

# MÉTHODE EXPÉRIMENTALE D'IDENTIFICATION DES BACTÉRIES

1<sup>er</sup> décembre 2009

## 1 introduction

Durant ces dernières années, les infections humaines occupent une place importante en pathologie infectieuse en raison de leur fréquence et de leur gravités. Les agents responsable de ces infections sont les bactéries.

Les enterobactéries, les bacilles à Gram négatif non fermentaires et plus d'autres types encore constituent une famille de bactéries<sup>1</sup> responsables de nombreuses maladies dont certains sont graves voire très graves. La détection de la présence de ces bactéries chez un patient s'effectue au moyen de tests cliniques portant sur des substances (urine, selles, sang, salive,..) prélevées sur le patient. Ainsi le diagnostic micro-biologique et le traitement de ces infections imposent une identification correcte de l'agent Étiologique en vue d'une bonne prise en charge thérapeutique.

Les bactéries se différencient généralement de leurs morphologies et leurs caractéristiques en vers les substances chimiques. A cela, l'étude de la morphologie bactérienne est le premier acte effectué par un laboratoire de diagnostic pour identifier une bactérie. L'observation de la morphologie bactérienne permet une orientation préliminaire du diagnostic.

Dans ce qui suit, il est question d'identifier une bactérie parmi lesquelles un ensemble soumis à différents tests biochimiques. Et alors qu'est-ce que c'est identifier une bactérie ?

---

1. pas de commentaire

L'identification d'une bactérie consiste habituellement à faire un test sur une souche pure des bactéries, et de la comparer avec un grand nombre d'autres espèces jusqu'à retrouver celle correspondante. Pour cela, des diverses techniques ont été implanté dans cette approche d'identification de ces bactéries, parmi lesquelles l'apport des techniques moléculaires permet parfois de s'affranchir de la mise en culture et de proposer une alternative aux tests phénotypiques.

Il en existe plusieurs autres méthodes possibles pour effectuer l'identification des bactéries :

- **Méthodes exactes**<sup>2</sup> : elles mettent en action des moyens d'analyse en laboratoire, lourds et coûteux qui les rendent inapplicables à grande échelle. Ce sont elles qui ont permis de constituer les échantillons tests qui ont été utilisées pour tester les autres méthodes.
- **Méthodes d'identification phénotypiques** : sont les plus utilisées dans les laboratoires de biologie médicale. La stratégie consiste à sélectionner au mieux les caractères les plus discriminants. Ces méthodes nécessitent une incubation préalable, la culture doit être pure.
- **Méthodes probabilistes-Maximum de Vraisemblance** : elles utilisent des grilles de tests binaires commercialisables par différentes firmes<sup>3</sup> (API,...) et accompagnées d'une matrice donnant pour chaque bactérie identifiable, sa probabilité de réaction positive à chaque test (utilisant dans ce contexte l'analyse Bayésienne). C'est une méthode dont on l'utilisera par la suite ;
- **Méthode de Surclassement - ELECTRE II** : c'est une ancienne méthode d'identification dans laquelle son utilisation n'est pas nécessaire dans notre étude ;
- ...

L'identification d'une bactérie est plus ou moins poussée en fonction de l'intérêt clinique, car c'est aux cliniciens dont repose cette pertinente recherche.

---

3. des galeries API

---

On identifie aussi une bactérie en observant si elle utilise tel ou tel substrat. On la met donc en contact dans un milieu de culture avec un glucide, ou un peptide, ou d'autres substrats plus complexes. On peut révéler l'utilisation de ce substrat par virage<sup>4</sup> d'un indicateur de pH car un glucide utilisé donne un produit acide, un peptide donne un produit basique, etc. La mise en évidence de certains caractères peut nécessiter aussi une période d'incubation pour permettre la consommation de substrats.

De nos jours, le monde biologique utilise le plus fortement possible les galeries d'identification biochimique<sup>5</sup>. Ces galeries permettent une identification rapide et efficace (parfois en moins de 24 h) des bactéries.

La systématique permet d'identifier une souche bactérienne inconnue grâce à différents examens et à l'utilisation de milieux de culture spécifiques pour ainsi aboutir à identifier une unique bactérie .

Cependant, en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation considérés la souche des bactéries soumise à différents tests biochimiques, dont on a recueilli les résultats du tests en forme de pourcentages correspondant aux résultats attendus. Et alors, pour bien identifier une souche bactérienne il a fallu quelques outils biologiques et aussi mathématiques et bien entendu avec leurs méthodologies déterminantes.

Dans les lignes qui suivent, nous spécifierons les matériels et les différentes méthodologies d'identification de ces bactéries.

## 2 Matériels

### 2.0.1 Matériels Biologiques

L'objectif primordiale de cette étude est de parvenir à une bonne identification voir une excellente identification . Pour cela, l'unité de recherche et de biotechnologie bactérienne (Micro système-CSB ) du laboratoire de bactériologie- virologie du centre hospitalier universitaire Aristide Le Dantec(HALD) a mis au point quelques matériels biologiques permettant de réaliser des tests biochimiques sur des souches spécifiques pour la réalisation d'identification des bactéries proprement dite.

---

4. changement de couleur

5. galeries API par exemple

---

C'est ainsi que des études ont été faites sur des souches bactériennes de références et de contrôles utilisant des matériels d'identifications( Bec bensen, Etuve, ...), des matériels pour la préparation de l'inoculum(Autoclave, Micropipettes, Boîte de pétris en matières plastiques, ...), des matériels pour la conservation des souches(Tubes nunc, Tubes stériles à vis, Cryotubes à billes, ...), y compris des milieux pour l'isolement, l'enrichissement et la conservation des souches(Gélose Chapman, Gélose au sang ordinaire, Gélose Müller Hinton,...) ainsi que des réactifs(Alpha-naphtol, Alpha-naphtylamine, Gélose à la DNase, Acide sulfanilique, NaOH, ...) etc.

Relativement à ces études, ils portaient principalement sur des espèces de bactéries spécifiques appartenant par exemples aux genres Streptococques, Staphylococcus et Enterococcus comme signaler dans la plus part des thèses<sup>6</sup>. Il faut cependant mentionner qu'en ce qui concerne les contrôles, chaque lot de milieu préparé était soumis à un contrôle de stérilité et à un contrôle d'efficacité sur le plan bactériologique.

Le contrôle de stérilité a été réalisé par incubation des plaques pendant 24 à 48 heures et après révélation de certains tests. Le lot de plaques était considéré comme stérile en l'absence de tout virage de l'indicateur coloré et de réactions positives pour les tests révélés.

Et alors, les galeries stériles étaient soumises à un contrôle d'efficacité dont deux plaques étaient pour chaque galerie (plaques positives et négatives). Deux autres contrôles ont été ajustée : Contrôle des appareils(l'étuve maintenue dans la plus part des tests à 37 C ) et Contrôle des paramètres dynamiques.

## 2.0.2 Outils Statistiques

De nos jours on rencontre de plus en plus de bases de données assez énormes sur lesquelles on aimerait s'en procurer dans un bref délai le maximum d'informations possibles. De nombreux logiciels d'analyses statistiques sont à la disposition du statisticien : SAS, STATA, SPSS, R,...

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes contentés d'utiliser les logiciels tels que :

---

6. thèse de SOKHNA et al.

---

R : qui est un environnement de programmation statistique interfaçable avec C et Fortran. Il a été initialement créé par Robert Gentleman et Ross Ihaka du département de statistique de l'Université d'Auckland en Nouvelle Zélande ;

CABIQ : Classification automatique et identification automatique de bactéries phytopathogènes de quarantaine. C'est un logiciel développé dans le cadre du projet national conjoint I.N.R.A. / D.G.A. numéroté 493. Développement effectué pour l'I.N.R.A. d'Angers et le L.N.P.V. d'Angers en 2004.

Nous éluciderons le rôle de chacun de ces logiciels dans la phase méthodologie.

## 3 Méthodologie

### 3.0.3 Méthodes Biologiques

Les moyens d'identifications bactériologiques par les outils biologiques sont entre autres :

- l'identification phénotypique ;
- Examen direct ;
- des examens microscopiques et macroscopiques .

En ce qui concerne l'identification phénotypique, ce sont des méthodes les plus utilisées dans les laboratoires de biologie médicale. La stratégie consiste à sélectionner au mieux les caractères les plus discriminants. Ces méthodes nécessitent une incubation préalable, la culture doit être pure. La mise en évidence de certains caractères peut nécessiter aussi une période d'incubation pour permettre la consommation de substrats.

Du point de vue examen direct, c'est une méthode qui peut être à elle seule très informative pour le clinicien et même suffisante dans un contexte d'urgence (mais restant à confirmer).

Ainsi qu'au dernier point, l'intérêt porte sur le développement de la bactérie et son isolement (obtention d'une culture pure pour les tests phénotypiques), ses caractères culturels etc.

Les souches bactériennes ont été recueillies de leurs milieux de conservation comme signaler dans quelques documents de thèses<sup>7</sup>. Une suspension bactérienne a été formée avec l'eau physiologique puis centrifugée.

---

7. thèse de Sokhna Fall et al.

---

La suspension formée a été par la suiteensemencée sur le milieu de culture et des études ont été réalisées sur l'effet de l'inoculum et du temps d'incubation par des galeries sur l'identification des bactéries. Ainsi le travail réalisé utilisant les deux procédures suivantes :

1. ◦ une préparation des inocula dont il était question de déterminer la teneur en bactéries viables par la méthode de dénombrement bactérien sur boîte de pétris ;
2. ◦ un ensemencement des galeries d'identification Micro-CSB de quelques exemples cités ci-haut avec ces mêmes inocula. L'observation de ces galeries à intervalle de temps régulier a permis de déterminer le temps minimum nécessaire à une identification de ces souches bactériennes.

Ainsi les galeries Micro-système CSB sont constituées d'un certain nombre de tests biochimiques utilisées dans le laboratoire le DANTEC. Ces galeries ont mis en évidence soit des activités enzymatiques, soit l'assimilation de substrats carbonés en milieu approprié ou hostile.

A cela, utilisant ces différents tests et méthodes il est arrivé quelques fois d'aboutir à des identifications telles que :

- excellente identification ;
- très bonne identification ;
- bonne identification ;
- identification acceptable ;
- ... .

Les méthodes phénotypiques, et notamment les systèmes automatisés sont éprouvés et performantes pour l'identification d'un grand nombre d'espèces de bactéries. Cependant ces performances sont limitables pour l'identification de certaines souches.

Par exemple, les souches typiques de *Escherichia coli* 1 et *Salmonella Paratyphi A* ont montré un pourcentage d'identification correct de respectivement 90 à 100 pour-cents et 80-90 pour-cents pour d'autres souches<sup>8</sup>.

En revanche ces pourcentages pour des souches atypiques ne sont plus que de 0-80 pour-cent et 25-80 pour-cent. D'une manière générale, le taux d'erreur des galeries varie entre 5 et 20 pour-cents selon les galeries considérées, comprenant les identifications incorrectes (1-15 pour-cent) ou les identifications non concluantes (3-5 pour-cent).

---

8. thèse de NADIA SARR

---

Les systèmes<sup>9</sup> d'identification commercialisés sont des systèmes fermés avec des bases de données limitées. Leur mise à jour si elle est possible, ne peut se faire que par le fabricant de la galerie. Les nouvelles espèces ne sont donc pas prise en compte. Une bactérie absente du thésaurus<sup>10</sup> des galeries d'identification ne sera pas reconnue mais un ou plusieurs noms seront proposés. C'est la connaissance de la présomption d'espèce et des limites de la galerie qui permettent de rectifier l'identification.

Notons pour clôturer cette partie que, pour n'importe quelle souche bactérienne considérée on aboutira soit à une identification acceptable, soit une très bonne identification, ... mais quelques fois à des identifications erronées. Et pour se rassurer d'avantage, les biologistes ont fait appel aux outils mathématiques et surtout statistique pour pallier ces sérieuses difficultés.

A cela nous montrerons dans les lignes qui suivent, en utilisant ces outils<sup>11</sup> aboutira-t'on à fort pourcentage à des très bonnes identifications ?

### 3.0.4 Traitements Statistiques

Pour les tests miniaturisés, l'identification d'une souche de bactéries inconnue est basée sur la mesure de similitude entre son profil et celui des espèces identifiables à l'aide des données recueillies (tables diagnostiques, feuille excel des données).

Dans ce qui suit, notre première idée était de coder les tests en :

- o 1 :si le test correspondant est positive ;
- o 0 :si le test est négative.

Et alors, notre principal objectif est de déterminer une bactérie ( $B_i$ ) correspondant à un germe inconnu quelconque  $U$  dont la probabilité de ce germe sachant les différents tests soit maximale. Ensuite pour ce genre de calcul, il va falloir utiliser quelques hypothèses pour l'utilité de cette procédure :

- o hypothèse d'indépendance de tests ;
- o les probabilités de tests constantes ;
- o la supposition des probabilités à priori constantes .

Finalement, le problème se ramène au calcul des vraisemblances données par :

$$L_i = Pr[T_1, \dots, T_N | U = B_i]$$

Avec  $U$ =le germe inconnu ;  $B_i$ =la bactérie potentielle ;

---

9. systèmes API

10. répertoire des bactéries

11. outils statistiques

---

$X_{ij}$  : sont les valeurs données dans la grille (dans la table des données)

$T_j$  = réaction codée du germe  $U$  au test  $j$  ;

par convention :

$T_j = 1$  en cas de réaction positive et 0 sinon. ;  $L_i$  = la vraisemblance en question.

D'autres transformations étaient encore possible et ceci nous conduit à une vraisemblance finale :

$$L_i = \prod_1^N Y_{ij}(U)$$

ou :

$$Y_{ij} = \begin{cases} X_{ij} & \text{si } T_j = 1 \\ 1 - X_{ij} & \text{si } T_j = 0 \end{cases}$$

$Y_{ij}$  représentent les probabilités que le germe inconnu et la bactérie  $i$  réagissent de la même façon au test  $j$ .

### 3.0.5 Avantages de la méthode

1. ◦ Grande facilité de calcul
2. ◦ Obtention de scores visualisant les "chances relatives" de chaque bactérie d'être le germe  $U$ .
3. ◦ Possibilité de tenir compte de probabilités a priori.

### 3.0.6 Inconvénients de la méthode

1. ◦ Le résultat est très lié aux valeurs numériques contenues dans la grille. Or, on sait que certaines probabilités  $X_{ij}$  ont été estimées sur des échantillons assez petits (maladies rares et/ou très dangereuses) que ces valeurs changent dans le temps (évolution des souches notamment en réaction aux antibiotiques) et selon les régions (une grille API différente devrait être construite selon les continents voire selon les pays).
2. ◦ Le résultat est très dépendant d'éventuelles erreurs techniques : erreurs de codage (en pratique les codes binaires sont convertis "à la main" en octal inverse), erreurs d'appréciation (un test est jugé positif si l'on observe un changement de couleur du réactif : ce changement peut être difficile à apprécier or tous les tests sont censés être faits). Une erreur de lecture ou de codage transformant un "1" en "0" ou l'inverse peut éliminer définitivement la "bonne" bactérie.



3.
  - Les bactéries à profils contrastés (peu de valeurs 0 et de valeurs 1 pour les  $X_{ij}$  donc peu de valeurs 1 pour les  $Y_{ij}$ ) ont toujours une vraisemblance faible et sont désavantagées vis-à-vis des bactéries présentant peu de variétés de réaction.

Pour cela, il nous en reste encore d'autres transformations à venir.

Nous avons effectué une analyse en composantes principales sur le nuage des tests pour vérifier si certains tests contribuaient significativement plus que d'autres aux premiers axes principaux (expliquant le plus de variance). C'est effectivement le cas, même si tous les tests contribuent au moins un peu à tous les premiers axes. Empiriquement, dans le but d'accroître le pouvoir discriminant de la méthode pour des échantillons réactifs au contrôle de qualité.

Cette analyse statistique nous a permis de discriminer les bactéries se rapprochant du test de référence. A ce qui suit, les bactéries bien identifiées par des galeries API sont exactement déterminées par cette analyse, mais dans d'autres plaques où il n'y a pas de bonnes identifications on est arrivé à se poser quelques différentes interrogations :

- ◦ doit-on conserver la bactérie la plus proche du test de référence et enlever les plus écartées ?
- ◦ doit-on enlever les tests dont les valeurs nulles sont majoritaires ?

L'application de ces deux questions résout au minimum notre problème, mais nous conduit à perdre trop d'informations donc on ne peut pas l'utiliser.

Toujours en partant de l'analyse en composantes principales, on a suggéré un mode de calcul assez complexe des pondérations traduisant le plus fidèlement possible le pouvoir discriminant de chaque test. Cette technique a donné lieu à deux jeux de poids (stratégie COR et COV) selon que l'analyse en composantes principales utilisait une matrice de corrélation ou de covariance.

Cette magnifique notion statistique vient appuyer la dispersion des tests et même des individus (inconnus en question) du point de vue classique à identifier les bactéries recherchées.

Notons que le but de l'analyse en composantes principales est de :

- ◦ représenter sous forme graphique l'essentiel de l'information contenue dans un tableau de données quantitatives (individus=bactéries, variables=tests).
  - ◦ d'analyser les corrélations entre les variables et d'identifier des bactéries se différenciant fortement des autres.
-

- o et aussi de trouver les relations existantes entre les variables( qui sont les différents tests biochimiques) et aussi de visualiser les tests qui influent ou pas dans cette dispersion ;
- o visualiser les distances entre les individus qui sont les bactéries.

La méthode précédente<sup>12</sup> a été très bien spécifiée par un corps professoral. Ce dernier a mis un logiciel à la disposition de l'identification et classification automatique de ces bactéries. Alors dans le paragraphe suivant nous montrerons en quoi ce logiciel est utile pour notre étude.

### 3.0.7 Utilisation de CABIQ

CABIQ est un petit logiciel de classification automatique et d'identification de bactéries de quarantaine qui utilise des fichiers de données au format Dbase. L'utilisation exacte de CABIQ a été illustrée par un petit exemple<sup>13</sup>.

Pour pouvoir identifier la bactérie en question on procède à la comparaison de chaque ligne de la matrice. Chaque ligne représente un germe d'une espèce ou un bio-groupe d'une espèce. Pour mener à bien l'identification, on commence par calculer la liaison entre l'individu inconnu et chaque taxon. Cette liaison est quantifiée par une valeur numérique nommée "produit d'association global" ou "coefficient de vraisemblance" (likelihood) calculé comme le produit des liaisons entre l'individu inconnu et chaque test, la liaison étant calculée par la formule :

liaison entre individu inconnu et test pour le taxon :

$$\begin{aligned} &= \text{la fréquence du test pour le taxon} \\ &\quad \text{si la valeur de l'individu au test est } 1 \\ &= 1 - \text{fréquence du test pour le taxon} \\ &\quad \text{si la valeur de l'individu au test est } 0 \end{aligned}$$

Les produits d'associations globaux sont ensuite pondérés de deux façons :

- o le produit d'association relatif est obtenu en divisant le produit d'association global par le plus grand produit d'association global ;
- o le produit d'association normalisé est obtenu en divisant le produit d'association global par la somme des produits d'associations globaux

Le produit d'association normalisé est nommé également score d'identification de ou probabilité de Wilcox ou pourcentage d'identification.

---

12. utilisation des vraisemblances

13. <http://www.info.univ-angers.fr/pub/gh/Idas/Wcabiq/ccug/anal1.html>

---

Il reste maintenant à valider le choix du taxon. Pour cela, on commence par calculer les coefficients modaux globaux (ou coefficients globaux de modalité) pour les taxons. Comme pour les produits d'associations globaux, le coefficient modal global pour un taxon est le produit des coefficients modaux locaux de chaque test pour le taxon, calculé comme suit :

le coefficient modal local du test pour le taxon  
 = la fréquence du test pour le taxon si  
 cette fréquence est supérieure à 0.5  
 =1-fréquence du test pour le taxon si  
 cette fréquence est inférieure à 0.5

La validation de l'identification est donnée par les probabilités modales de l'appartenance de l'individu au taxon, nommées aussi fractions modales de vraisemblance, calculées comme le rapport "produit d'association global sur coefficient modal global". Voici un exemple d'utilisation de cabiq :

Considérons les données d'ESCHERICHIA COLI étudiées dans la thèse de NADIA SARR.

profil	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
E.vulneris	1.00	0.00	0.50	0.00	0.30	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.01	1.00
E.fergusoni	1.00	0.00	0.99	1.00	0.01	0.00	0.00	0.00	1.00	0.99	0.00	0.93
E.coli2	1.00	0.00	0.45	0.20	0.01	0.00	0.01	0.01	0.99	0.90	0.42	0.05
E.coli1	1.00	0.00	0.74	0.70	0.01	0.00	0.03	0.01	0.99	0.98	0.91	0.95

Et voici la sortie du logiciel :

Groupe	produit d'association			Coefficients modaux	
	valeur	Freq.scorID	relatif	valeur	probabilité.validn
E.vulneris	0.0035	4.75	5.63	0.3465	1.01
E.fergusoni	*0.0000	*0.00	*0.00	0.9023	*0.00
E.coli2	0.0080	10.84	12.84	0.2096	3.81
E.coli1	0.0622	84.41	100.00	0.4130	15.06

Le vecteur identifié ressemble fortement au groupe numéro 4 soit E.coli1 (score 84 pourcent).

Annotons que les coefficients tels que : Freq.scorID, relatif,valeur(coefficients modaux) et probabilité.validn sont exprimés en pourcentage.

L'utilisation de CABIQ pour les identification est automatique et il suffit

d'entrer une matrice, une souche ou d'en exporter et le résultat d'identification est immédiat.

La procédure du calcul est la même que celle utilisé dans la table taxonew(par les galeries API et/ou maximum de vraisemblance), mais pour ce point il est question d'entrer les valeurs de la matrice en nombre décimaux.

Par exemple :

$$\begin{array}{|c|c|} \hline 100 & 99 \\ \hline 98 & 76 \\ \hline \end{array} \Rightarrow \begin{array}{|c|c|} \hline 1.00 & 0.99 \\ \hline 0.98 & 0.76 \\ \hline \end{array}$$

En définitive, même CABIQ rencontre des difficultés d'identification des bactéries car c'est la même procédure de la méthode ci-haut. Et pour surmonter cette petite difficulté on fera peut être appel à d'autres outils à venir<sup>14</sup>.

## 4 CONCLUSION

En définitive, nous avons vu qu'il n'existe pas une ligne de conduite d'identification bactérienne même si les biologistes trouvent des identifications meilleures avec leur méthodes.

De nombreuses méthodologies existent aujourd'hui basées sur des caractéristiques phénotypiques des germes et de plus en plus moléculaires. La démarche diagnostique doit donc tenir compte des critères de chaque méthodologie (rapidité, spécificité, sensibilité..) et l'organiser selon la forme de l'entonnoir en partant du plus simple et informatif au plus compliqué et précis (notamment en épidémiologie). Il n'y a donc pas de démarche universelle la finalité étant de diagnostiquer de manière la plus fiable une souche bactérienne.

Il reste toujours difficile de retrouver en toute objectivité, une identification exacte des bactéries avec ces différentes méthodes citées pour d'autres galeries API.

En réalité,on ne dispose pas encore de nouvelles méthodes d'identification jusqu'à nos jours. Donc nos méthodes(biologiques comme statistiques) utilisées sont parmi les meilleures de par leurs fiabilités,leurs spécificités et leurs sensibilité.

---

14. plus tard

---

## Références

- [1] NADIA SARR : *Validation des méthodes d'identification d'entérobactéries*  
Thèse de pharm, DAKAR, 2009.
  - [2] ABOU SENE : *Validation des méthodes d'identification bactériennes des bacilles à gram négatif*  
Master2, Université Gaston Berger, S.T.A.F.A.V UFR S.A.T 2008.
  - [3] SOKNA FALL : *Étude de l'effet innoculum et du temps d'incubation sur l'identification des cocci à Gram positif*  
Thèse de pharm DAKAR 2008, N° 100.
  - [4] D'ERNEVILLE MARIE M : *Etude de l'effet de l'inoculum et du temps d'incubation sur l'identification des bacilles à gram négatif* Thèse de pharm., DAKAR, 2008, N° 106.
  - [5] OULIMATOU GUEYE : *Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à Gram négatif*  
Thèse de pharm, DAKAR, 2007, N° 36.
  - [6] DIOP RAMATOULAYE : *Standardisation et optimisation d'une micro-méthode d'identification des bacilles à Gram négatif non-fermentaires*  
Thèse de pharm, DAKAR 2001, N° 75.
  - [7] ROKHAYA NDOYE : *Algorithme d'identification des entéro-bactéries et des bacilles à gram négatif non-fermentaires*  
Thèse de pharm, DAKAR, 2004.
  - [8] SOW MAME FATOU : *Utilisation des méthodes biométriques pour la validation de identification des cocci à Gram positif*  
Thèse de pharm, DAKAR, 2007, N° 48.
  - [9] IBRAHIM NDIR : *Mise au point d'une micro-méthode d'identification des entéro-bactéries*  
Thèse de pharm, DAKAR, 1996, N° 05.
  - [10] MALIK NDIR : *Etude comparée des CMI des différentes molécules d'Antibiotiques sur des souches de Streptococcus pneumoniae et Streptococcus pyogenes à l'origine d'infections respiratoires*  
Thèse Pharm., DAKAR, 2003, N° 18.
  - [11] BAKHOUM IPHIGENIE : *Contrôle qualité et validation de différentes micro-méthodes d'identification bactérienne*
-

Thèse de pharm, DAKAR 2004.

- [12] SOKHNA KHADY NDAO : *Mise au point d'une microbiologie d'identification biochimique des Staphylocoques* Thèse Pharm., DAKAR, 1996, N° 44
  - [13] GERALDINE PINA, DELPHINE RAYNAUD : *Critères de choix d'une méthode d'identification*  
DES bactériologie-virologie, 2003.
  - [14] JOURNAL : *identification of streptococcus species, enterococcus species and morphologique similar organisms*  
Health Protection Agency.
  - [15] JOURNAL : *identification of glucose non-fermenting rods*
  - [16] JOURNAL : *identification of staphylococcus species, micrococcus species and stomatococcus species*
  - [17] Wikipédia <http://fr.wikipedia.org/wiki/Microbiologie>
-