



INTRODUCTION

Les infections respiratoires aiguës (IRA) peuvent représenter jusqu'à 30% des consultations d'urgence en pédiatrie générale. Sur une mortalité mondiale annuelle estimée à 15 millions chez les enfants de moins de 5 ans, environ quatre millions de décès leur sont attribuables.[43] 98% de décès sont enregistrés dans les pays en voie de développement, avec pour cause principale la pneumonie. [28]

En général, les enfants présentent sept à dix épisodes d'IRA par an, dont la plupart sont peu graves et à rémission spontanée. Quoiqu'en général bénignes, leur gravité peut venir : soit de leur répétition, soit de complications suppurées, soit de leur retentissement fonctionnel (laryngite, bronchiolite)[43]. Les IRA sont source d'inconfort, d'absence et d'indisponibilité sur le plan scolaire et professionnel. Le grand nombre de cas enregistrés dans les centres hospitaliers et autres structures de soins, constituent les enfants, les immunodéprimés. [28]

La plupart de ces infections est d'origine virale (90% au moins), due aux virus respiratoire syncytial, virus parainfluenzae, pour ne citer que ces deux.[9]

Les bactéries sont responsables des 10% restant en cause et les plus fréquemment rencontrées sont : le Streptocoque A, le pneumocoque, *Hemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*.

Plusieurs facteurs contribuent à la pathogénicité de ces IRA, notamment :

- la résistance de ces germes à température ambiante, et leur dissémination par le vent
- les habitudes et mode de vie (hygiène précaire)
- le diagnostic empirique des infections et la tendance à l'automédication des patients qui favorisent en outre le phénomène d'antibiorésistance.

Face à l'ampleur de ces facteurs d'aggravation masquant le mal, il s'avère impérieux d'élaborer des méthodes permettant d'établir le plus vite et le plus exactement possible un diagnostic des IRA.

Les méthodes traditionnelles utilisées jusqu'à présent dans le laboratoire de microbiologie n'ont été basées sur les algorithmes validés qu'à partir de l'étape d'identification. La démarche que nous proposons prend en compte ces méthodes de diagnostic des IRA mais dans la perspective de leur enrichissement par l'élargissement du cadre de recherche. Elle débute par les conditions de prélèvement, qui font l'objet d'un examen méticuleux.. Elle a pour objectif d'établir des algorithmes, c'est-à-dire des séquences d'étapes élémentaires dans un ordre bien établi, en suivant la démarche entreprise depuis le prélèvement des échantillons jusqu'à l'isolement du germe. Les algorithmes doivent être validés pour démontrer de manière retraceable que la démarche choisie permet de réaliser sa fonction spécifique[47], c'est-à-dire, l'établissement d'un diagnostic fiable, basé sur l'identification aussi rapide que aisée des germes responsables d'IRA .

PREMIÈRE PARTIE

**Généralités sur les infections
respiratoires aiguës**

1 VOIES DE CONTAGION ET D'INFECTION

Elles sont classées en voies intra thoraciques, extra thoraciques, intra pulmonaires, et extra pulmonaires. On parle aussi de voies respiratoires supérieures pour désigner la région ORL, soit la partie des voies respiratoires située au-dessus du larynx.

On distingue ainsi les voies aériennes ou respiratoires supérieures et inférieures.

1.1 Voies aériennes supérieures ou extrathoraxiques [24,45, 67]

Elles sont constituées par : les fosses nasales, la gorge, le pharynx, l'épiglotte et le larynx.

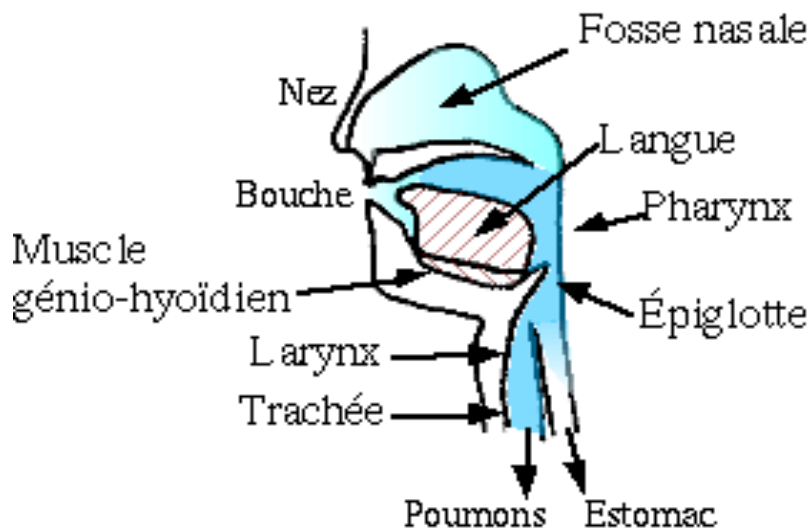


Figure 1: voies respiratoires supérieures [24]

1.1.1 Fosses nasales

Les fosses nasales sont deux cavités séparées par une cloison médiane. Elles s'ouvrent vers l'avant par les narines et vers l'arrière, dans le pharynx, par les choanes. Au niveau des narines, la cloison médiane est cartilagineuse. Les fosses nasales peuvent être le siège des agents responsables d'IRA. [8,67]

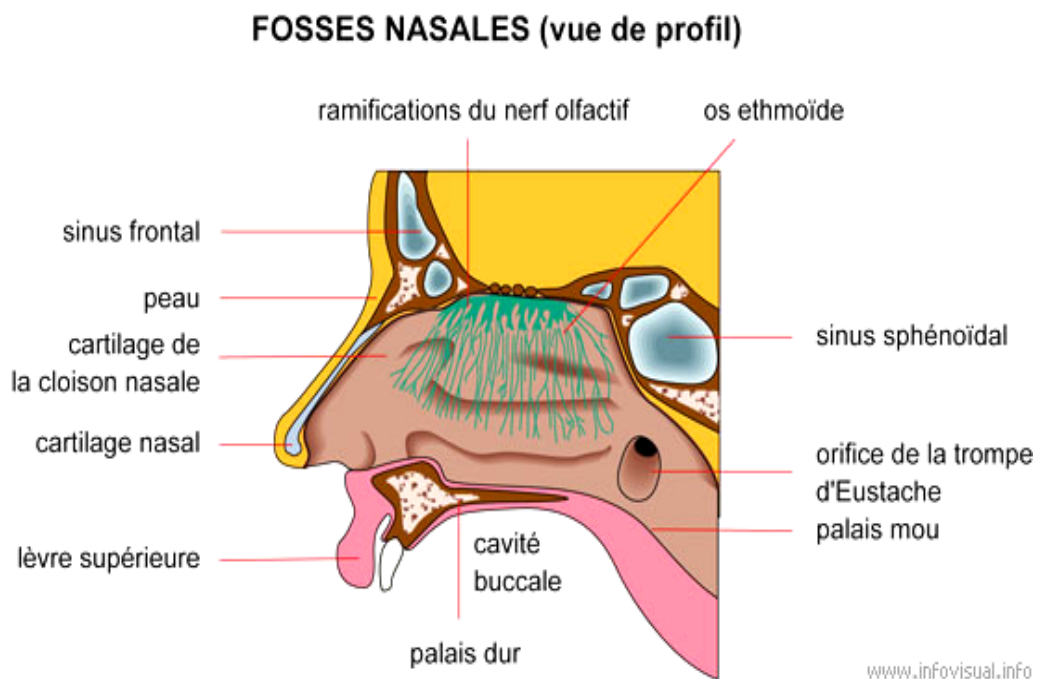


Figure 2: anatomie des fosses nasales [10]

1.1.2 Sinus [45]

Cavités aérifères creusées dans certains os de la tête, groupées autour du nez et des yeux et tapissées de la muqueuse nasale. Ils débouchent dans le nez par de petits orifices qui peuvent s'obstruer, augmentant ainsi le risque d'infection. Ils communiquent avec le haut de la gorge, donc peuvent s'infecter facilement.

1.1.3 Larynx (gorge)

Le larynx est un organe situé au niveau de la gorge. Il est situé après la jonction du pharynx. Il est l'intermédiaire entre le pharynx et la trachée et abrite nos cordes vocales.[8]

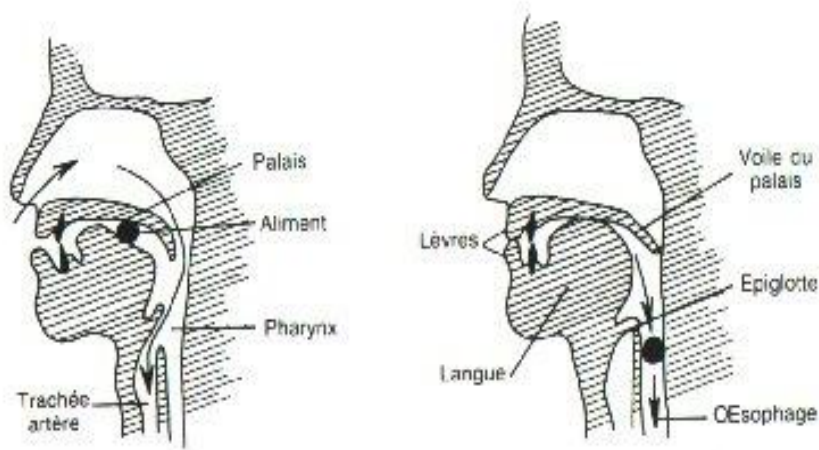


Figure 3 : pharynx et larynx [67]

1.1.4 Pharynx (carrefour aérodigestif)

Le **pharynx** est un carrefour musculo-membraneux entre les voies aériennes (de la cavité nasale au larynx) et les voies digestives (de la cavité orale ou bouche à l'œsophage). On rencontre également à son niveau l'ouverture de la trompe d'Eustache ou tube auditif, qui le met en communication avec l'oreille moyenne au niveau de la caisse du tympan. [8]

Il est donc subdivisé en 3 étages :

- nasopharynx ou rhinopharynx : au niveau de sa paroi supérieure se trouve les amygdales pharyngiennes, lieu de prédilection des angines
- oropharynx : il communique en haut avec le rhinopharynx et en bas avec le laryngopharynx.

- laryngopharynx : Il se place en arrière du larynx et se rétrécit en bas pour se continuer par l'œsophage. Il est limité en avant par l'épiglotte.

1.1.5 L'oreille

L'oreille habite à l'intérieur de l'un des os du crâne, le temporal ou, plus précisément, dans une partie trapue et tourmentée de cet os : la pyramide pétreuse ou rocher. On a coutume de décrire cet organe en trois parties : externe, moyenne, interne. Ces différentes parties définissent les principaux types d'otite. [62]

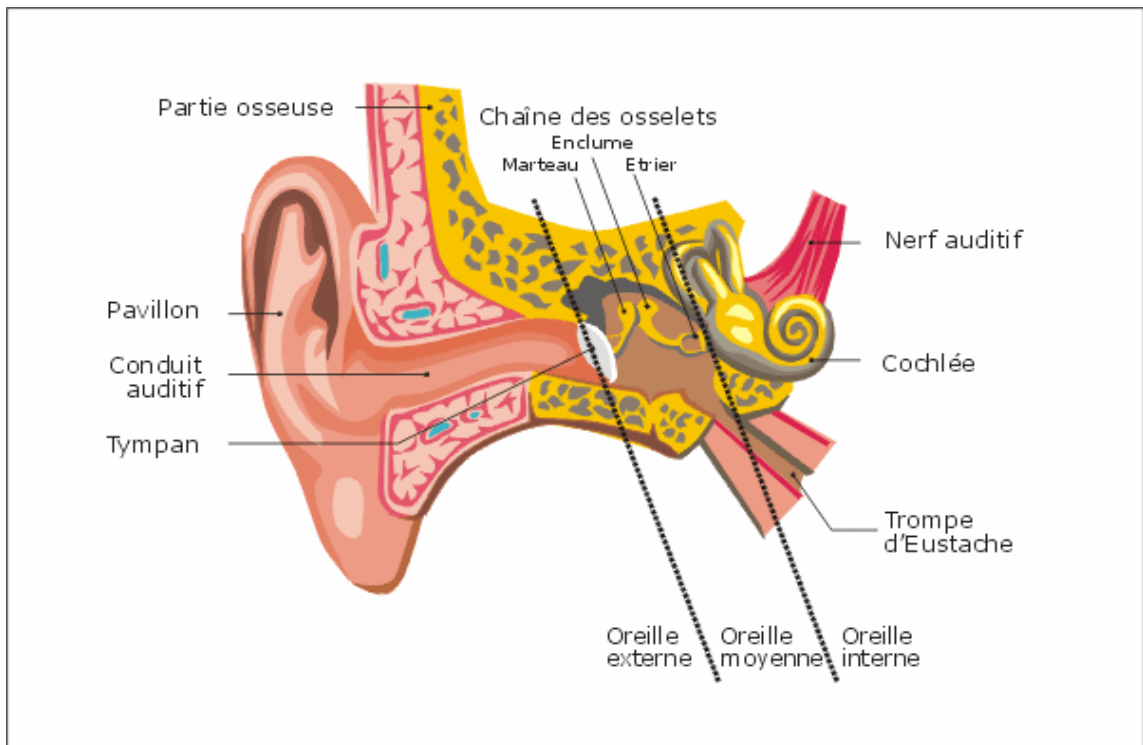


Figure 4 : anatomie de l'oreille [10]

Ø L'oreille externe : elle répond à la partie visible de l'organe, et comporte le pavillon bien sûr et le conduit auditif. [10]

Ø L'oreille moyenne : c'est une cavité remplie d'air. Elle a pour limite extérieure le tympan, membrane qui la sépare du conduit auditif externe. Vers l'avant se trouve la trompe d'Eustache qui fait communiquer l'oreille moyenne avec l'arrière-gorge. Elle est traversée par une chaîne d'osselets que sont : le marteau lié par son manche au tympan, l'enclume et, finalement, l'étrier. Elle est le siège de nombreux agents bactériens qui définissent l'otite moyenne aiguë [10]

Ø L'oreille interne : son anatomie est complexe. On la compare à un labyrinthe creusé dans l'os et garni d'un deuxième système membraneux

Ø et plus labyrinthe encore. [10] C'est par son biais que l'on diagnostique l'otite interne.

1.2 Voies aériennes inférieures ou intra thoraciques

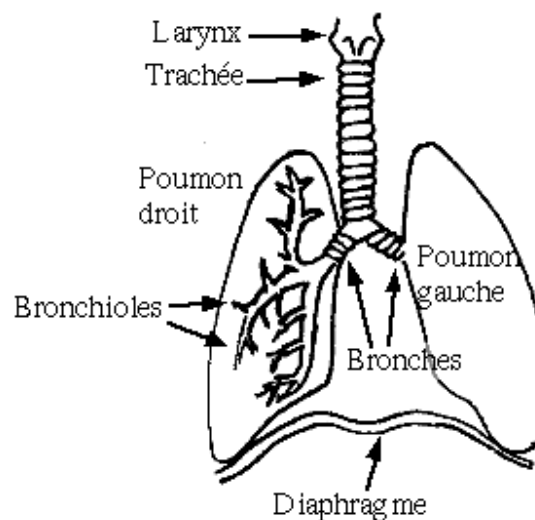


Figure 5: voies respiratoires inférieures [25]

On y distingue : la trachée , les bronches et bronchioles, le poumon.

1.2.1 Trachée

Conduit aérifère cartilagineux et membraneux interposé entre le larynx et les bronches principales.[8]

1.2.2 Bronches et bronchioles

Ce sont des canaux semi-rigides de l'appareil respiratoire situés entre la trachée et les alvéoles pulmonaires.[8]

1.2.3 Poumons [59]

Organes invaginés permettant d'échanger des gaz vitaux, dont l'infection est d'autant plus inquiétante lorsqu'il s'agit des jeunes enfants.

2 AFFECTIONS DES VOIES AERIENNES : DEFINITIONS ET ETIOLOGIES

2.1 Affections des voies aériennes supérieures

2.1.1 Angine [21, 45, 48]

C'est une inflammation microbienne ou virale des amygdales et du pharynx. concerne prioritairement l'enfant de plus de 2 ans et l'adulte de moins de 40 ans. La grande majorité des angines sont érythémateuses ou érythématopultacées. Les angines ulcéreuses et pseudomembraneuses sont beaucoup plus rares. Les angines érythémateuses et érythématopultacées sont causées par le streptocoque A dans 15 à 25 % des cas chez l'adulte et dans 25 à 50 % des cas chez l'enfant, notamment à l'occasion de phénomènes épidémiques. Les autres espèces bactériennes n'occupent pas de place quantitativement significative dans l'étiologie des angines. Plus de la moitié des angines sont d'étiologie virale.

2.1.2 Otite [16, 45, 48, 52]

Il s'agit presque toujours de la surinfection bactérienne d'une infection virale dont le point de départ est le rhinopharynx. C'est surtout une pathologie pédiatrique

consécutives aux très nombreuses infections rhino-pharyngées de l'enfant, beaucoup moins fréquent à partir de 6 –7 ans. L'otite peut s'observer très tôt, dès les premières semaines de la vie. Elle atteint 20% des enfants au moins une fois par an.

Les germes les plus fréquents sont : *Streptococcus pneumoniae* et/ou *Haemophilus influenzae* dans 90% des cas, *Moraxella catarrhalis* (10%), rarement *Streptococcus pyogenes*.

L'otite moyenne aiguë (OMA) est la première cause de prescription d'antibiotiques chez l'enfant de moins de 15 ans, soit 2,5 millions de prescriptions par an en France.

2.1.3 Sinusite [33,38,45]

C'est une inflammation des sinus des joues et du front. Elle fait généralement suite à la rhinopharyngite. Elle n'atteint pas l'enfant avant l'âge de 5 ans, de ce fait, est rare chez les bébés, dont les sinus ne sont pas encore totalement formés. Les agents bactériens sont les mêmes que dans l'otite.

2.1.4 Laryngite et épiglottite [37, 45]

C'est une inflammation du larynx pouvant siéger à l'étage sous-glottique, sus-glottique ou au niveau de l'orifice glottique. De nombreux virus, et parfois bactéries, peuvent pénétrer dans le corps par la gorge et infecter rapidement le larynx.

2.2 Affections des voies aériennes inférieures

2.2.1 Bronchite aiguë [9]

C'est une inflammation de l'arbre trachéo-bronchite, le plus souvent d'origine virale, plus rarement bactérienne, parfois virale secondairement surinfectée par une bactérie. Des bactéries peuvent être en cause, notamment :

Chlamydia pneumoniae, *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis* sont les germes des poussées de surinfection.

2.2.2 Bronchiolite aiguë [9]

C'est une inflammation des bronchioles. Elle est fréquente chez le nourrisson, entre 1 et 9 mois. Elle est due dans 80 % des cas au virus respiratoire syncytial (VRS).

2.2.3 Pneumonie aiguë [3, 9,52,64]

Considérée comme une affection localisée du parenchyme pulmonaire d'origine inflammatoire, elle est la cause la plus fréquente de décès par IRA dans les PVD (pays en voie de développement) où elles constituent un véritable problème de santé publique.[3,64] Elle est dite communautaire si elle est acquise en milieu extrahospitalier ou si, à l'hôpital, elle survient au cours des 48 premières heures du séjour. Au delà, on parle de pneumonie nosocomiale.[52] Dans bon nombre de cas, elle est d'origine mixte, virale et bactérienne, la combinaison la plus fréquente étant l'infection à VRS et pneumocoque.[9]

3 DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

Les IRA peuvent représenter jusqu'à 30% des consultations d'urgence en pédiatrie générale.[2] Elles ont un impact socio-économique très important en ce qu'elles constituent les causes les plus courantes d'absence professionnelle et représentent aussi une majeure partie des frais médicaux et pharmaceutiques.[2]

3.1 Morbidités et mortalités dues aux IRA [9]

Le nombre de décès dû aux IRA chez les enfants de moins de 5 ans dans le monde est estimé actuellement à 1 900 000 / an. Les IRA sont les infections les plus fréquentes de l'enfant. Elles sont la cause de 30 à 40% des hospitalisations d'enfants,

les pneumonies et broncho-pneumonies représentant 70 à 80% des admissions pour IRA.

3.2 Facteurs favorisant l'aggravation des IRA [9]

Un risque accru d'IRA est associé à :

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

3.3 Transmission [9]

Les IRA sont transmises par contact direct avec les sécrétions respiratoires des malades et porteurs sains.

4 PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE

Les infections respiratoires bactériennes et les surinfections bactériennes des maladies virales relèvent d'une antibiothérapie. L'amoxicilline, l'amoxicilline-acide clavulanique et les céphalosporines restent le traitement de première intention. Une

autre possibilité est celle des macrolides et du cotrimoxazole. Toutefois, leurs taux de résistance sont particulièrement élevés pour les pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP). Les phénicolés peuvent être une alternative d'autant que leur spectre englobe d'autres bactéries responsables d'IRA (*M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, certaines entérobactéries et des anaérobies non sporulés). Les macrolides (érythromycine) sont prescrits dans les pneumonies atypiques et les légionelloses.[9]

5 GERMES MAJEURS RESPONSABLES D'IRA [12,22,26,34,36,65, 66]

Ø Principaux virus en cause :

Les infections respiratoires virales représentent environ 80% des causes d'infections respiratoires. La gravité d'une infection virale est fonction du virus respiratoire et d'une susceptibilité individuelle des agents de surinfection. Le tableau ci-dessous met en évidence les principaux virus responsables d'IRA.

Tableau I: Principaux virus responsables d'IRA [9]

Syndromes viraux respiratoires	Principaux virus en cause
Rhinopharyngite	<i>Rhinovirus, coronavirus, VRS, virus influenza A et B, virus. Parainfluenza</i>
Angine	<i>Adénovirus, entérovirus, rhinovirus</i>
Laryngotracheite	<i>Virus parainfluenza, VRS</i>
Bronchiolite	<i>VRS</i>
Pneumonie	<i>VRS, virus influenza, virus parainfluenza, adénovirus</i>

Ø Principales bactéries en cause:

Les bactéries sont surtout les agents de surinfection.

Tableau II: Principales bactéries responsables d'IRA [9]

Syndromes bactériens respiratoires	Principales bactéries en cause
Angine	<i>Streptocoque b hémolytique du groupe A (ASA)</i> <i>Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis</i>
Otite moyenne aiguë	<i>Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae,</i> <i>Moraxella catarrhalis</i>
Epiglottite	<i>Haemophilus influenzae type b</i>
Bronchite	<i>Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae,</i> <i>Bordetella pertussis,</i> <i>S. pneumoniae, H. influenzae, M. catarrhalis,</i>
Pneumonie	<i>S. pneumoniae, H influenzae, C. pneumoniae,</i> <i>M. pneumoniae, Legionella pneumophila</i>

5.1 Streptococcus pneumoniae [26]

Streptococcus pneumoniae appartient à la famille des *Streptococcaceae* comportant les genres *Streptococcus* et *Enterococcus*, les plus fréquemment rencontrés en médecine humaine.

5.1.1 Caractères bactériologiques [26,27]

C'est un germe commensal de l'oropharynx chez l'homme, se présentant sous

forme de diplocoque Gram positif lancéolé. Sa culture est délicate en raison de sa tendance à la lyse spontanée et exige des milieux nutritifs enrichis comme la gélose au sang de mouton. L'addition de gentamicine rend le milieu sélectif au pneumocoque.

Les colonies apparaissent petites, rondes, de 0,1 à 1,5 mm de diamètre, développent une hémolyse alpha avec verdissement du milieu.

Il peut être responsable de sinusite, d'otite, pneumonies, septicémie, méningite, péritonite.

5.1.2 Pathologies associées aux pneumocoques [36]:

Ø Les pneumonies : elles surviennent dans la grande majorité des cas après inhalation des bactéries. Elles s'accompagnent de lésions tissulaires très importantes liées à la réponse inflammatoire dépendante des polynucléaires.

Ø Les bactériémies et septicémies : elles sont souvent associées à des lésions tissulaires, en particulier pulmonaires. Cependant, elles peuvent exister en l'absence d'un foyer cliniquement patent. Elles sont toujours d'un mauvais facteur pronostic.

Ø Les bronchites suppurées.

Ø Les méningites : elles sont mortelles dans 10 à 30% des cas.

Ø Les infections ORL : ce sont les otites et sinusites de gravité et d'évolution diverses en fonction de l'âge et du terrain.

Ø Les autres localisations :

- péritonites primitives ou favorisées par le port d'un dispositif intra-utérin
- endocardites, péricardites et arthrites.

5.2 Streptococcus pyogenes [31,36]

Encore appelé Streptocoque bêta-hémolytique du groupe A, appartient à la famille des *Streptococcaceae*. *Streptococcus pyogenes* est un commensal des

muqueuses nasale et pharyngée. Il est en effet retrouvé à l'état de simple portage chez 15 à 25% des enfants et moins fréquemment chez l'adulte.

5.2.1 Caractères bactériologiques [26, 32, 63]

Ce germe se présente sous forme de cocci Gram positif disposés en chaînettes courtes ou longues. *Streptococcus pyogenes* donne sur gélose au sang ordinaire des colonies grisâtres, de 0,5 à 1 mm, lisses, bombées ou convexes entourées d'une zone d'hémolyse totale de type bêta. C'est un streptocoque bêta-hémolytique.

5.2.2 Pathologies associées [36]

Ø Infections de la sphère ORL : otites, sinusites, angines streptococciques ;

Ø Infections et suppurations cutanées :

- cellulites ;
- surinfections cutanées sur plaies ou brûlures ;
- gangrène sous-cutanée streptococcique ou syndrome de MELENEY : infection extensive avec nécrose atteignant le tissu cellulaire sous-cutané (bactéries "mangeuses de chair") avec une mortalité de 50% ;
- la scarlatine provoquée par les souches productrices de toxine érythrogène ;
- érysipèle survenant chez les nourrissons ou les personnes âgées ;
- Impétigo streptococcique fréquent chez l'enfant, surtout dans le tiers-monde

Ø Autres infections locales ou générales

- surinfections d'atteinte broncho-pulmonaires d'origine virale ;
- endométrites streptococciques survenant après un accouchement ou un avortement septiques ;

- infections profondes rares mais graves : endocardites, pneumopathies, arthrites, méningites, péritonites, avec souvent bactériémies ;
- choc toxique streptococcique souvent dû au sérotype M1 et provoqué par la libération de toxines érythrogènes.

Ø Syndromes post-streptococciques

Ce sont des complications non suppurées à pathogénie de certaines infections à *Streptococcus pyogenes*. On distingue :

- le rhumatisme articulaire aigu (RAA) avec atteintes articulaire, cutanée et surtout cardiaque ;
- la glomérulonéphrite aiguë (GNA) de pronostic souvent favorable ;
- la chorée de Sydenham (danse de Saint-Guy) parfois associée à des atteintes rhumatismale et cardiaque ;
- l'érythème noueux et le purpura rhumatoïde peuvent relever d'une étiologie streptococcique.

5.3 Haemophilus influenzae

Cette espèce appartient au genre Haemophilus, à la famille des *Pasteurellaceae*. *Haemophilus influenzae* est un commensal des voies aériennes supérieures. Ainsi, 50% des enfants sont porteurs de cette bactérie dans leur naso-pharynx..[34]

5.3.1 Caractères bactériologiques [52]

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

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

5.3.2 Pathologies associées [34, 47]

Ø Infections respiratoires :

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

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

Ø Méningites :

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

5.4 Moraxella catarrhalis [51]

C'est une espèce commensale de la flore oropharyngée de la famille des *Moraxellaceae*. Le taux de portage faible chez l'adulte (3 à 4 %) est beaucoup plus élevé chez l'enfant, tout particulièrement l'enfant de moins de 2 ans, où il peut passer de 9 à 40% en fonction des saisons.

5.4.1 Caractères bactériologiques [65]

Cette espèce apparaît comme étant un diplocoque à Gram négatif, avec une morphologie identique à celle des Neisseria.

5.4.2 Pathologies associées [65]

Le pouvoir pathogène de *M. catarrhalis* est actuellement assez mal connu. Son rôle est montré dans :

Ø Les infections broncho-pulmonaires : surtout chez les personnes âgées, avec une insuffisance respiratoire ou cardiaque gauche, chez les prématurés, patients immunodéprimés. Le pronostic est en général favorable. Les rares cas de décès survenus dans le cadre d'une pneumopathie à *M.catarrhalis* sont le plus souvent imputables à une pathologie sous-jacente.

Ø Les infections ORL de l'enfant : otite moyenne, sinusite, rhinopharyngite

Ø Les septicémies, endocardites et méningites (exceptionnelles)

5.5 Staphylocoques

Appartenant à la famille des *Micrococcaceae* au sein de laquelle une espèce, *Staphylococcus aureus* (staphylocoque doré) occupe une place non négligeable dans les infections respiratoires aiguës. Cette espèce fait partie de la flore normale de nombreux individus qui sont des « porteurs asymptomatiques ». Les Staphylocoques sont retrouvés au niveau des fosses nasales antérieures.[31,63]

5.5.1 Caractères bactériologiques [63]

Staphylococcus aureus est un cocci Gram positif qui tend à se grouper en amas.

La bactérie doit son nom à l'aspect pigmenté de ses colonies.

5.5.2 Pathologies associées [36]

Ø Staphylococcies cutanées, sous-cutanées et muqueuses

Staphylococcus aureus peut être à l'origine d'infections cutanées superficielles (impétigo, onyxis ou folliculite) ou profonde (furoncle); Syndrome de Lyell staphylococcique. Au niveau des muqueuses, il est peut être impliqué dans les phlegmons de l'amygdale, des sinusites ou des otites parfois récidivantes

Ø Localisations viscérales à *S. aureus*

Staphylococcus aureus peut être responsable de staphylococcies osseuses, pleuro pulmonaires, urogénitale, neuroméningées, d'endocardite staphylococcique

Ø Septicémie

5.6 Légionella pneumophila [16,65]

C'est une bactérie d'origine hydro tellurique, présente à l'état naturel dans les eaux douces et sols humides.

5.6.1 Caractères bactériologiques [65]

Les légionelles sont des bacilles à Gram négatif, formant une famille de 46 espèces et 64 sérogroupes. *L. pneumophila* est l'espèce la plus importante en pathologie humaine.

5.6.2 Pathologies associées [65]

Les infections humaines sont généralement dues à *L. pneumophila* séro groupe 1 dans plus de 80 % des cas, les autres espèces étant plus rarement en cause.

La légionellose ou maladies des légionnaires :

Se traduit habituellement par une pneumopathie aiguë de sévérité variable.

La fièvre du Pontiac

C'est une atteinte bénigne des voies aériennes supérieures, se présentant sous forme de syndrome pseudogrippal.

5.7 Chlamydia pneumoniae [51, 52]

C'est une bactérie intracellulaire obligatoire à Gram négatif, de la famille des *Chlamydiaceae*, spécifiquement humaine qui se transmet par voie aérienne.

Il provoque diverses infections respiratoires le plus souvent bénignes, notamment, des infections broncho-pulmonaires, sinusites.

5.8 Mycoplasma pneumoniae [47,52]

C'est une bactérie de la famille des *Mycoplasmataceae*, qui a la particularité d'être dépourvue de paroi et d'être non colorable par la méthode de Gram. Elle colonise la muqueuse des voies respiratoires.

Elle est responsable de pharyngite, bronchite ou plus rarement de pneumonie atypique ; peut provoquer des pneumonies graves chez les sujets immunodéprimés ou âgés.

6 DEMARCHE DU DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE [18,27,39]

Le diagnostic microbiologique a pour objet l'identification de l'agent bactérien ou viral responsable d'un processus infectieux. Pour satisfaire aux besoins du clinicien qui a en charge le malade, il faut en plus que cette identification soit faite rapidement et d'une manière précise.[39] Enfin, elle doit être complétée aussi vite que possible par des données sur la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques.[27]

Une des lois primordiales du laboratoire de microbiologie clinique doit donc être la rapidité. Une autre loi, aussi primordiale dans le fond mais secondaire dans le temps, est la précision. Mais il faut que les caractères morphologiques, culturels, biochimiques, antigéniques qui sont assemblés pour chaque souche bactérienne ou virale permettent de situer l'agent microbien dans la classification microbienne moderne et de lui attribuer un nom précis. [39]

Finalement, il faut rappeler que le diagnostic microbiologique ne repose pas uniquement sur une identification directe de l'agent microbien. Il peut reposer sur une identification indirecte : l'agent microbien n'est pas lui-même isolé mais il est caractérisé par les réactions immunologiques spécifiques que sa présence a suscité dans l'organisme. C'est le sérodiagnostic dont on sait qu'il joue un rôle important dans le diagnostic des maladies infectieuses

6.1 Diagnostic microbiologique direct

Le diagnostic microbiologique direct est l'aboutissement d'une suite d'étapes qui sont le prélèvement, sa conservation et son enregistrement au laboratoire, l'examen microscopique direct d'un frottis du prélèvement et l'isolement proprement dit qui comporte le choix des milieux, la méthode à appliquer et la mise à l'étuve,

l'identification des colonies isolées et finalement la mesure de la sensibilité aux antibiotiques.[39]

6.1.1 Prélèvement [39]

Les prélèvements doivent être entrepris stérilement et placés dans des récipients stériles, généralement des écouvillons contenant un peu d'eau distillée stérile et serviront pour l'examen microscopique et la culture. Enfin, on raccourcira au maximum le délai entre le moment où le prélèvement est fait et celui où il est examiné.

6.1.2 Transport et enregistrement du prélèvement au laboratoire [39]

a)- Lorsque le prélèvement n'est pas fait au sein du laboratoire, l'organisation de son transport sans délai au laboratoire est capitale bien qu'elle ne dépende souvent ni de celui qui a fait le prélèvement ni du laboratoire qui le reçoit.

b)- L'emploi d'un récipient suffisamment solide et bien bouché est nécessaire pour que le produit pathologique ne puisse s'échapper et contaminer les personnes qui vont le transporter.

c)- Les milieux de transport malgré leur coût, doivent être employés chaque fois que le délai entre le prélèvement et l'ensemencement est trop long.

d)- L'étiquetage des prélèvements doit être effectué, ainsi que les renseignements cliniques.

e)- Enfin le prélèvement doit être enregistré au laboratoire.

6.1.3 Isolement de la bactérie [39]

L'isolement, plus précisément le primo isolement ou la primo culture de la bactérie responsable, est un temps essentiel du diagnostic microbiologique. Il nécessite, outre un prélèvement fait correctement, porté et examiné sans délai au laboratoire :

- a)- un examen microscopique préalable d'orientation, qui permet par la coloration au Gram, de déterminer l'aspect de la flore bactérienne du point de vue quantitatif, par le dénombrement par champ des éléments s'y trouvant : cellules épithéliales, polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, lymphocytes. Du point de vu qualitatif, ces mêmes éléments s'évaluent en terme de pourcentage. En outre, la présence éventuelle de champignons ou de levure doit être mentionnée.
- b)- le choix des milieux de culture à ensemercer, qui dépend de l'exigence ou non du germe suspect. Ainsi, des milieux sélectifs peuvent être utilisés lorsque l'isolement d'un seul germe est recherché.
- c)- une méthode d'ensemencement standardisée ayant pour objectif d'obtenir des colonies isolées,
- d)- une incubation dans des conditions favorables à la croissance des bactéries recherchées.

6.1.4 Identification de la bactérie

Seule la présence de colonies isolées sur milieu de culture solide permet, en pratique, de mener à bien le diagnostic bactériologique.

Le premier temps est celui de l'examen des milieux de cultures ensemencés. Il est recommandé de faire systématiquement un premier examen après 15 à 18 heures d'incubation. Cette manière de faire se justifie par le fait que la plupart des cultures sont positives après ce délai.[35] Sur ces milieux de culture, on note l'aspect des colonies, leur densité en UFC/ml, la couleur, la taille et le type d'hémolyse. La description de ces éléments oriente dans le diagnostic.

Pour compléter l'identification de la bactérie, on utilise de façon complémentaire ses caractères biochimiques

6.2 Le diagnostic bactériologique indirect [18]

Le sérodiagnostic d'une infection bactérienne consiste à mettre en évidence les anticorps sériques spécifiques de l'agent pathogène et engendrés par le conflit immunologique qui se produit lors de la maladie. Il permet donc le diagnostic indirect d'une infection, le diagnostic direct reposant sur l'isolement de la bactérie. Dans certains cas, le sérodiagnostic est seul préconisé :

- a)- Si le germe responsable ne peut pousser sur le milieu de culture
- b)- S'il est très difficile ou impossible à isoler à cause de son gîte ou de sa présence éphémère dans les produits pathologiques
- c)- S'il a été détruit par un traitement antibiotique institué préalablement aux prélèvements bactériologiques.
- d)- S'il s'agit de rechercher rétrospectivement à la phase de convalescence, l'étiologie d'une maladie infectieuse récente.

Enfin, on peut rattacher au diagnostic microbiologique indirect la détection immunochimique des antigènes bactériens. Les méthodes disponibles pour cette détection sont la contre-immunoelectrophorèse, la congutination, l'agglutination de particules de latex, la méthode ELISA et la méthode radio-immunologique. Les avantages de ces méthodes sont la rapidité, la sensibilité et la possibilité de détecter des antigènes solubles dans les liquides organiques lorsque la culture ou la coloration de Gram sont négatives.[39]

6.3 Tests de sensibilité utiles au traitement antibiotique

La sensibilité d'une bactérie est mesurée par la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'antibiotique considéré. C'est la méthode de référence préconisée par l'OMS. Cette CMI est la plus petite quantité d'antibiotique capable d'inhiber une croissance bactérienne visible à l'œil nu.[39]

7 NOTIONS D'ALGORITHME ET DE VALIDATION : DEFINITIONS ET PARAMETRES

7.1 Algorithme

Un algorithme est une méthode de résolution de problème énoncé sous la forme d'une série d'opérations à effectuer.

D'après l'Encyclopédie universelle , c'est une suite finie de règles à appliquer dans un ordre déterminé à un nombre fini de données, pour arriver, en un nombre fini d'étapes, à un résultat et cela quelles que soient les données à traiter.[29]

Pour une tâche donnée, c'est donc la décomposition de cette tâche en une séquence finie d'étapes élémentaires permettant de la réaliser. Les algorithmes sont exprimés dans un langage pouvant spécifier :

- § les données à traiter, leur nombre et nature
- § les pré conditions, post conditions qui doivent vérifier ces données.
- § Le comportement qu'il doit avoir si on lui fournit des données incorrectes.

L'algorithme nous permet donc de suivre dans un ordre bien établi, étape par étape, la démarche entreprise dans le diagnostic des IRA depuis le prélèvement jusqu'à l'isolement du germe et son profil de sensibilité.

7.2 Validation [44,47]

D'après la norme ISO 9000, la validation est la confirmation par des preuves tangibles que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévues ont été satisfaites.[47]

Les algorithmes doivent être validés pour démontrer que la démarche choisie pour le diagnostic d'IRA correspond bien à, l'usage pour lequel elle est prévue.

Le travail de validation doit 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. Elle doit suivre un plan qui inclut la portée même de la démarche, ses caractéristiques et les limites de la validité. [47]

La validation de méthode microbiologique revêt une importance toute particulière en microbiologie. En effet, elle s'impose d'autant plus qu'elle porte sur des méthodes dont la variabilité est très grande. Cette variabilité 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 principes de détection et de dénombrement de microorganismes par des techniques conventionnelles qui impliquent l'utilisation de substances biologiques variables en elles-mêmes, tels que les milieux de culture ou les réactifs biochimiques. [44]

Dans le cadre des IRA, la validation doit être faite à chaque étape du diagnostic microbiologique, depuis le prélèvement et les conditions dans lesquelles il doit être entrepris, la macroscopie, la microscopie incluant le dénombrement des éléments identifiés, la culture où l'on doit pouvoir effectuer le contrôle qualité du matériel c'est-à-dire les appareils utilisés pour la collecte, la préparation et l'entreposage des échantillons.

7.3 Procédures et paramètres de validation

7.3.1 Procédures [41,53, 58]

Le procédé pour une méthode de validation doit démontrer qu'elle est prête à l'usage. Elle doit suivre un plan qui inclut de la méthode, ses caractéristiques et performances, et ses limites d'acceptation.[41] Elle doit être générée par des conditions expérimentales et complétée par des données statistiques.

La validation de l'identification des souches passe par le calcul des probabilités. Des tables diagnostiques contiennent pour chaque espèce, la probabilité de positivité (f) aux différents tests. Si la réponse de la souche pour un test est positive, on retient la valeur f ; si elle est négative, on retient la valeur 1-f (probabilité de négativité).

[58,63]

Ainsi, on définit :

- La probabilité absolue qui est le produit des valeurs donnant la fréquence théorique de la souche.
- La probabilité relative ou la probabilité d'appartenance à l'espèce qui est le rapport de fréquence théorique sur la somme des fréquences théoriques pour chacune des souches soumises à la comparaison.

Probabilité absolue = f x (1 - f) x ...

= produit des valeurs obtenues pour chaque espèce.

Probabilité relative = $\frac{\text{Probabilité absolue}}{\text{Somme des probabilités absolues}} \times 100$

7.3.2 Paramètres [17,32,41,53]

Les paramètres des méthodes de validation ont été définis dans différents groupes de travail des comités nationaux et internationaux, et sont décrits dans la littérature. Ceux qui se rattachent à la validation des algorithmes de diagnostic sont les suivants :

- La répétabilité
- La reproductibilité

Ø La 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 définir ce paramètre, il faut au préalable calculer la moyenne et la variance entre chaque essai, en utilisant les formules contenues dans l'encadré ci-dessous :

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

\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

Ø La reproductibilité

C'est l'expression de la variabilité inter laboratoire. En d'autres termes, contrairement à la répétabilité, c'est la précision d'une méthode appliquée généralement dans des laboratoires différents, à des échantillons distincts, et effectuée par différents opérateurs.



DEUXIÈME PARTIE

Travail Expérimental

1 CADRE ET POPULATION D'ETUDE

1.1 Cadre d'étude

Le travail a été effectué à l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec de Dakar durant la période allant de Septembre 2005 à Mars 2006.

1.2 Population d'étude

Elle a été constituée par les patients recrutés dans les structures suivantes :

HALD (ORL, Pédiatrie)

Fann (Maladie Infectieuse)

HPD (Pneumologie)

Cabinets privés...

Les patients présentant l'une des affections ci-dessous ont été inclus dans l'étude :

§ infections respiratoires hautes (sinusites, otites moyennes aiguës et rhino-pharyngites, angine),

§ infections respiratoires basses (pneumonies communautaires, bronchites aiguës).

Ainsi, différents produits pathologiques ont été recueillis :

§ sécrétions rhino-pharyngées

§ pus de l'oreille moyenne ;

§ prélèvements de gorge ;

§ pus de sinusites ;

§ pus divers (abcès, plaies).

1.3 Souches bactériennes

Elles comportent les souches de référence et les souches à tester

1.3.1 Souches de référence :

- *Streptococcus pyogenes* : ATCC 29212
- *Escherichia coli* : ATCC 25922
- *Streptococcus pneumoniae* : ATCC 49619
- *Haemophilus influenzae* : ATCC 49227
- *Moraxella catarrhalis* : ATCC 49247

1.3.2 Souches à tester :

Ce sont les souches isolées responsables d'infections respiratoires hautes (otite, sinusite, angine, pharyngites et laryngites..) et basses (bronchites, pneumonies aiguës et communautaires) :

Pharyngites :

- *Streptococcus pyogenes*
- *Mycoplasma pneumoniae*

Otites et mastoïdites

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- Enterobacteries
- *Haemophilus influenzae*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Mycoplasma pneumoniae*

Sinusites

- *Streptococcus pneumoniae*
- *H. influenzae*

- *S. aureus*
- *M. catarrhalis* (surtout chez l'enfant)
- Bacilles à Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*, *Proteus mirabilis*

Laryngite

- *S. pyogenes*
- *H. influenzae*
- *S. aureus*
- *M. catarrhalis*
- *Streptococcus Sp*

Bronchite

- *H. influenzae*
- *S. pneumoniae*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Streptococcus. Sp.*
- *M. catarrhalis*
- *S. aureus*
- Bacilles à Gram négatif

Pneumonies aiguës

- *S. pneumoniae*
- *H. influenzae*
- *S. aureus*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Enterobacter aerogenes*
- *Streptococcus Sp*
- Légionelles

- Entérobactéries
- *Pseudomonas aeruginosa*

2 MATERIELS ET METHODES

2.1 Matériels et réactifs

Le matériel utilisé est constitué par :

2.1.1 Matériel de prélèvement

- Écouvillons stériles
- Tubes à hémolyse
- Seringues
- Eau physiologique
- Glacière
- Réfrigérant

2.1.2 Matériel d'isolement

- Anse de platine
- Boîtes de Pétri
- Bec Bunsen
- Gélose Müller-Hinton (MH)
- Gélose trypticase-soja
- Sang de mouton
- Sang de cheval
- Gentamicine
- Bacitracine
- Polyvitex
- Acide nalixidique

- Jarre d'incubation
- Générateur de CO₂ ou bougie
- Etuve à 37°C
- Autoclave

2.1.3 Matériel pour l'identification

- Lames porte-objet
- Microscope optique
- Pipettes Pasteur
- Peroxyde d'hydrogène 3%
- Bâtonnets
- Disques d'optochine
- Desoxycholate de sodium 10%
- Slidex pneumo kit
- Disques de Bacitracine
- Slidex StreptoA
- Api NH
- Extrait d'hémine chlorydrate à 200 µg/ml
- Galerie Micro CSB

2.1.4 Matériel pour antibiogramme

2.1.4.1 Matériel pour la détection de la production de bêta-lactamase (méthode à la cefinase)

- Pipette Pasteur
- Disques de Nitrocéfine
- Eau physiologique
- Lame porte-objet
- Pince

2.1.4.2 Matériel pour l'évaluation de la sensibilité

- Disques d'antibiotique
- Solvants et diluants appropriés selon l'antibiotique
- Poudre d'antibiotique
- Pincés
- Bandelettes E-test
- Boîtes de Pétri
- Gélose Columbia sans ou avec sang cuit
- Gélose Müller-Hinton
- Sang de cheval
- Polyvitex
- Eau physiologique
- Eau distillée stérile
- Pipettes graduées
- Tubes Mac Farland 0,5

2.1.5 Matériel de conservation des souches

- Cryotubes
- Bouillon cœur-cervelle
- Glycérol
- GSC en tube ou en pente
- Lait écrémé

2.1.6 Matériel d'exploitation des résultats

Les logiciels WHONET V.III et le FileMaker Pro ont été utilisés pour l'exploitation des résultats et le logiciel Excel pour les calculs de probabilité et de variance.

2.2 Méthodologie

2.2.1 Souches étudiées

L'évaluation a porté sur les souches isolées des services de l'hôpital Aristide Le Dantec (ORL, Pédiatrie), du service de pneumologie à Fann et cabinets privés , et testées par des méthodes conventionnelles. Les nombreuses souches de différentes familles de bactéries ayant été identifiées, les espèces soumises à notre étude ont été :

Streptococcus pneumoniae

Streptococcus pyogenes

Haemophilus influenzae

Proteus mirabilis

Enterobacter cloacae

Klebsiella pneumoniae

2.2.2 Algorithme d'identification

Nous nous sommes attelés à suivre la démarche établie dans ces algorithmes :

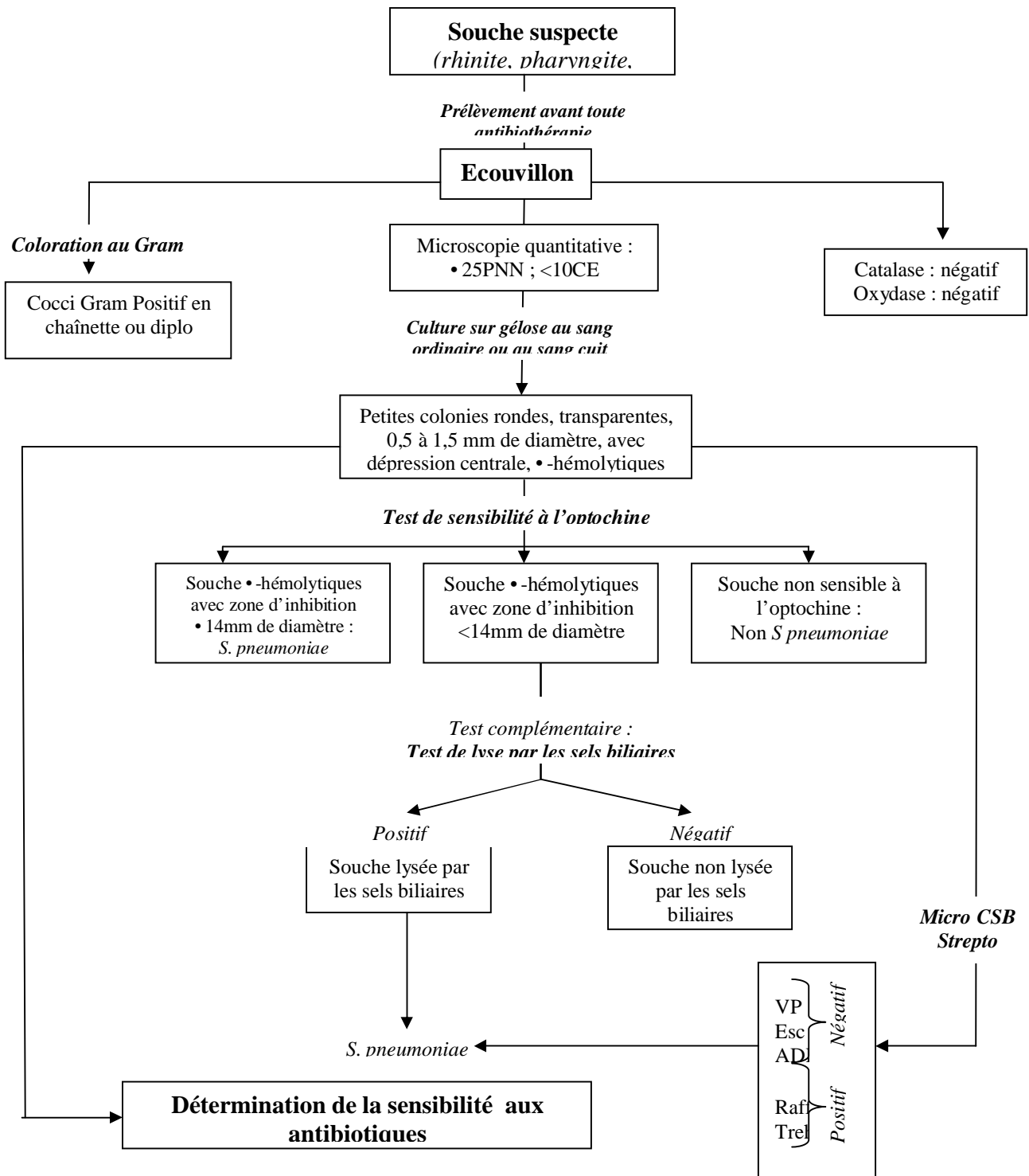


Figure 6 : Algorithme d'identification de Streptococcus pneumoniae

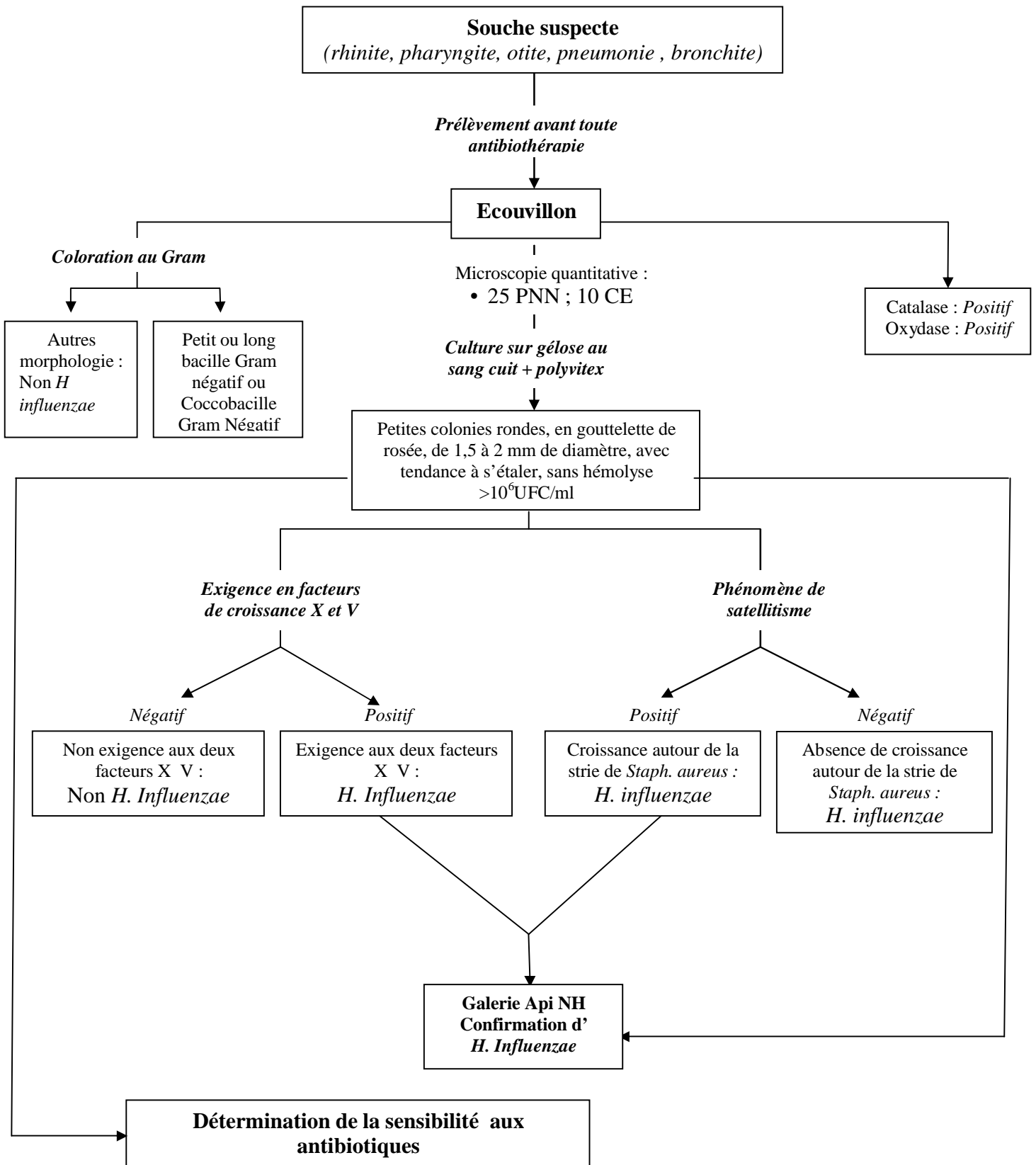


Figure 7 : Algorithme 'identification de Streptococcus pyogenes

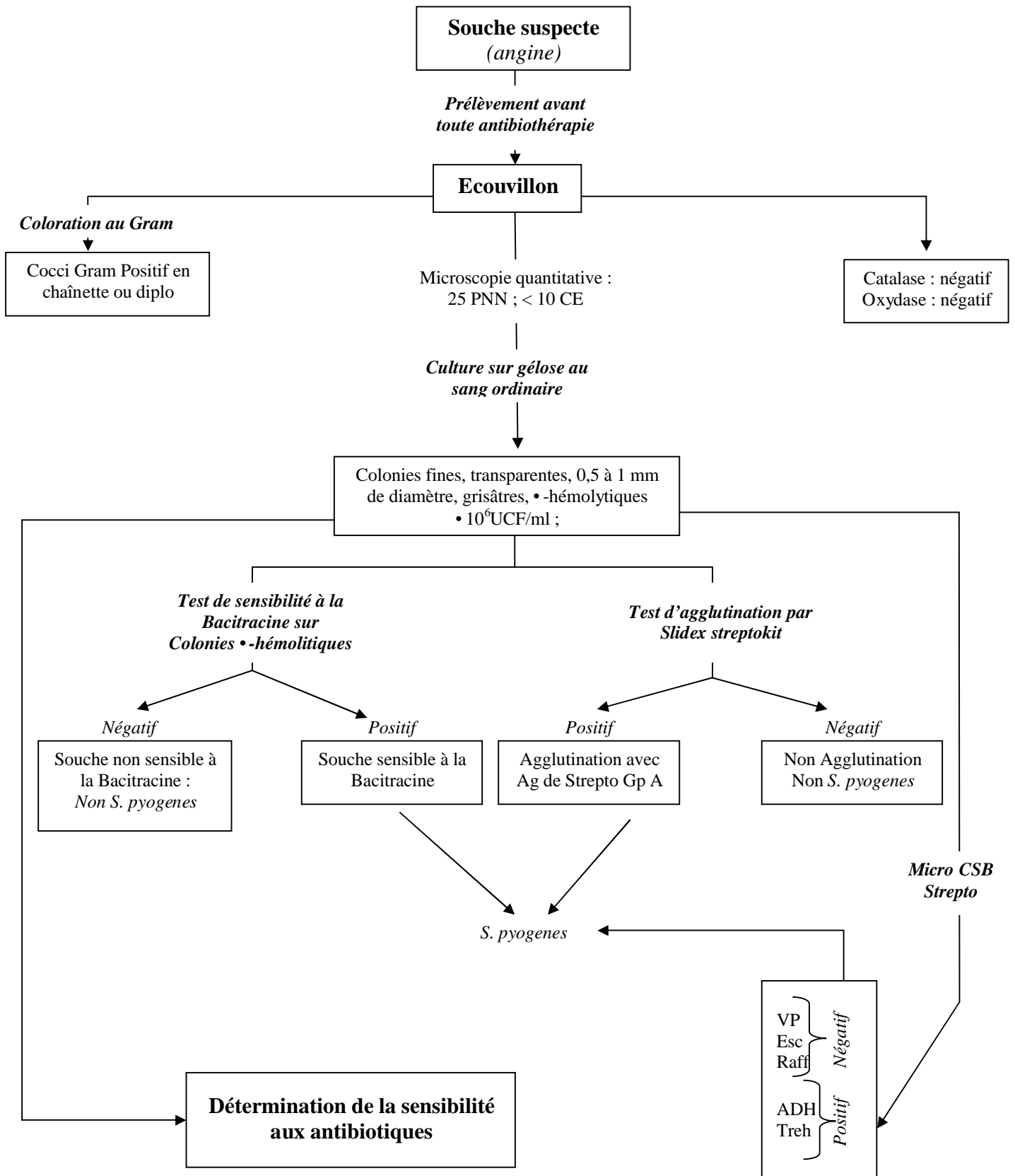


Figure 8 : Algorithme d'identification d'*Haemophilus influenzae*

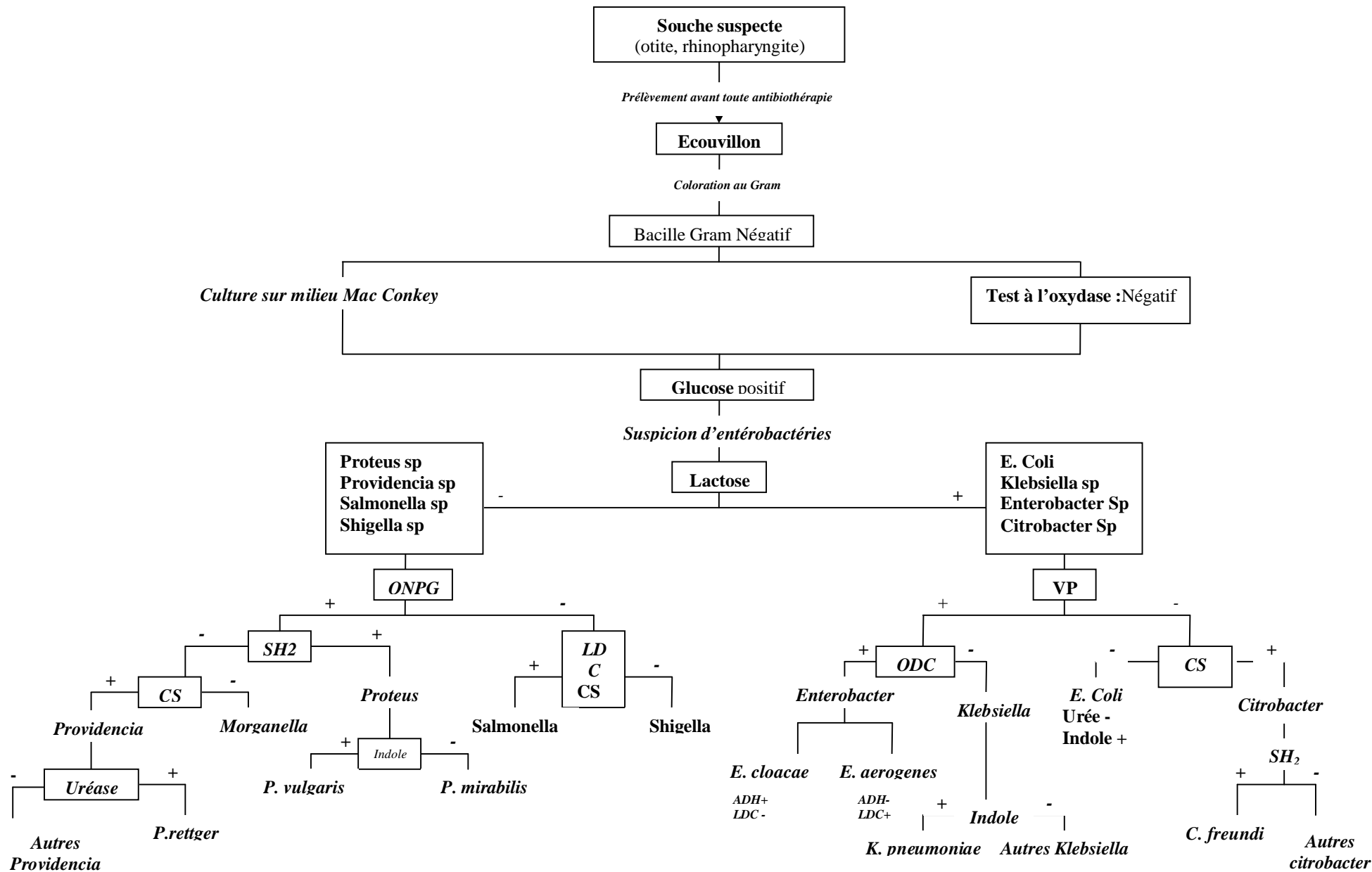


Figure 9 : Algorithme d'identification des Entérobactéries

2.3 Démarche diagnostique

2.3.1 Prélèvement

2.3.1.1 Conditions de réalisation

Le respect des règles d'asepsie et de stérilité devait être de rigueur. La qualité des prélèvements a conditionné la suite de l'analyse et la valeur des résultats. Le prélèvement à visée diagnostique n'est fiable que s'il répond à un impératif d'ordre clinique correspondant à la capacité de ce prélèvement de donner réellement un diagnostic d'infection et donc d'induire la mise en œuvre d'une thérapeutique adéquate, et un impératif d'ordre technique, directement lié à la façon de prélever, de conditionner et d'acheminer le prélèvement au laboratoire.

La plupart des prélèvements se sont faits par écouvillonnage. Les écouvillons ont ensuite été placés dans des tubes stériles contenant 0,5ml d'eau physiologique stérile.

§ Prélèvement dans la gorge et rhinopharynx

Il a été réalisé avant toute antibiothérapie locale ou générale. Il s'agissait de l'écouvillonnage des amygdales et leur pourtour en général, ou en leur absence, de la paroi postérieure du pharynx. Deux écouvillons ont été réalisés : l'un servant à l'étalement extemporané sur lame, et l'autre, destiné à la culture.

§ Otorrhées

Ont été recueillies par écouvillonnage après nettoyage du conduit auditif externe par un antiseptique.

§ Prélèvement nasal

Deux écouvillons en coton pré humidifié (eau physiologique stérile) ont été utilisés : l'un pour l'examen microscopique, l'autre pour la culture. Le prélèvement s'est effectué au moins à 1 cm dans la narine.

§ Prélèvement sinusien

A été effectué par aspiration à l'aiguille, des sécrétions purulentes du méat, ou par écouvillonnage dans le pharynx postérieur.

2.3.1.2 Transport et conservation des prélèvements

Le transport du prélèvement (écouvillons) s'est fait dans une glacière contenant des réfrigérants (pour les prélèvements rhino-pharyngés), à moins de 2 h et à -4°C de conservation car la flore commensale d'accompagnement se multiplie rapidement, ce qui peut fausser les résultats. De plus, certains agents infectieux comme les pneumocoques et *Haemophilus* sont extrêmement sensibles. Les prélèvements ont été mis en culture sans délai, dans les 4 h qui suivent, pour obtenir de meilleurs résultats. Ceci permet en outre d'isoler en plus des germes cités plus haut, des Staphylocoques, Streptocoques, Bacilles à Gram négatif non fermentaires, Entérobactéries, Bactéries anaérobies.

Les prélèvements ont été conservés en bouillon dans des cryotubes à moins 70°C , en vue d'un éventuel re-isolément de souches en cas de résultat douteux. La décongélation s'est faite à température ambiante au laboratoire.

2.3.1.3 Récapitulatif de la démarche des prélèvements

La démarche dans la méthode de prélèvement respecte la chronologie suivante : voir schéma

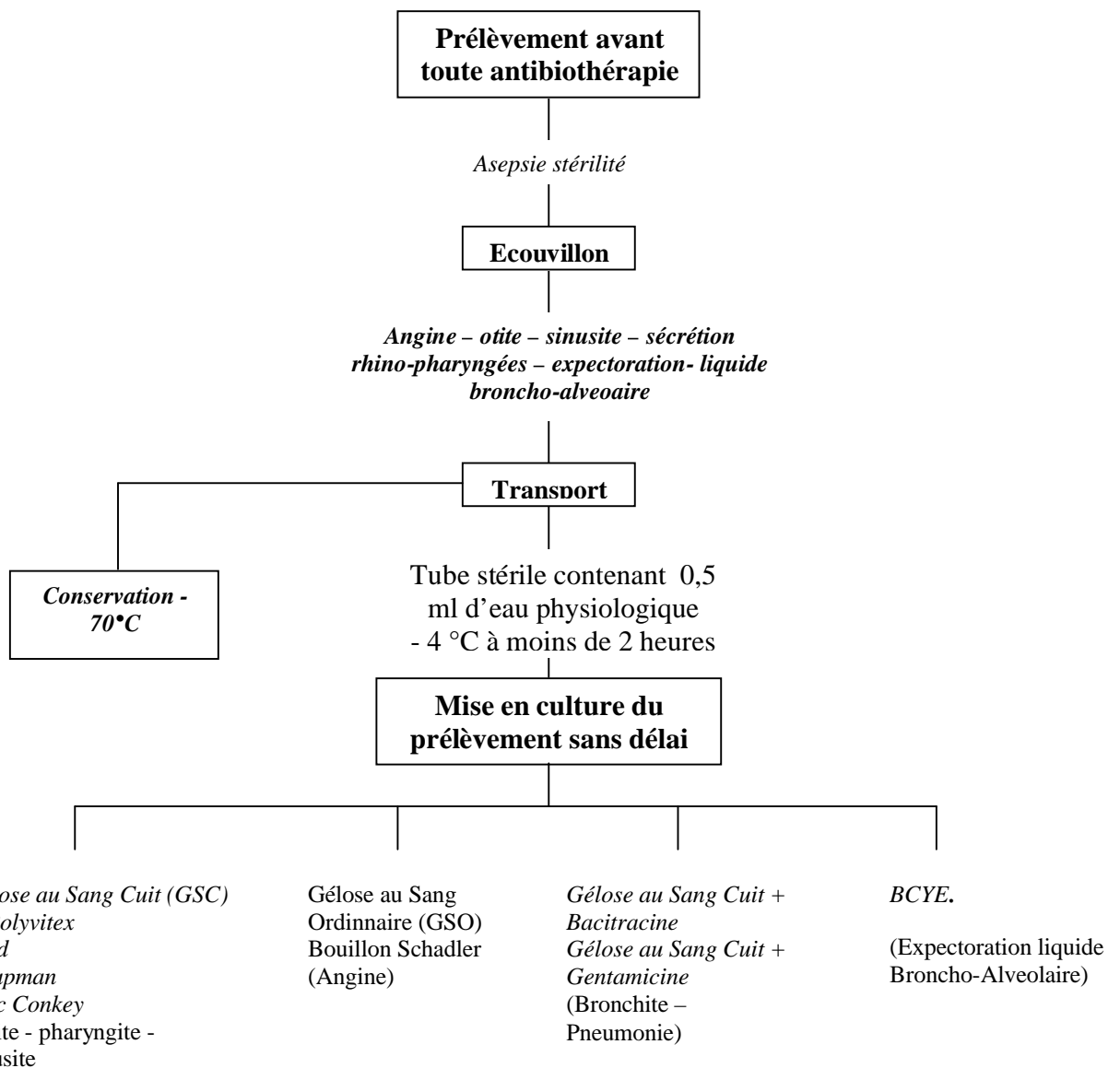


Figure 10 : Récapitulatif du prélèvement

Il a consisté à apprécier l'un des caractères organoleptiques des prélèvements :

§ Expectoration : hémoptoïque, purulente ou non, mucopurulente

Purulente ou mucopurulente : appropriée aux recherches bactériologiques

Spumeuse : rejetée parce que impropre à l'analyse bactériologique.

§ Sécrétions rhino-pharyngées : purulentes ou claires

§ Exsudat de la gorge : aspect blanchâtre ou non

§ Otorrhée : purulente ou mucopurulente

§ LBA : sanglant, laiteux, opalescent, clair, rosé ou mucopurulent.

§ Sinus : purulent.

Seuls les caractères cités plus haut ont été retenus pour la suite des investigations bactériologiques.

2.3.3 Examen microscopique après coloration de Gram

A l'objectif 100 plus une goutte d'huile à immersion, le frottis coloré de Gram du produit pathologique a permis d'apprécier les éléments que sont :

§ Le nombre de leucocytes par champ, témoins de l'inflammation

§ Le nombre de cellules épithéliales et de polynucléaires par champ

§ L'aspect de la flore bactérienne décrite de façon sommaire qualitativement et quantitativement:

- la forme de l'agent infectieux: cocci, bacille.
- le mode de groupement : isolé, diplo, chaînette...
- l'abondance de la flore
- la présence exceptionnelle ou non d'associations fuso-spirochétiennes caractéristique de l'angine de Vincent dans le cas d'un prélèvement de gorge

§ La présence ou non de levures, champignons filamenteux et parasites.

La dénombrement des leucocytes et cellules épithéliales doit être pris en compte comme l'illustre la *figure 11*

Cellules épithéliales pharyngées	< 25/champ		> 25/champ
Leucocytes	< 25/champ		> 25/champ
Flore bactérienne au Gram	Polymorphe	Monomorphe ou nette prédominance d'un type	
	 Culture sans signification	 Procéder à l'ensemencement	 Prélèvement impropre à l'analyse bactériologique : présence de salive

***Figure 11:* Critères de validation des sécrétions bronchiques et rhino-pharyngées**

L'examen microscopique a été une étape incontournable du diagnostic car, non seulement il a permis de juger de l'acceptabilité du prélèvement, mais aussi, a servi surtout à orienter les investigations grâce à l'aspect de la flore.

2.3.4 Culture

2.3.4.1 Tests préalables de stérilité et d'efficacité

Ø Test de stérilité

Les milieux de culture ont été préparés aseptiquement, stérilisés puis coulés dans des boîtes de pétri stériles.

La stérilité des milieux a été testée en incubant un échantillon à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Si aucune pousse n'est observée, le milieu est considéré comme stérile et est conservée à + 4°C.

Ø Test d'efficacité

C'est un test effectué avec les milieux de culture et les souches de référence. Ainsi le milieu considéré comme stérile doit faire l'objet d'une étude en ce qui concerne sa capacité à donner un résultat positif ou négatif pour un caractère donné.

2.3.4.2 Schéma récapitulatif de validité des milieux de culture

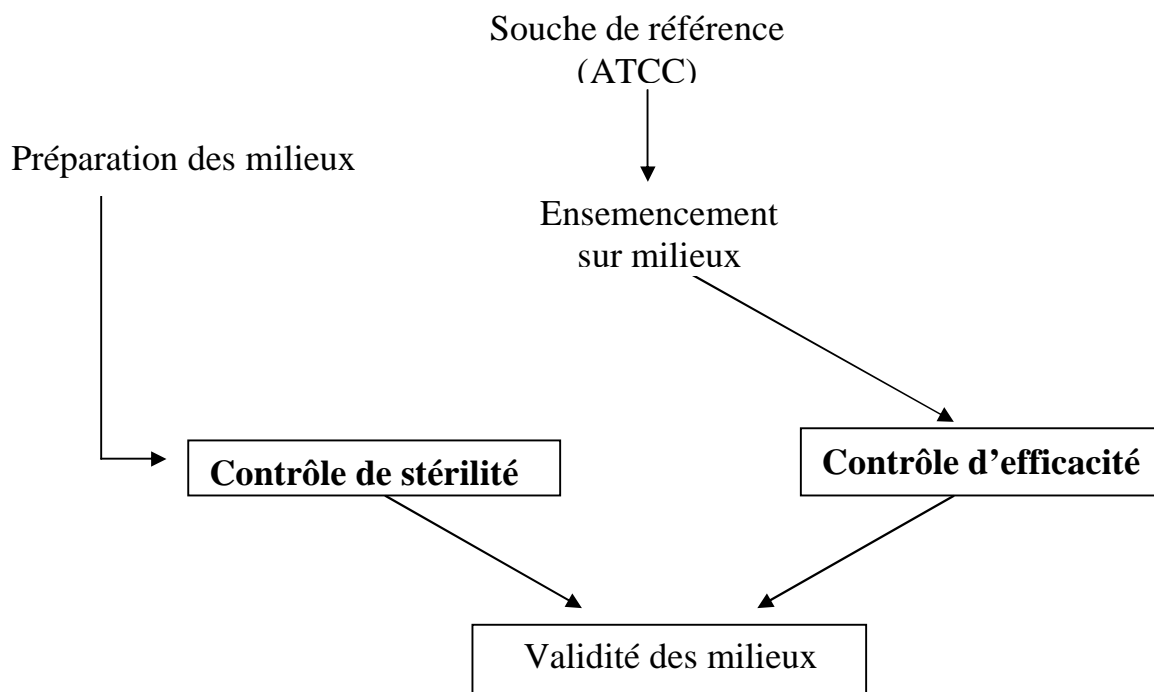


Figure 12: Récapitulatif de la démarche du contrôle qualité du matériel

En vue d'obtenir des germes à identifier, les prélèvements ont été ensemencés sur les milieux suivants :

- Staphylocoques : Chapman, Mac Conkey, gélose MH
- Streptocoques : GSO + acide nalidixique + colistine
- Entérobactéries : gélose EMB, Cled et Mac Conkey
- Bacilles à Gram négatif non fermentaires : gélose EMB, Cled.
- Anaérobies : gélose Kana, GSO + acide nalidixique
- Haemophilus et Moraxella : GSC + Bacitracine, GSC + polyvitex

Ils ont ensuite été incubés à 37°C + 5% CO₂, pendant 24 à 48h.

Le re-isolement s'est fait sur milieu au Thioglycolate.

La densité microbienne est interprétée dans le tableau III ci-dessous.

Tableau III: Corrélation entre le nombre de colonies observées sur les milieux culture et le nombre de bactéries par ml de sécrétion [50]

Nombre de colonies sur les boîtes	Nombre de bactéries/ml de sécrétion
moins de 5 colonies	entre 10 ⁵ et 10 ⁶
de 5 à 50 colonies	entre 10 ⁶ et 10 ⁷
de 50 à 500 colonies	entre 10 ⁷ et 10 ⁸
plus de 500 colonies	de 10 ⁸ et au-delà

10⁵ bactéries/ml : souche commensale

10⁶ bactéries/ml : signification douteuse

10⁷ bactéries/ml et au-delà : souche potentiellement pathogène
et susceptible d'être responsable de l'infection en cours

La culture étant souvent polymicrobienne, la sélection du germe a été réalisée

grâce au tableau de Murray et Washington qui, en fonction des différentes classes, permet d'affirmer si la culture est contributive ou non. Seules les classes 4 et 5 ont été retenues

Tableau IV: Critères de Murray et Washington[50]

Classe	Cellules par champ	
	Epithéliales	Leucocytes
1	> 25	< 10
2	> 25	10 - 25
3	> 25	> 25
4	10 - 25	> 25
5	< 10	> 25

2.4 Identification des souches bactériennes

2.4.1 Les Streptocoques

2.4.1.1 Examen microscopique

Ce sont des cocci gram + disposés en chaînettes plus ou moins longues.

2.4.1.2 Isolement

Le prélèvement est ensemencé sur GSO + Ac nalidixique + Colistine. La boîte de pétri est incubée à 37°C pendant 24 h dans une atmosphère à 5 % de CO₂.

Après examen macroscopique de la culture, on note les caractères de l'hémolyse et l'aspect des colonies :

§ Les β hémolytiques : présomption de streptocoques A, B, C, D, F, G, L

-Les streptocoques A, C, G donnent des colonies transparentes, en dômes, d'un diamètre de 0,5 mm environ

- Les streptocoques B et D donnent des colonies bombées, opaques de 1 à 2 mm de diamètre

- Les colonies des streptocoques du groupe F et certaines souches de *S.mutans* ont la taille d'une tête d'épingle

§ Les non hémolytiques

§ Les α hémolytiques

2.4.1.3 Identification biochimique : test à la catalase

Sur les cocci gram + en colonies β hémolytique, la recherche de la catalase est effectuée.

Une réaction positive se traduit par un dégagement de bulles d'oxygène.

La réaction est négative avec les streptocoques

2.4.1.4 *Streptococcus pneumoniae*

Ø Examen macroscopique des colonies

Streptococcus pneumoniae a donné sur gélose au sang cuit, de petites colonies mucoïdes (souche avec capsule) ou à dépression centrale (souche sans capsule), transparentes, rondes, de 1 à 1,5 mm et développant une hémolyse de type alpha (alpha-*viridans*).

Ø Examen microscopique après coloration de Gram

A partir d'une colonie, l'observation microscopique à l'objectif 100 plus huile à immersion a montré des diplocoques Gram positif lancéolés, en flamme de bougie, capsulés. Il s'agit là d'une morphologie généralement caractéristique du pneumocoque.

Ø Test de la catalase

• Principe

La catalase est une enzyme qui hydrolyse le peroxyde d'hydrogène (3%) en eau plus oxygène.

- **Interprétation**

- Réaction positive : une production de bulles indique la présence de catalase.
- Réaction négative : une absence de bulles signe un test négatif.

- **Résultats**

Streptococcus pneumoniae est catalase négative.

Ø **Le test de sensibilité à l'optochine**

- **Principe**

Les colonies de *Streptococcus pneumoniae* sont généralement sensibles à l'optochine (chlorhydrate d'éthylhydrocupréine), alors que les autres streptocoques et en particulier les streptocoques non groupables alpha-hémolytiques ne le sont pas. Il s'agit d'un test très fiable et d'une grande valeur diagnostique.

- **Interprétation**

- Une zone d'inhibition supérieure ou égale à 14 mm de diamètre oriente vers *Streptococcus pneumoniae*.
- Une absence d'inhibition oriente généralement vers les streptocoques alpha-viridans autres que *S. pneumoniae*.
- Une zone d'inhibition inférieure à 14 mm de diamètre nécessite des tests complémentaires.

- **Limites**

Certaines souches de *S. pneumoniae* ne sont pas inhibées par l'optochine. De plus, certains streptocoques *viridans* donnent de faibles zones d'inhibition.

Ø *Test de solubilité dans la bile*

• *Principe*

Les colonies de *Streptococcus pneumoniae* sont « dissoutes » ou lysées en 30 minutes en présence d'une solution de 10% de désoxycholate de sodium.

2.4.1.5 *Streptococcus pyogenes*

Ø *Examen macroscopique des colonies*

Streptococcus pyogenes a donné sur gélose au sang ordinaire des colonies grisâtres, de 0,5 à 1 mm, isses, bombées ou convexes entourées d'une zone d'hémolyse totale de type bêta. C'est un streptocoque bêta-hémolytique.

Ø *Examen microscopique*

Au microscope optique, ce germe s'est présenté sous forme de cocci Gram positif disposés en chaînettes courtes ou longues.

Ø *Test de la catalase*

S. pyogenes est catalase négative.

Ø *Test de sensibilité à la bacitracine*

• *Principe*

Les colonies de streptocoques bêta-hémolytiques du groupe A sont généralement sensibles à la bacitracine. Il s'agit d'un test de présomption.

• *Interprétation*

- La présence d'une zone d'inhibition signe une présomption de streptocoques bêta-hémolytiques du groupe A.
- Une absence d'inhibition oriente vers des streptocoques bêta-hémolytiques autres que ceux du groupe A.

- ***Limites***

Les streptocoques *viridans* peuvent également être inhibés par la bacitracine.

- Ø ***Microméthodes d'identification***

Nous avons eu recours aux microplaques CSB streptocoques, dont le principe et la technique d'utilisation seront par la suite décrits pour l'identification des streptocoques.

Tableau V: Identification des principales espèces de Streptocoques [63]

VP	ESC	ADH	BHS	ARA	MAN	SOR	TRE	RAF	SOS	INU	LAC	RIB	AMD	GLY	ESPECES
-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	d	-	<i>S. pyogenes</i>
+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	d	+	+	+	<i>S. agalactiae</i>
+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>Enterococcus faecalis</i>
+	+	-	-	-	d	-	+	+	-	d	+	-	+	-	<i>S. bovis</i>
d	+	-	-	-	-	+	+	+	-	d	-	-	+	d	<i>S. salivarius</i>
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. mitis</i>
+	+	+	-	-	d	-	+	d	-	-	+	-	-	+	<i>S. milleri</i>
-	+	+	-	-	-	+	+	d	+	d	+	-	d	-	<i>S. crista</i>
-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	d	-	<i>S. sanguis</i>
+	+	-	-	-	+	-	+	+	d	+	+	-	-	d	<i>S. mutans</i>
-	-	d	-	-	-	-	+	+	d	d	+	-	-	d	<i>S. pneumoniae</i>

Caractères négatifs (-) : 0-25 % des souches

Caractères variables (d) : 26-70 % des souches

Caractères positifs (+) : > 70 % des souches

2.4.2 *Haemophilus influenzae*

2.4.2.1 *Examen macroscopique des colonies*

Les colonies sont fines, lisses, rondes en gouttelettes de rosée. Elles sont volumineuses avec une tendance à s'étaler. Sur gélose au sang cuit, elles sont beiges et mesurent 1,5 à 2 mm

2.4.2.2 *Examen microscopique*

A la coloration de Gram, on observe des bacilles à Gram négatif, isolés, de petite taille, polymorphes avec parfois une prédominance de coccobacilles.

2.4.2.3 *Test à la catalase*

Haemophilus influenzae est catalase positif.

2.4.2.4 *Test à la cytochrome oxydase*

Ø *Principe*

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

Ø *Interprétation*

Haemophilus influenzae est cytochrome oxydase positif.

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

Haemophilus influenzae exige les deux facteurs pour sa croissance.

2.4.2.6 *Mise en évidence du phénomène de satellitisme*

L'exigence en facteur V a pu être déterminée par l'épreuve de la croissance en satellitisme autour d'une strie de *Staphylococcus aureus* qui apporte le facteur V sur gélose au sang de cheval qui apporte le facteur X.

Ø *Lecture :*

Les *Haemophilus* V dépendants se sont développés autour de la strie de *Staphylocoques*, tandis qu'on n'observait pas de culture sur le reste de la boîte. Il pouvait s'agir de *Haemophilus influenzae* ou de *H. parainfluenzae*.

2.4.2.7 Microméthode d'identification API-NH (*Neisseria-Haemophilus*)

Elle a été utile pour le diagnostic différentiel des espèces d'*Haemophilus*.

En outre, la recherche de l'ODC, uréase, Indole permet de scinder *H. influenzae* en six biotypes et *H. para-influenzae* en trois biotypes.

Tableau de lecture (voir page suivante)

Tableau VI: caractères d'identification des différents biotypes d'*Haemophilus* [34]

		Exigence en facteur		Synthèse de porphyrine à partir de ALA	Exigence en CO ₂	ODC	UREE	INDOLE	ONPG	SAC	HEMOLYSE	OXYDASE	CATALASE
		X	V										
<i>H. influenzae</i> biotype	I	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
	II	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
	III	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
	IV	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
	V	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+
	VI	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>H. haemolitycus</i>		+	+	-	-	-	+	d	-	-	+	+	+
<i>H. influenzae</i> para-biotype	I	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
	II	-	+	+	-	+	+	-	d	+	d	+	d
	III	-	+	+	d	-	+	-	d	+	d	+	+
<i>H. aphrophilus</i>		-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>H. paraphrophilus</i>		-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-

2.4.3 *Moraxella catarrhalis*

2.4.3.1 Examen macroscopique des colonies

Les colonies sont apparues lisses, parfois rugueuses légèrement aplaties et d'allure muqueuse, translucides de 0,5 à 1 mm.

2.4.3.2 Examen microscopique

Après coloration de Gram, l'examen a montré des cocci Gram négatif, à face adjacente aplatie, avec tendance à résister à la décoloration.

2.4.3.3 Test à la catalase

Moraxella catarrhalis est catalase positive.

2.4.3.4 Test à la cytochrome-oxydase

Moraxella catarrhalis est oxydase positive.

2.4.3.5 Microméthode d'identification :galerie API-NH

Elle met également en relief les caractères biochimiques des Moraxelles comme illustrés dans le tableau VII

Tableau VII : identification d'*Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis*

Espèces	PEN	GLU	FRU	MAL	SAC	ODC	URE	LIP	PAL	• gal	PROA	GGT	IND
1	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Legende :

1 : Caractères relatifs à *H. influenzae*

2 : Caractères relatifs à *M. catarrhalis*

2.4.4 Les Entérobactéries

2.4.4.1 Examen microscopique

Les Entérobactéries ont une morphologie très voisine : ce sont des bacilles Gram négatif. Certains genres sont immobiles, d' autres mobiles.

2.4.4.2 Aspect des colonies

Elles sont habituellement lisses, brillantes, de structure homogène. Cet aspect peut évoluer après cultures successives pour donner des colonies rugueuses type « R ».

2.4.4.3 Test à l'oxydase

Les Entérobactéries sont oxydase négative.

2.4.4.4 Etude des caractères biochimiques

Elle s'effectue avec des microméthodes d'identification.

Tableau VIII: Caractères d'identification des entérobactéries les plus fréquemment rencontrées dans les infections humaines [55]

LDC	ODC	ADH	URE	VP	GEL	CS	CC	H ₂ S	IND	MAL	PDA	βGAL	LAC	GLU	MAN	SAC	SOR	RHA	ADO	DUL	INO	Espèces
-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	D	+	+	-	+	+	-	-	-	C. amalonaticus
-	-	-	-	-	-	d	+	+	-	-	-	+	D	+	+	d	+	+	d	-	-	Citrobacter freundii
-	+	D	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	D	+	+	-	+	+	d	-	-	Citrobacter koseri
+	D	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	D	+	+	d	+	+	-	-	-	Escherichia coli
+	D	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	+	D	+	+	d	+	+	-	-	-	E. coli/A. dispar
+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	Edwardsiella tarda
+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Enterobacter Aerogenes
-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	Enterobacter cloacea
d	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	D	+	+	+	-	+	-	-	-	Enterobacter gergoviae
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	+	+	-	-	d	-	-	-	Hafnia alvei
+	+	-	+	d	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	nt	+	+	K. ornithinolytica
+	-	-	D	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	nt	+	+	K. oxytoca
d	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	d	d	nt	d	d	Klebsiella ozonae
+	-	-	D	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	Klebsiella pneumoniae
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	d	d	d	nt	+	+	K. rhinoscleromatis
-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Morganella morgani
-	D	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	Pantoea agglomerans
-	+	-	+	-	+	d	d	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Proteus mirabilis
-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	Proteus vulgaris
-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	nt	-	-	Prov. alcalifaciens
-	-	-	+	-	-	d	d	-	+	-	+	-	-	+	+	d	-	d	+	+	+	Providencia rettgeri
-	-	-	D	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	Providencia stuartii
+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	Salmonella typhi
-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	nt	-	-	Salmonella paratyphi
+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	d	-	-	Serratia liquefaciens
+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	d	-	d	Serratia marcescens
-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	d	-	+	+	-	-	-	-	d	d	Shigella boydii
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	+	-	-	-	-	-	d	-	S. dysenteriae A1
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	d	-	+	-	-	-	-	-	d	-	S. dysenteriae A2
-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	d	-	Shigella flexneri
-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Shigella sonnei

Caractères négatifs (-) si 0-25 % des souches l'expriment

Caractères variables (d) si 26-70 % des souches l'expriment

Caractères positifs (+) si 71-90 % des souches l'expriment

2.5 Mise au point des algorithmes

Les caractères majeurs qui ont été retenus lors de l'identification sont des caractères susceptibles de permettre une bonne identification et ceux-ci peuvent varier en fonction des espèces étudiées.

2.5.1 *Streptococcus pneumoniae*

Les caractères retenus ont été les suivants :

- § Prélèvement : critères de qualité, transport et conservation
- § Morphologie et mode de groupement de l'agent infectieux au Gram
- § Le nombre de polynucléaires et de cellules épithéliales par champ
- § Identification sur gélose au sang cuit (GSC) :
 - Nombre d'UFC/ml
 - Aspect des colonies
 - Taille et couleur des colonies
 - Type d'hémolyse
- § Aspect du bouillon
- § Recherche de la catalase, de l'oxydase
- § Lyse de la bile
- § Recherche de sels biliaires
- § Sensibilité à l'optochine
- § assimilation du tréhalose, du raffinose et de l'inuline.
- § synthèse d'uréase, d'ADH ;

2.5.2 *Streptococcus pyogenes*

Les caractères retenus ont été les suivants :

- § Prélèvement : critères de qualité, transport et conservation
- § Morphologie et mode de groupement de l'agent infectieux au Gram
- § Le nombre de polynucléaires et de cellules épithéliales par champ

§ Présence ou non d'association fuso-spirochétienne

§ Identification sur gélose au sang ordinaire (GSO) :

Nombre d'UFC/ml

Aspect des colonies

Taille et couleur des colonies

Type d'hémolyse

§ Aspect du bouillon

§ Recherche de la catalase, de l'oxydase

§ Test à la bacitracine

§ Agglutination Slidex

§ assimilation du tréhalose, du raffinose et de l'inuline.

§ recherche d'uréase, d'ADH

2.5.3 Haemophilus influenzae

Les caractères retenus sont les suivants :

§ Prélèvement : critères de qualité, transport et conservation

§ Morphologie et mode de groupement de l'agent infectieux au Gram

§ Le nombre de polynucléaires et de cellules épithéliales par champ

§ Identification sur GSC + Polyvitex ou gélose au chocolat

-Nombre d'UFC/ml

-Aspect, taille et couleur des colonies

-Type d'hémolyse

§ Aspect du bouillon Shaedler

§ Recherche de la catalase, oxydase

§ Exigence en facteur V et X

§ Mise en évidence du satellitisme

§ Recherche d'uréase, indole, ODC

2.5.4 Les Entérobactéries

Les caractères retenus ont été les suivants :

- § Prélèvement : critères de qualité, transport et conservation
- § Morphologie et mode de groupement de l'agent infectieux au Gram
- § Le nombre de polynucléaires et de cellules épithéliales par champ
- § Isolement sur gélose Mac Conkey :
 - Nombre d'UFC/ml
 - Aspect, taille et couleur des colonies
- § Les réactions à l'oxydase, catalase
- § La recherche des décarboxylases (ADH, ODC, LDC)
- § La recherche d'uréase
- § La production d'acétoïne (VP)
- § L'utilisation du citrate dans le milieu de Simmons
- § La production d'indole, de phénylalanine désaminase
- § La recherche de β -galactosidase (ONPG)

2.6 Validation de l'identification des souches

Cette validation va passer par l'identification de souches supposées inconnues. Elle se fait à quatre niveaux principalement :

Ø Au niveau du prélèvement où la démarche ayant été établie devra être scrupuleusement suivie. Ceci englobe les conditions de prélèvement, de transport et de conservation.

Ø Au niveau de la microscopie où les critères de Murray et Washington ont été utilisés. Seules les souches remplissant les critères des Classes 4 et 5 ont été retenues. Cependant, dans la plupart des cas, si le nombre de Polynucléaires neutrophiles a été inférieur à 25/champ, ceci n'a pas été considéré comme un élément rédhibitoire pour la suite des investigations, puisque la culture est demeurée contributive.

Ø Au niveau de la culture : le choix de milieu de culture est fonction des exigences du germe. Ont été pris en compte et notés : l'aspect des colonies, leur densité, taille et couleur et éventuellement s'il y'a lieu , la présence ou non, d'hémolyse. La densité seuil est de 10^7 UFC/ml car à ce stade la souche est hautement pathogène et susceptible d'être responsable de l'infection en cours.

Ø Au niveau de l'identification des souches, basée sur la mesure de similitude entre leur profil et celui des espèces identifiables, à l'aide de données recueillies (tables diagnostiques). Cependant, nous avons utilisé les résultats de la galerie API Strepto, Entero et NH comme référence.

En amont de ces quatre axes de la validation, s'est fait au préalable un contrôle qualité de stérilité et d'efficacité du matériel utilisé, ceci pour s'assurer de l'authenticité des résultats à obtenir.

Des tables diagnostiques (ou matrices de données) contiennent, pour chaque taxon, la probabilité de positivité (f) aux différents tests. Si la réponse de la souche pour un test est positive, on retient la valeur f ; si elle est négative, on retient la valeur 1-f (probabilité de négativité). Le produit des valeurs (probabilité cumulée) donne la fréquence théorique de la souche dans l'espèce ou probabilité absolue.

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

Probabilité absolue = f x (1 - f) x ...

= produit des valeurs obtenues pour chaque espèce.

Probabilité relative = $\frac{\text{Probabilité absolue}}{\text{Somme des probabilités absolues}} \times 100$

On considère généralement les seuils suivants :

- > 99,9 % : excellente identification
- > 99 % : très bonne identification
- > 90 % : bonne identification
- > 80 % : identification acceptable
- < 80 % : identification inacceptable.

Nous allons exploiter les résultats de quelques souches identifiées pour essayer de valider nos algorithmes, en raisonnant en terme de probabilité.

3 RESULTATS ET COMMENTAIRES

3.1 Population d'étude

Sept mois durant, entre la période allant de fin Septembre 2005 à la fin du mois de mars 2006, 330 prélèvements ont été réalisés. 100 parmi eux provenaient du service de pédiatrie de l'HALD et 230 à la fois du service d'ORL de l'HALD et d'un cabinet privé d'ORL, et concernaient naturellement toutes les tranches d'âge. Les enfants étaient âgés de 2 mois à 15 ans et les adultes de 16 à 70 ans.(voir tableau IX)

Les prélèvements effectués par écouvillonnage concernaient aussi bien des pus d'otite, de sinusite, que des sécrétions naso-pharyngées et exsudat de gorge.

3.2 Souches bactériennes isolées

Pour notre étude, 151 souches bactériennes ont été isolées 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%)

26 souches de *S. aureus* (17,21%) et 9 d'autres espèces de staphylocoques (5,96%)

37 souches d'autres espèces de streptocoques (24,5%)

41 souches de *Pseudomonas aeruginosa* (27,15%)

12 souches d'entérobactéries (7,94%)

Tableau IX : Répartition des souches selon les structures

Structures	Pédiatrie	ORL public	ORL privé
Nombre de souches	32	58	61

Tableau X: Répartition de souches selon l'origine du prélèvement

Origine Germes	Oreille	Nez	Gorge	Sinus	Total
<i>S. pneumoniae</i>	0	3	5	0	8
<i>S. pyogenes</i>	1	0	3	0	4
<i>H. influenzae</i>	0	2	3	0	5
<i>H. parainfluenzae</i>	0	0	1	0	1
<i>M. catarrhalis</i>	0	1	7	0	8
<i>S. aureus</i>	14	4	6	2	26
<i>Staphylococcus sp</i>	7	0	2	0	9
<i>Streptococcus sp</i>	3	1	29	4	37
<i>P. aeruginosa</i>	40	1	0	0	41
Entérobactéries	10	0	0	2	12
Total	74	13	56	8	151

Au total, 74 souches ont été isolées d'otites, 13 souches de rhinopharyngites, 56 souches d'angines, 8 de sinusites. Ces éléments sont mentionnés qu'à titre d'information sur le travail qui a été entrepris et n'ont aucune valeur interprétative dans le cadre de notre sujet.(Tableau X)

3.3 Résultats de validation de l'identification des souches

Les résultats tiennent compte des différents caractères des souches étudiées et sont obtenus au terme des calculs de probabilité exprimant la chance d'isoler le germe.

3.3.1 Diagnostic de *Streptococcus pneumoniae*

Tableau XI: Identification de *Streptococcus pneumoniae* [6]

Espèces Caractères	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	X (<i>Streptococcus pneumoniae probable</i>)
Prélèvement : asepsie et stérilité Transport : <2h, 4°C	100%	100%	100%	+
Cocci Gram + en diplo, en flamme de bougie	100%	0%	0%	+
< 10 cell épithéliales > 25 Polynuc. neutr	100%	100%	100%	+
GSC	100 %	100 %	100 %	+
Colonie petite, à dépression centrale, transparente, 1-1,5mm	100%	0%	0%	+
> 10 ⁷ UFC/ml	100%	100%	100%	+
• Hémolysé	1	0	0	+
Bouillon :trouble	100%	100%	100%	+
Catalase	0 %	0 %	0 %	-
Sels biliaires	98 %	0 %	0 %	+
Optochine	90 %	0 %	0 %	+
VP	0 %	0 %	0 %	-
ESC	39 %	42 %	3 %	-
ADH	57 %	90 %	99 %	+
RAF	87 %	55 %	31 %	+
TRE	98 %	98 %	1 %	+

+ = (f)

- = (1-f)

Ø Probabilité absolue pour que :

- X appartient à *Streptococcus pneumoniae* est de : $2,6 \cdot 10^{-3}$
- X appartient à *Streptococcus sanguis* est de : 0
- X appartient à *Streptococcus mitis* est de : 0

Ø Probabilité relative pour que :

- X appartient à *Streptococcus pneumoniae* est de : 100%
- X appartient à *Streptococcus sanguis* est de : 0%
- X appartient à *Streptococcus mitis* est de :

Le test de sensibilité à l'optochine (diamètre > 14mm), la lyse par les sels biliaires, respectivement positif et négatif, l'observation d'une alpha hémolyse sur la gélose au sang cuit, éléments majeurs pour l'identification de *Streptococcus pneumoniae*, permettent d'affirmer le diagnostic du germe mis en cause, en plus des caractères mentionnés dans le tableau I.

Ainsi, nous avons 100% de chance d'obtenir un pneumocoque grâce à cette démarche.

3.3.2 Diagnostic de *Streptococcus pyogenes*

Tableau XII: Identification de *Streptococcus pyogenes* [7]

Espèces Caractères	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	X (<i>Streptococcus pyogenes probable</i>)
Prélèvement : aseptie et stérilité Transport : < 2h, 4°C	100%	100%	100%	+
Cocci Gram + en chaîne	100%	0%	0%	+
< 10 cell épithéliales > 25 Polynuc. neutr	100%	100%	100%	+
GSO	100 %	100 %	100 %	+
Colonie, petite, grisâtre, bombée, lisse, 0,5-1,5mm	100%	0%	0%	+
> 10 ⁶ UFC/ml	100%	100%	100%	+
β Hémolyse	98%	1	0	+
Bouillon : trouble	100%	100%	100%	+
Catalase	0 %	0 %	0 %	-
Sels biliaires	98 %	0 %	0 %	+
Test Bacitracine	100%	0%	0%	+
Test d'Agglutination	100%	0%	0%	+
ESC	5%	99 %	1 %	-
ADH	99 %	18 %	99 %	+
RAF	1%	88 %	1 %	-
TRE	98 %	98 %	1 %	+

+ = (f)

- = (1-f)

Ø Probabilité absolue pour que :

- X appartient à *Streptococcus pyogenes* est de : 0,88
- X appartient à *Streptococcus mutans* est de : 0
- X appartient à *Streptococcus agalactiae* est de : 0

Ø Probabilité relative pour que :

- X appartient à *Streptococcus pyogenes* est de : 100 %
- X appartient à *Streptococcus mutans* est de : 0 %
- X appartient à *Streptococcus agalactiae* est de : 0%

Le contenu du tableau II met en évidence les différents caractères de l'espèce.

Les tests supplémentaires d'agglutination et à la bacitracine, tous deux positifs, la présence de colonies bêta hémolytiques sur gélose au sang, confirment l'identification de l'espèce suspectée *Streptococcus pyogenes*.

En tenant compte de tous ces éléments, notre algorithme permet d'obtenir une probabilité relative de 100% de chance d'isoler le *Streptococcus pyogenes*.

3.3.3 Diagnostic d' *Haemophilus influenzae*

Tableau XIII: Identification d' *Haemophilus influenzae* [6]

Espèces Caractères	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Haemophilus aphrophilus</i>	X (<i>Haemophilus influenzae probable</i>)
Prélèvement : asepsie et stérilité	100%	100%	100%	+
Transport : <2h, à 4°				
Bacilles Gram négatif isolés	100%	0%	0%	+
< 10 cell épithéliales > 25 Polynuc. neutr	100%	100%	100%	+
GSC + polyvitex	100 %	100 %	100 %	+
Colonies fines en gouttelettes de rosée de 1,5-2mm avec tendance à s'étaler	100%	0%	0%	+
> 10 ⁷ UFC/ml	100%	100%	100%	+
Bouillon : trouble	100%	100%	100%	+
Oxydase	100%	0%	0%	+
Catalase	100%	0%	0%	+
NAD ou facteur V	100 %	0%	100%	+
Hémine ou facteur X	100%	0%	0%	+
Satellitisme	100%	100%	0%	+
ODC	40%	73 %	0%	-
Urée	92 %	55 %	0 %	+
Indole	74%	11 %	0 %	+

+ = (f)

- = (1-f)

Ø Probabilité absolue pour que :

- X appartient à *Haemophilus influenzae* est de : 0,40
- X appartient à *Haemophilus parainfluenzae* est de : 0
- X appartient à *Haemophilus aphrophilus* est de : 0

Ø Probabilité relative pour que :

- X appartient à *Haemophilus influenzae* est de : 100 %
- X appartient à *Haemophilus parainfluenzae* est de : 0 %
- X appartient à *Haemophilus aphrophilus* est de : 0

La bactérie incriminée exigeant les facteurs X et V et répondant au phénomène de satellitisme, permet de nous orienter dans le diagnostic des espèces d'*Haemophilus*.

.

En tenant compte de ces critères ci-dessus cités, nous obtenons une probabilité relative de 100% pour que l'espèce X soit *Haemophilus influenzae*.

3.3.4 Diagnostic de *Proteus mirabilis*

Tableau XIV: Identification de *Proteus mirabilis* [5]

Espèces Caractères	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus penneri</i>	X (<i>Proteus mirabilis probable</i>)
Prélèvement : asepsie et stérilité, transport :-2H,4°	100%	100%	100%	+
Cocci Gram négatif a face aplatie	100%	0%	0%	+
< 10 cell épithéliales > 25 Polynuc. neutr	100%	100%	100%	+
Mac Conkey	100 %	100 %	100 %	+
Colonies lisses ou rugueuses de 0,5-1mm au bord régulier	100%	0%	0%	+
> 10 ⁷ UFC/ml	100%	100%	100%	+
Bouillon : trouble	100%	100%	100%	+
Oxydase	0%	0%	0%	-
Catalase	100%	100%	100%	+
ONPG	1%	1%	1%	-
Glucose	99%	98%	99%	+
H ₂ S	83%	75%	20%	+
Urée	99%	99%	100%	+
Indole	92%	1%	0%	-
Citrate	12%	50%	1%	+
VP	0%	1%	0%	-

+ = (f)

- = (1-f)

∅ Probabilité absolue pour que :

- X appartienne à *Proteus mirabilis* est de : 0,35
- X appartienne à *Proteus vulgaris* est de : $7,7 \cdot 10^{-3}$
- X appartienne à *Proteus penneri* est de : $1,94 \cdot 10^{-3}$

∅ Probabilité relative pour que :

- X appartienne à *Proteus mirabilis* est de : 97,3%
- X appartienne à *Proteus vulgaris* est de : 2,14%
- X appartienne à *Proteus penneri* est de : 0,53%

- La culture sur Mac Conkey, positive, nous nous orientons ainsi vers la grande famille des Entérobactéries.

- Les caractères biochimiques notamment le lactose testé négatif, permet de se situer au sein d'une liste limitative d'espèces dans laquelle on retrouve *Proteus sp*, puis l'indole différenciant les espèces du genre.

En suivant les différentes phases de la démarche, la probabilité relative pour que l'espèce X soit un *Proteus mirabilis* est de 97,3%. Notre algorithme permet ainsi une bonne identification de l'espèce.

3.3.5 Diagnostic de *Klebsiella pneumoniae*

Tableau XV: Identification de *Klebsiella pneumoniae* [5]

Espèces Caractères	<i>Klebsiella Pneumoniae ssp Ozaenae</i>	<i>Klebsiella Pneumoniae ssp pneumoniae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	X (<i>Klebsiella pneumoniae probable</i>)
Prélèvement :asepsie et stérilité, transport :-2H,4°	100%	100%	100%	+
Bacille Gram négatif En diplo	100%	0%	0%	+
< 10 cell épithéliales > 25 Polynuc. neutr	100%	100%	100%	+
Mac Conkey	100 %	100 %	100 %	+
> 10 ⁶ UFC/ml	100%	100%	100%	+
Bouillon :trouble	100%	100%	100%	+
Oxydase	0%	0%	0%	-
Catalase	100%	100%	100%	+
ONPG	94%	99%	99%	+
ADH	18%	0%	0%	-
LDC	25%	73%	80%	+
ODC	1%	0%	0%	-
Citrate de Simmons	18%	86%	89%	+
Urée	1%	75%	78%	-
Indole	0%	0%	99%	-
VP	1%	90%	80%	+
Glucose	99%	100%	100%	+
Mannitol	96%	99%	100%	+

+ = (f)

- = (1-f)

∅ Probabilité absolue pour que :

- X appartient à *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* est de : 0,14
- X appartient à *Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae* est de : $3,2 \cdot 10^{-4}$
- X appartient à *Klebsiella oxytoca* est de : $1,24 \cdot 10^{-3}$

∅ Probabilité relative pour que :

- X appartient à *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* est de : 99 %
- X appartient à *Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae* est de : 0,22 %
- X appartient à *Klebsiella oxytoca* est de : 0,87%

- La culture sur Mac Conkey étant positive, nous nous orientons ainsi vers la grande famille des Entérobactéries comme précédemment.

- Le lactose testé positif cette fois, nous amène à suspecter *Klebsiella sp* et les autres caractères biochimiques de différencier les genres de la famille et les espèces du genre, jusqu'à l'isolement de l'espèce suspectée.

En suivant les différentes phases de la démarche, la probabilité relative pour que l'espèce X soit un *Klebsiella pneumoniae* est de 99%. Notre algorithme permet ainsi une très bonne identification de l'espèce.

3.3.6 Diagnostic d' *Enterobacter cloacae*

Tableau XVI: Identification de *Enterobacter cloacae* [5]

Espèces Caractères	<i>Enterobacter Aerogenes</i>	<i>Enterobacter intermedius</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Espèce X (<i>Enterobacter cloacae probable</i>)
Prélèvement :asepsie et stérilité, transport :-2H,4°	100%	100%	100%	+
Bacille Gram négatif En diplo	100%	0%	0%	+
< 10 cell épithéliales > 25 Polynuc. neutr	100%	100%	100%	+
Mac Conkey	100 %	100 %	100 %	+
> 10 ⁶ UFC/ml	100%	100%	100%	+
Bouillon :trouble	100%	100%	100%	+
Oxydase	0%	0%	0%	-
Catalase	100%	100%	100%	+
ONPG	99%	99%	98%	+
ADH	0%	0%	82%	+
LDC	99%	0%	1%	-
ODC	98%	99%	92%	+
Citrate de Simmons	82%	1%	90%	+
Urée	1%	0%	1%	-
Indole	0%	0%	0%	-
VP	95%	2%	85%	+
Glucose	99%	100%	99%	+
Mannitol	99%	97%	99%	+

+ = (f)

- = (1-f)

Ø Probabilité absolue pour que :

- X appartient à *Enterobacter cloacae* est de : 0,54
- X appartient à *Enterobacter intermedius* est de : $1,9 \cdot 10^{-4}$
- X appartient à *Enterobacter cloacae* est de : $7,3 \cdot 10^{-3}$

Ø Probabilité relative pour que :

- X appartient à *Enterobacter cloacae* est de : 98,6%
- X appartient à *Enterobacter intermedius* est de : 0,035%
- X appartient à *Enterobacter enterogenes* est de : 1,33%

- La culture sur Mac Conkey étant positive, nous nous orientons ainsi vers la grande famille des Entérobactéries comme précédemment.

- Le lactose également testé positif , nous conduit à la suspicion du genre *Enterobacter* et les autres caractères biochimiques à la différenciation des espèces du genre, jusqu'à l'isolement de l'espèce suspectée.

En suivant les différentes phases de la démarche, la probabilité relative pour que l'espèce X soit un *Enterobacter cloacae* est de 98%. Notre algorithme permet ainsi une bonne identification de l'espèce.

3.4 Résultats de la validation de la démarche

3.4.1 Expression des résultats

Pour chacune des souches, seules les probabilités absolues nous ont permis de calculer les paramètres. Pour certaines souches, les probabilités relatives n'auraient pas mis en exergue les variances. La moyenne et la variance ont aidé à établir la validation.

Encadré 1 : formule de la moyenne et de la variance

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

\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

Trois essais diagnostiques ont été effectués sur chaque prélèvement en tenant compte à chaque fois des variations notées au niveau des caractères biochimiques d'identification. Les résultats sont confinés dans le tableau ci-dessous.

Tableau XVII : Répartition des souches en fonction de leur probabilité, moyenne et variance

	Probabilité1	Probabilité2	Probabilité3	Moyenne	Variance
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,0032	0,003	0,0026	0,0029333	0,0000001
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,84	0,77	0,83	0,8133333	0,0014333
<i>Haemophilus influenzae</i>	0,53	0,56	0,54	0,5433333	0,0002333
<i>Proteus mirabilis</i>	0,33	0,3	0,34	0,3233333	0,0004333
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,14	0,139	0,142	0,1403333	0,0000023
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,57	0,56	0,56	0,5633333	0,0000333

La valeur des probabilités varie considérablement. Elle est parfois très faible. Elle est aussi et souvent très élevée, ce qui dénote de la facilité avec laquelle on peut aboutir aux résultats.

Pour tous ces germes, le calcul de la variance fait montre de l'étroitesse de différence au cours des trois opérations successivement effectuées. Les résultats ne sont pas significativement différents, c'est ce qui explique la stabilité des résultats lorsqu'on répète la procédure.

La stabilité des résultats montre le caractère répétable des algorithmes.

4 DISCUSSION [31, 40, 45, 46, 49, 50, 56, 58]

Le diagnostic des IRA est habituellement établi sur les bases cliniques et les traitements sont souvent instaurés de façon empirique en l'absence de toute documentation microbiologique, et initiés sur la base d'un pari ciblant le ou les pathogènes les plus probables.[35] C'est ainsi que l'utilisation excessive et abusive des antibiotiques peut promouvoir l'émergence de la résistance des agents antimicrobiens. La démarche effectuée dans les différents algorithmes permet à l'inverse de se baser sur des réalités et non des suppositions et concerne le prélèvement, l'examen macroscopique et microscopique, la mise en culture, l'isolement du germe et son profil de sensibilité.

4.1 Démarche diagnostique

4.1.1 Le prélèvement

Les prélèvements effectués ont été dans la limite du possible réalisés en respectant le protocole en vigueur. Les produits aussi divers et variés du nez, sinus, gorge, oreille moyenne et nasopharynx ont été récoltés le plus aseptiquement possible. Deux écouvillons coton ont été réalisés à chaque fois : l'un pour l'examen microscopique, l'autre pour la culture. Les prélèvements ont immédiatement été conservés à plus 4°C, ceci pour éviter la multiplication de la flore commensale, vu l'extrême fragilité de certaines espèces pathogènes en occurrence *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*.

Cependant, un des facteurs limitant au bon établissement du diagnostic microbiologique qui est d'ailleurs un problème pratique, c'est le prélèvement d'échantillons chez les patients déjà sous traitement antibiotique. Nous avons été confrontés à certains de ces cas, et certains résultats d'analyses se sont avérés souvent décevants à cause des résultats difficiles à interpréter, et peu contributifs.

D'où l'intérêt d'insister sur les conditions de réalisation des prélèvements, première étape du diagnostic et qui conditionnent la suite des investigations.

4.1.2 Examen microscopique direct

Il reste un acte fondamental du diagnostic bactériologique, rapide, très informatif et justement conditionné par la qualité du prélèvement. Il a permis de préciser l'abondance et la diversité de la flore bactérienne, tantôt monomorphe, tantôt polymorphe, la forme des bactéries (cocci, bacilles), leur taille et mode d'association (diplocoques, chaînettes, amas), leur caractère Gram positif, Gram négatif, et l'intensité de la réaction inflammatoire (polynucléaires neutrophiles, lymphocytes).

Lors d'une conférence de consensus, les auteurs ont souligné que des critères cytologiques étaient nécessaires pour une interprétation pertinente de la culture. Il s'agit des critères de Barlett, adaptés par Murray et Washington.[50] En effet si la présence de plus de 25 polynucléaires neutrophiles (PNN) par champ est unanimement recommandée, le nombre de cellules épithéliales au-delà duquel une contamination d'un prélèvement, notamment oro-pharyngé est à craindre est variable. La présence de moins de 10 cellules épithéliales par champ est la valeur la plus souvent rapportée et apparaît comme la plus pertinente. De ce fait les prélèvements ne répondant pas à ces critères cytologiques (> 25 PNN, < 10 cellules épithéliales) ne doivent pas être utilisés. [64]

Ces résultats sont d'autant plus stricts lorsqu'ils concernent des expectorations qui sont inévitablement contaminées par la flore salivaire. Pour ce qui a été des prélèvements du nez, sinus, oreille, la plupart du temps, le nombre de polynucléaires n'excédait pas 25 par champ. Une réaction inflammatoire même modérée demeurait toujours, ce qui fait que cela ne modifiait pas la qualité du prélèvement puisque la culture restait contributive.

4.1.3 Milieu de culture et isolement

La culture constitue la méthode microbiologique de référence (sensibilité de 90% ou plus) même si elle s'avère difficilement utilisable en pratique essentiellement en raison des délais de réponse du laboratoire (en moyenne 24 à 48h).

Aux Etats-Unis, des tests de diagnostic rapide (TDR) reposant sur des méthodes immunologiques (détection directe d'antigènes streptococciques sur frottis) sont disponibles depuis une vingtaine d'année et largement utilisés. Ces tests rapides, peu coûteux et dont les résultats sont obtenus en quelques minutes ont une spécificité de plus de 90% et une sensibilité de l'ordre de 80 à 90%, améliorable grâce à la qualité du prélèvement.[21]

Etant donné que la majeure partie des IRA ont une origine virale et qu'aucun argument clinique ne permet de différencier une infection virale d'une autre bactérienne, la culture demeure indispensable en ce sens que dans le cas d'une pharyngite aiguë par exemple, elle permettrait d'incriminer réellement un streptocoque bêta hémolytique du groupe A. Dans le cas contraire, elle permettrait d'éviter une surconsommation d'antibiotiques à l'aveuglette, inutile et nuisible.

En pratique, d'après le Conseil Scientifique de Luxembourg, les cultures peuvent remplacer le TDR si un laboratoire de microbiologie est disponible à proximité. Le résultat est obtenu dans un délai de 12 à 24 heures, ce qui est largement suffisant pour décider d'un traitement antibiotique.[21]

Le choix des milieux de culture est fonction des caractères culturels des germes : leur croissance sur milieu ordinaire, enrichi ou sélectif à une température non permissive pour la flore commensale, mais laissant croître certaines bactéries pathogènes.

- Milieu Mac Conkey :

Il a été utilisé pour l'isolement des Entérobactéries. Son choix s'explique entre autres par les différents éléments chimiques qui le composent, à savoir le lactose, le cristal violet et les sels biliaires.

Le cristal violet et les sels biliaires inhibent la croissance des bactéries Gram positif mais également facilitent la multiplication des bacilles à Gram négatif.

Quant au lactose, il permet d'emblée de faire un diagnostic présumptif des différents germes de bacilles à Gram négatif par la fermentation ou non du lactose.

Cependant, nous observons des limites dans la mesure où le Mac Conkey ne permet pas d'isoler certains bacilles à Gram négatif, du fait de leur exigence en facteurs de croissance notamment *Haemophilus influenzae*. [55]

- GSC+ Polyvitex :

La culture d' *Haemophilus influenzae* qui est un germe exigeant, s'est faite sur gélose chocolat qui elle contient les facteurs X et V indispensables pour sa croissance. [52]

- Gélose chocolat ou gélose au sang cuit

L'adjonction de sang à ce milieu a été indispensable à la croissance des Streptocoques à cause de l'action catalasique de l'hémoglobine. De plus, ce milieu décrit aisément la zone d'hémolyse franche et complète qui entoure les colonies. Cependant, certains auteurs comme DIOP F. avait utilisé le CLED et la gélose au chlorhydrate de pyridoxal pour isoler ces streptocoques. Il faut noter que l'isolement sur CLED n'a pas beaucoup d'importance car ce milieu ne nous donne aucune information sur le type d'hémolyse qui est un caractère fondamental pour l'identification des streptocoques.

4.1.4 Identification

Pour une bonne identification des espèces bactériennes, il a fallu une lecture après les différentes colorations de Gram des colonies prédominantes et celles des caractères biochimiques, grâce aux microméthodes d'identification des Streptocoques, Haemophilus, Entérobactéries, les micro CSB. Pour ce qui est des bacilles à Gram négatif non fermentaires, c'est plutôt les caractères de la mini galerie qui ont été utilisés.

Ainsi, sur 330 souches isolées, 151 ont pu être identifiées. Le reste correspondant à des cultures négatives, à des pertes d'échantillon ou tout simplement des échantillons rejetés.

L'identification a été performante grâce aux caractères microbiologiques suivant :

- Pour *Streptococcus pneumoniae*, la morphologie des colonies, la susceptibilité à l'optochine et la solubilité dans la bile.
- Pour *Streptococcus pyogenes*, l'agglutination de particules de latex et le test à la bacitracine le distinguent des streptocoques bêta-hémolytiques.

Vu l'existence d'une pléthore de germes responsables d'IRA, nous nous sommes limités au diagnostic des deux espèces de streptocoque citées plus haut, parce qu'étant les plus importantes en pathologie humaine.

Contrairement à Tening [63] qui s'est limitée à la phase identification des Streptocoques dans son algorithme, nous avons traité les informations en amont de l'identification, ce qui nous a permis d'avoir une vue panoramique sur la démarche globale.

- Pour *Haemophilus influenzae*, la morphologie des colonies, la croissance sur gélose chocolat, le recours aux facteurs X et V.
- Pour les Entérobactéries, vaste famille, les caractères inérant aux différentes espèces, Ndir a établi un algorithme d'identification des Entérobactéries basés sur des caractères biochimiques. [54]

Dans ce travail, l'accent a été mis sur les germes majeurs (les plus fréquemment rencontrés) des I.R.A. Ce sont essentiellement *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, certaines Entérobactéries : *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Enterobacter cloacae*.

Trois essais diagnostiques ont été effectués sur chaque prélèvement en tenant compte à chaque fois des caractères majeurs pour chaque germe et de légères variations au niveau des caractères biochimiques d'identification.

- Pour *Streptococcus pneumoniae*, la croissance de colonies bêta-hémolytiques le test à l'optochine et la lyse des colonies par les sels biliaires sont des critères nous ayant permis de calculer les probabilités d'obtenir le germe suspecté. S'agissant des valeurs obtenues, il s'avère que les probabilités absolues sont très faibles, avoisinant zéro. le calcul de la variance fait montre de l'étroitesse de différence au cours des trois opérations successivement effectuées. Les résultats ne sont pas significativement différents, c'est ce qui explique la stabilité des résultats lorsqu'on répète la procédure.

En conclusion, la démarche établie pour le diagnostic du pneumocoque donne des résultats fiables et stables. Toutefois, la très faible probabilité montre que l'identification du germe par la démarche est souvent incertaine.

- Pour *Proteus mirabilis* et *Klebsiella pneumoniae*, les moyennes des probabilités obtenues sont respectivement : 0,32 et 0,14. Par ailleurs, la variance obtenue pour ces germes est très faible, ce qui exprime la stabilité des résultats obtenus.

4.2 Analyse des résultats

Un algorithme de diagnostic est validé par la stabilité des résultats obtenus. Il est d'autant plus fiable qu'il permet d'obtenir des résultats sans équivoque. Les algorithmes ont été élaborés en fonction du germe suspecté. Le but de la démarche est d'isoler le germe, en tenant compte de tous ces caractères cumulés, avec une grande probabilité. Cette dernière représente la chance qu'on a d'isoler le germe suspecté. Afin d'apprécier la validité de la démarche, des calculs de probabilité absolue et relative ont été effectués. Seules les probabilités absolues ont été retenues dans la suite du travail¹.

La valeur de la probabilité absolue faible explique les difficultés avec laquelle peut de faire l'isolement du germe. En effet, la distinction de certains caractères permettant d'identifier le germe isolé n'est pas toujours aisée. Les sucres essentiellement « Raffinose » et « tréhalose » présentent parfois des variations de colorations qui ne permettent pas de conclure avec certitude l'identité du germe. Par contre, d'autres germes possèdent des caractères qui aident à les identifier sans ambiguïté.

En conclusion, comme évoqué précédemment, la démarche permet d'aboutir à des résultats stables.

- Pour *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* et *Enterobacter cloacae* ont des caractères qui permettent de les identifier sans ambiguïté selon l'algorithme de diagnostic. Ce sont entre autres : le test de sensibilité à la bacitracine et le test d'agglutination pour le 1^{er}, l'exigence en facteur X et V et la positivité du phénomène de satellitisme pour le 2^{ème}, le test à l'oxydase et le lactose négatif pour le 3^{ème}. Ceci explique l'aisance avec laquelle les germes cités ci-dessus ont été isolés. De ce fait, les probabilités obtenues sont en moyenne

¹ La probabilité relative n'a pas été utilisé parce qu'elle est constante pour certains germes.

supérieures à 0,5. De même, la variance très faible obtenue, permet de conclure qu'au cours de ces trois essais, la démarche entreprise aboutit à de bons résultats.

D'après ce qui précède, il ressort aisément de notre travail que le paramètre phare qui a été utilisé pour la validation est la répétabilité. La reproductibilité de par sa définition n'a pas pu être utilisée parce qu'elle doit s'effectuer dans des laboratoires différents, par des opérateurs différents et un matériel distinct. De plus le temps matériel ne nous a pas permis de nous orienter dans cette voie

Synthèse :

En somme, les algorithmes élaborés sont stables pour les six germes isolés. Néanmoins, pour certains germes, la probabilité absolue est très faible. Cela montre les insuffisances de la démarche de diagnostic de ces germes. Pour d'autres, on obtient des probabilités assez élevées. On dira dans ce cas que l'algorithme est fiable et convient donc à l'identification de ces germes.

La stabilité des résultats montre le caractère répétable (répétabilité) des algorithmes.

4.3 Intérêts et limites de la validation

Intérêts :

Sur le plan épidémiologique, les données microbiologiques issues d'algorithmes s'avèrent essentielles car elles permettent de connaître la fréquence des principaux germes pathogènes par type d'infection, de suivre l'évolution locorégionale et/ou nationale des résistances bactériennes aux antibiotiques et d'adapter éventuellement les schémas de traitement antibiotique empirique en pratique. Il faut le rappeler une fois de plus, l'interprétation des résultats est régie et conditionnée par une bonne qualité des prélèvements.[49] Tant pour le médecin que pour le biologiste, un résultat décevant signifie une perte de temps et

d'argent. Ce qui peut générer de surcroît un diagnostic microbiologique erroné, entraînant l'usage inadéquat des médicaments.

Dans cette suite logique, nous avons obtenu d'excellents résultats à partir de nos algorithmes. Ceci implique que ces résultats peuvent être exploités dans d'autres régions partageant les mêmes facteurs climatiques et géographiques que Dakar, notamment les pays côtiers bénéficiant d'un climat maritime.

Au vu de tout ce qui précède, il apparaît donc impératif que ces sources d'informations ne soient pas taries et que le laboratoire continue à traiter comme il se doit les échantillons prélevés chez des patients ambulants, afin de suivre régulièrement au fil des années, le profil épidémiologique des pathogènes impliqués dans les IRA. A cet égard, on peut signaler l'existence d'un réseau national de laboratoires de microbiologie pour la surveillance des maladies infectieuses, coordonné par l'Institut Scientifique de Santé Publique Louis Pasteur.

Limites :

Contrairement à Ndoye [55] qui a établi un algorithme d'identification sur toutes les entérobactéries, le notre ne permet pas de d'identifier certaines espèces de *Citrobacter*, de *Proteus*.

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..

Seule la répétabilité a été calculée pour valider la méthode. La reproductibilité, qui est un paramètre tout aussi important fait défaut dans cette démarche pour les raisons précédemment citées.



CONCLUSION

Malgré les progrès réalisés dans la connaissance des infections respiratoires aiguës (IRA), le problème d'une démarche diagnostique reste une préoccupation dès lors que la clinique ne permet pas toujours d'établir un diagnostic précis (étiologie bactérienne ou virale d'une infection). Il est souhaitable de promouvoir et de mettre à la disposition du corps médical une démarche diagnostique devant reposer sur des critères de rapidité, de sensibilité et de spécificité.

Il n'existe pas démarche universelle, mais la finalité est de diagnostiquer de la façon la plus fiable possible une souche bactérienne.

Notre étude entreprise avait l'ambition de valider une démarche diagnostique par des calculs de probabilité, et de vérifier ainsi sa fiabilité et sa stabilité, en d'autre terme sa répétabilité et sa reproductibilité.

Cette démarche a été établie dès les conditions de prélèvement jusqu'au processus d'identification du germe. Chaque étape de la démarche a fait l'objet d'une validation. Les facteurs importants suivants ont été pris en compte :

- Les conditions de prélèvement
- Les critères de pathogénicité déterminant le nombre de polynucléaires neutrophiles et devant être strictement supérieur à 10^6 UFC/ml.
- Le choix des milieux d'isolement

La vérification du respect des normes de qualité à toutes les étapes a tenu compte le matériel utilisé : les milieux de cultures, les souches de références par le biais des tests d'efficacité et de stérilité.

Nous avons élaboré des algorithmes de diagnostic, simples et répétables de certaines IRA. Au terme de cette étude au sein du laboratoire de Bactériologie-virologie de l'HALD, l'examen bactériologique a permis d'isoler 131 souches bactériennes. Les cultures négatives ou porteuses de champignons

n'ont pas été retenues dans le cadre du travail qui a porté essentiellement sur les germes majeurs, c'est-à-dire les plus fréquemment rencontrés dans les pathologies infectieuses de l'arbre respiratoire. Nos algorithmes ont permis d'obtenir en respectant la chronologie de la démarche, une probabilité relative de :

100% de *Streptococcus pneumoniae*

100% de *Streptococcus pyogenes*

100% d'*Haemophilus influenzae*

97,3% de *Proteus mirabilis*

99% de *Klebsiella pneumoniae*

98,6% de *Enterobacter cloacae*.

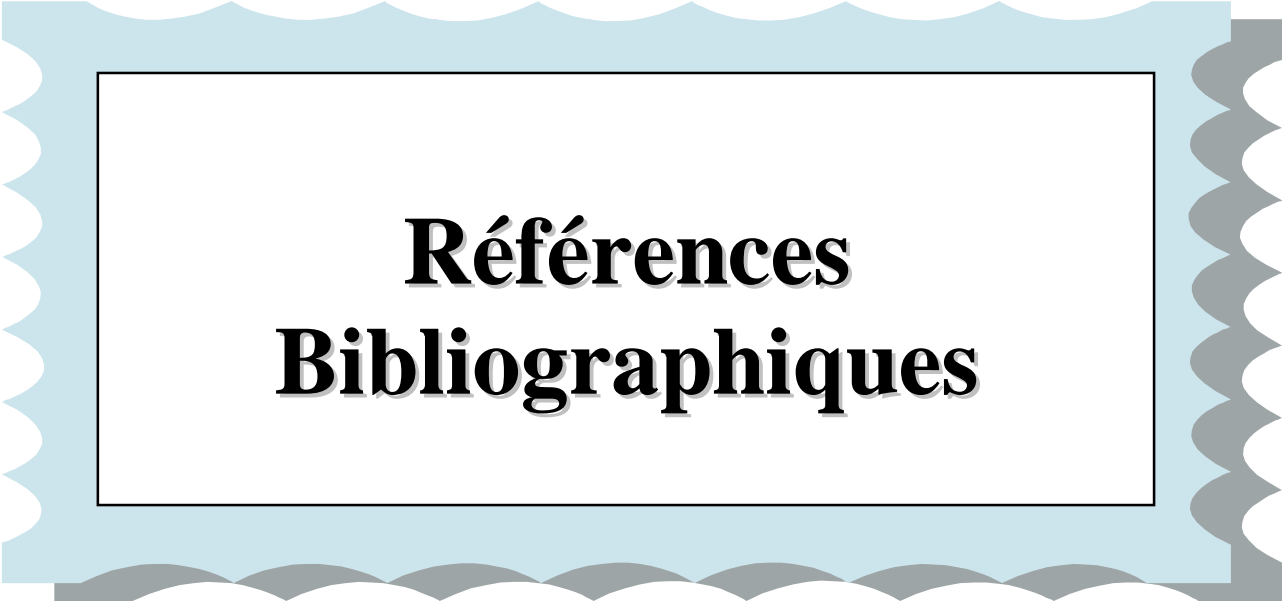
Les probabilités absolues obtenues pour chaque germes ont été respectivement :

$2,6 \cdot 10^{-3}$; 0,88 ; 0,40 ; 0,35 ; 0,14 ; 0,54. Bien que les premières donnent la probabilité d'appartenance à l'espèce, elles n'ont pas intégrées les calculs de validation en raison de leur constance pour certains germes. Ce sont les probabilités absolues qui ont permis de déterminer les moyennes et les variances

Les résultats obtenus au terme des calculs effectués, nous donnent respectivement pour chaque germe, une moyenne de probabilité de :0,002 ; 0,8 ; 0,54 ; 0,32 ; 0,14 ; 0,56 et les variances avoisinant zéro : 0,0000001 ; 0,0014333 ; 0,0002333 ; 0,000433 ; 0,0000023 ; 0,0000333.

Au cours de ces trois essais, il est apparu que certaines espèces présentent des probabilités très faibles et d'autres, très élevées. D'une manière générale, la variance entre probabilité a été insignifiante au cours des trois essais. Les algorithmes sont donc fiables et conviennent à l'identification des germes. La stabilité confirme le caractère répétable de la démarche.

En définitive, la validation d'une démarche de diagnostic microbiologique s'avère indispensable à tous égards, en ce qu'elle permet d'identifier avec précision, le germe responsables, condition sine qua non pour une prise en charge thérapeutique.



**Références
Bibliographiques**

1 - AMMARI H., RAMDAMI-BOURGUES A.N., BELLOUNI R.

Antibiothérapie des infections respiratoires.

Médecine du Maghreb, 2001, n°21.

2 - AMTUNAMO L.

Epidémiologie des infections respiratoires aiguës chez les enfants :

Panorama régional.

www.paho.org (consulté le 12-02-05).

3 – Anatomie de l'oreille

http://www.medecine_et_santé.com/anatomie/anatoreille.html

(consulté le 11-04-06)

4 - ANONYME

Infections respiratoires basses de l'adulte : pneumonie communautaire et bronchite aiguë.

Méd Mal Infect. 1999, 29 : 237-57.

5 - API 20 E

Système d'identification des entérobactéries.

Biomerieux SA France 2004.

6 - API NH

Système d'identification des Neisseria et Haemophilus.

Biomerieux S.A France 2004.

7 - API 20 STREP

Système d'identification des *Streptococcaceae* et germes apparentés.

Biomerieux S.A France 2003.

8 – Appareil respiratoire

www.diffu.sciences.com (consulté le 13-04-06)

9 - AUBRY P.

Infections respiratoires aiguës. Actualité 2005

<http://medecinotropical.free.fr/cours/infrespi.htm> (consulté le 29-03-06)

10 - AURIOL B.

Anatomie et Physiologie : l'écoute est vue

www.auriol.free.fr/clefsons/ClefDesSons/ecoute.htm

(consulté le 10-06-06)

11 - AVRIL J-L., DABERNAT H., DENIS F., MONTEIL N.

Bactériologie clinique.

Ed ellipse, 3^e Ed, Paris 2000 : 49-52.

12 - Bactéries responsables d'IRA.

www.educ.necker.fr/cours/module7/pneumo.pdf.

(Consulté le 29-03-06).

13 - BAKHOUM I.M.N.S.

Contrôle de qualité et validation des différentes microméthodes d'identification bactérienne.

Thèse Pharm., Dakar, 2003, n°42.

14 - BOBOSSI SERENGBE G. BANGUE C. MOBINA T.

Les aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques des bronchiolites aiguës du nourrisson au complexe pédiatrique de Bangui (Centrafrique).

Med.Afr.Noire, 2004, 51 : 217-22.

15 - BOLLAY U., BERGER C., LINDER T.

L'otite moyenne aigue encore en discussion !!!

Forum Médical Suisse.

16- BOUCHERA M.

Pathogénie de l'otite moyenne.

*Rev.int.pediatr.*1998 : 21-23.

17 – CABRAL M.

Validation du contrôle microbiologique de médicaments antituberculeux.

Thèse Pharm., Dakar, 2005, n°42

18 - CADUCEUS EXPRESS

Diagnostic microbiologique des infections des voies aériennes inférieures

www.ichv.ch (consulté le 25-03-06).

19 - CADUCEUS EXPRESS

Legionella

www.consilia.sa.ch (consulté le 23-03-06).

20 - CHABOLLE F., GARABEDIAN E-N.

Décision en ORL.

Ed vigot, Paris, 1996 : 55-58.

21 - Conseil Scientifique – Domaine de la Santé

La pharyngite aiguë, 2006 : 12 p.

22 - Cours de Bactériologie Médicale

Légionelles

<http://www.microbes-edu.org/professionnel/legionnella/legion.html>

(consulté le 25/04/06).

23 - Cours de Bactériologie – DCEM1

Les bacilles à gram négatif hémophiles ou exigeants.

www.chups.jussieu.fr/sites_recommandés/bacterio.html

(consulté le 15-06-06).

24 – DANG NGOC CHAN C.

Voies aériennes supérieures

http://fr.wikipedia.org/wiki/Image:voies_aeriennes_supérieures.png

(consulté le 14-05-06).

25 – DANG NGOC CHAN C.

Voies aériennes inférieures

[http://fr.wikipedia.org/wiki/Image :voies_aeriennes_inferieures.png](http://fr.wikipedia.org/wiki/Image:voies_aeriennes_inferieures.png)

(consulté le 14-05-06)

26 - DECOSTER A.

Les Streptocoques

<http://anne.dexoster.free.fr/strepto/strepto.html>

(consulté le 21-04-06).

27 - DELMEE M .

Microbiologie médicale.

Fac.Med.Univ catholique de Louvain, 2003-2004, 276: 75-100.

28 - DIRLEWANGER M.; VAUDAUX B.; GEHRI M.,FANCONI S.

Pneumonie communautaire de l'enfant : application du diagramme décisionnel de l'OMS en Suisse.

Rev.med.de la suisse romande, 2002, 122 : 95-98.

29 - Encyclopédie Universelle

Algorithme

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Algorithme#D.C3.A9définition>

(consulté le 14-05-06)

30 - Faculté de Médecine Necker-Enfant malades

Bactériologie systématique-DCEM1, 2002-2003 : 10p.

31 - FERRON A.

Bactériologie Médicale

Editions Cet R, 15th Ed, Paris 1994.

32 - GAILLANDRE A., GIBELIN N., MAIGNAN N. et AL

Guide de validation des méthodes de dosage biologique.

STP pharma pratiques, 2002, 12 :1-19.

33 - GEHAMNO P.

Sinusites aiguës de l'adulte .Diagnostic : Prise en charge.

La lettre à l'infectiologue. 2003, 18 :11-16.

34 - GLEBAZA F.S

Streptococcus pneumoniae , *Haemophilus influenzae* , *Moraxella catarrhalis* dans les IRB communautaires à Dakar- Isolement bactérien et sensibilité aux antibiotiques.

Thèse Pharm., 2000, n°81.

35- GLUPCZYNSKI Y.

Intérêts et limites des tests de laboratoires pour le diagnostic des infections communautaires.

Louvain médical, 2000, 118 : 89-93.

36 - HOUNPONOU E.

Etude comparée de l'identification et de la sensibilité de *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes* isolés d'infections humaines. (Données prospectives à Dakar).

Thèse Pharm., Dakar, 2003, n°42.

37 - Infections Respiratoires

www.med.univ-rennes1.fr/elud/pédiatrie/infections_respiratoires.html

(consulté le 18-04-06).

38 - KLOSSEK J.M

Les sinusites et rhinosinusites.

Edition Masson, Paris, 2000 : 59-64.

39 - Le Diagnostic Microbiologique

www.cnvs.nantes.fr (consulté le 18-04-06).

40 - LE MINOR L., VERON M.

Bactériologie médicale.

Flammarion Med.-science, Paris 1989.

41 - LUDWIG HUBER

Validation of analytical methods: review and strategy.

Lab compliance, 2001:1-22.

42 - Les IRA courantes de l'enfant

http://www.med-univ-rennes1.fr/elud/pédiatrie/infections_respiratoires.html

(consulté le 24-03-06).

43 - LOBOGUERRERO M.A.

Contrôle des IRA chez les enfants âgés de 2 mois à 5ans.

<http://www.scholar.google.com/newweb.paho.org/french/hcp/hct/imci/aicp :1-18.pdf> (consulté le 07/04/2006).

44 - LOMBARD B.

Les essais inter laboratoires en Microbiologie des aliments.

Thèse de doctorat à l'institut national agronomique Paris –guignon, 2004

45- MARCHINA J.C.

Les infections ORL : rhinites, angines, sinusite, otite....

Edition Albin Michel S.A 1994: 16-19; 42-47.

46 - MARSHALL E. M.

Place des germes non exigeants et les bactéries anaérobies dans les infections respiratoires basses à Dakar.

Thèse Pharm., 2000, n° 90.

47 - Métrologie et Accréditation Suisse

Guide pour la validation de méthodes d'essais microbiologiques et l'évaluation de leur incertitude de mesure dans les domaines de la microbiologie alimentaire et de l'environnement.

Ed Février 2006, Rev 01.

48 - MOUNA B., SOUZET S., ROTYKES P.

ORL- Stomatologie

Edition heure de France, 1999 : P23.

49 - MOUTON Y., BIGNOLAS G., CHIDIAC C., et AL

Recommandation sur la prise en charge de la pathologie infectieuse respiratoire.

Méd.Mal.Infect. 1995, 25 :1021-28.

50 - MURRAY PR., WASHINGTON SA.

Microscopic and Bacteriologic analysis of expectorated sputum.

Mayo Clinic Proc, 1975, 50 : 339-44.

51 - NAUCIEL C.

Bactériologie médicale.

Edition Masson Paris ,2000 :151-153, 225-33.

52 – NDIAGNE M.

Examen cyto bactériologique des crachats, lavage bronchoalvéolaire et aspiration bronchique dans les infections respiratoires aiguës

Thèse Pharm.,Dakar, 2005, n°56

53 - NDIAYE M. L.

Validation des méthodes de contrôle microbiologique des médicaments antibiotiques.

Thèse Pharm., Dakar, 2003, n°54.

54 - NDIR I.

Mise au point d'une micro méthode d'identification des entérobactéries

Thèse Pharm., Dakar, 1996, n°65.

55 - NDOYE R.

Algorithmes d'identification des Entérobactéries et des Bacilles à Gram négatif non fermentaires

Thèse Pharm., Dakar, 2004, n° 83

56 - OFFREDO C., GEHARANNO P., BERCHE P

Epidémiologie de la flore nasopharyngée au cours des OMA de l'enfant de décembre 2000 à mars 2001.

Méd.Mal.Inf., 2003 : 93-203.

57 - PEDIATRICS

Diagnostics and management management of Acute Otitis Média.

Pediatrics 2004, 113 : 1451-65.

58 - PINA G., RAYNAUD D.

Critères de choix d'une méthode d'identification.

DES Bactériologie –urologie 2003 :1-27.

59 - Poumons

[Http://fr.wikimedia.org/wiki/poumons](http://fr.wikimedia.org/wiki/poumons) (consulté le 27-06-06).

60 - RAOBIJAONA H.

Infections respiratoires aiguës hautes (IRAH) en milieu pédiatrique à Antananarivo.

Méd. Afr. Noire. 2000, 47 :142-44.

61 - ROCHE N.

Antibiotiques et infections respiratoires basses : les messages ne passent pas !

Rev Mal Respir, 2001, 18 : 103-104.

62 - Santé et Bien être Social CANADA

Manuel du programme d'assurance de la qualité des travaux de laboratoire de la direction des médicaments.

<http://dsp-psd.pwg.sc.gc.ca/collection/h42-2-26-1990f.pdf>

(consulté le 07-04-06)

63 - SARR T.

Algorithmes d'identification des Staphylocoques à coagulase négative et des Streptocoques non groupables.

Thèse Pharm., Dakar, 2004, n °84.

64 - SEGUIN P., MALLEDANT Y.

Prise en charge d'une pneumopathie communautaire grave.

Editions scientifiques et médicales Elsevier, 2000 : 685-702.

65 - SOW A.

Métabolisme bactérien dans l'isolement et l'identification de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et de *Moraxella catarrhalis*.

Thèse Pharm., Dakar, 2005, n°53.

66 - SULIKOWSKA A., GRZESIOWSKI P., SADOWY E.

Characteristics of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* Isolated from the Nasopharynges of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* Strain Replacement in the Nasopharynx
J. Clin. Microbiol., 2004, 42 : 3942-49.

67 - Système Respiratoire

www.ulg.ac.be/histohum/cours/module-respiratoire.pdf

(consulté le 03-04-06).

