableau IV** : Répartition des prélèvements

Structure	Effectifs	Pourcentage
<i>Prélèvements</i>		
Nasal	114	65,14
pharyngé	59	33,72
Oreille	02	1,14
Total	175	100
<i>Résultat</i>		
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 réparties 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>	
<b>Rhinites</b>	10	12	04	26
<b>Rhinopharyngites</b>	02	03	01	06
<b>Angines</b>	00	02	00	02
<b>Total</b>	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 biliaries 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> identifié	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
Examen microscopique	Coccobacille G(-)	Coccobacille G(-)	Coccobacille G(-)	Coccobacille G(-)
Aspect des colonies	Petites, fines en gouttelette de pluies Sans hémolyse	Petites, fines en gouttelette de pluies Sans Hémolyse	Petites colonies avec Hémolyse	Petites colonies sans Hémolyse
Catalase	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+
Exigence en facteurs	X+V	X+V	X+V	V
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 glissante	Fines colonies, rondes humides	Petites colonies, 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> Testé	<i>S.sanguis</i>	<i>S.mitis</i>	( <i>S.pneumoniae</i> probable)
colonies	100%	0%	0%	+
Transparentes				
Hémolyse $\alpha$	100%	0%	0%	+
Optochine	90%	0%	0%	
Test de lyse	98%	0%	0%	
Test d'agglutination				
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 appartient à *Streptococcus sanguis* est : **0%**

X appartient 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>	X( <i>Haemophilus influenzae</i> probable)
Colonie 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>	X ( <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 appartient à *Moraxella catarrhalis* est: **1**

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

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

### La Probabilité relative que :

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

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

X appartient 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'écouvillon stérile à tige en bois ayant à son extrémité du coton. Arthur L. et coll. [34] ont également utilisé ce type d'écouvillon 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 écouvillons 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 écouvillons 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 pousse 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 CO<sub>2</sub> 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<sup>®</sup>, *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<sup>®</sup>. *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<sup>®</sup>. Sur GSC plus Polyvitex<sup>®</sup>, 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 para influenzae* 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 milieuxensemencés étaient incubés à 37°C sous atmosphère enrichis avec 5 % de CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> 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<sup>®</sup> Strep mentionnent 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 sérotype 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 présomptive 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 biliaries et sérotypage), l'appartenance à l'espèce *Streptococcus pneumoniae* des souches atypiques (résistantes à l'optochine, non lysées par les sels biliaries) 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'antisérums 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 établi 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 différentielles telles que l'agglutination de particules de latex et le test à la Bacitracine permettent de confirmer les streptocoques bêta-hémolytiques. Seuls les streptocoques  $\beta$ -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], Foubi 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'exsudat 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 Foubi 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 Foubi 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 Foubi 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.



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.

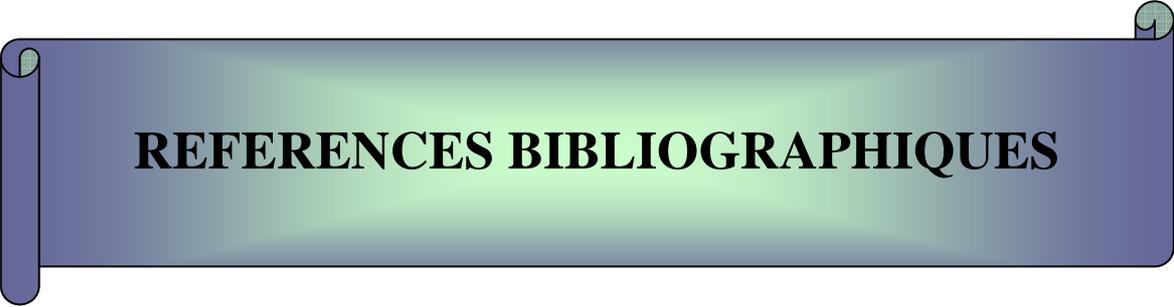
La surveillance métrologique des appareils à l'aide des cartes de contrôle.

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 aiguës.

*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.**  
Otites 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.**  
Morbidity et mortalité des infections respiratoires aiguës 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  $\geq 5$  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 aiguës 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. AËTAL M.**

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

*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 aiguë acquise dans la communauté  
*Clin. Infect. Dis.*, 1996, 23 : p 1209-1223.
- 24. KLOSSEKA J., QUINET B., BINGEN E.,**  
État actuel de la prise en charge des infections rhino sinusiennes 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 cyto bactériologique 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 Cocci Gram positif.  
*Manual of Clinical Microbiologic* 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 : Cocci 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 nasopharyngées 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 cyto bactériologique 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 aiguës.  
*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., MCCAUSTLAND 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. Nezipirateur**

Anatomie du nez

[\[http://www.nezipirateur.fr/nezipirateur-aspirateur-nasal-anatomie.html\]](http://www.nezipirateur.fr/nezipirateur-aspirateur-nasal-anatomie.html),

consulté le 21 mars 2012.

**63. Plante S.**

Otites

[\[http://www.kine-formations.com/Otites\\_a417.html\]](http://www.kine-formations.com/Otites_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

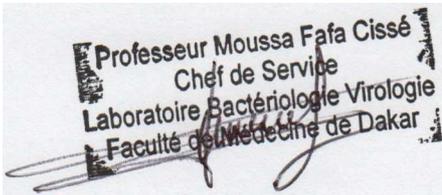
---

**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 réparties 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*.