



# FACULTE DE PHARMACIE

## DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES (D.E.S) DE BIOLOGIE CLINIQUE

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2018-2019

TITRE :

Sérotypes de *Streptococcus pneumoniae*  
responsables de méningites bactériennes au  
Mali de 2014-2018

### MEMOIRE

Présenté et soutenu le \_\_\_\_/\_\_\_\_/2020

Par Mr. (Mme) Hawa SANOGO TRAORE

Pour obtenir le DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES (D.E.S) EN BIOLOGIE  
CLINIQUE

**JURY:**

**PRESIDENT:** Pr Flabou BOUGOUDOGO

**MEMBRES :**

1 Dr Ibrehima GUINDO

2 Dr Issa KONATE

**DIRECTEUR DE MEMOIRE :** Pr Abdoulaye DJIMDE

# Table des matières

Dédicaces

Remerciements

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

	Pages
Introduction .....	1
<b>1. OBJECTIFS.....</b>	<b>1</b>
1.1. Objectif général .....	1
1.2. Objectifs spécifiques.....	1
<b>PREMIERE PARTIE : Généralités.....</b>	<b>2</b>
<b>2. Aspects microbiologiques du pneumocoque .....</b>	<b>3</b>
2.1. Taxinomie.....	3
2.2. Habitat.....	5
2.3. Caractères bactériologiques .....	5
2.3.1. Caractères morphologiques.....	5
2.3.2. Caractères cultureux.....	6
2.4. Caractères Biochimiques .....	7
2.5. Structure antigénique.....	8
2.5.1. Facteurs de virulence .....	9
2.5.2. Autres substances biologiquement actives .....	11
<b>3. Physiopathologies .....</b>	<b>13</b>
3.1. Pathologies pulmonaires .....	13
3.1.1. Pneumonie franche lobaire aiguë.....	13
3.1.2. Infections broncho-pulmonaires .....	13
3.2. Méningites purulentes .....	13
3.3. Otites moyennes aiguës .....	14
<b>4. Diagnostic clinique .....</b>	<b>14</b>
4.1. Cas suspect de méningite pour la recherche de cas.....	14
4.2. Méningite bactérienne probable .....	14
4.3. Méningite à pneumocoque confirmée.....	14
<b>5. Diagnostic biologique .....</b>	<b>15</b>
5.1. Collecte des échantillons .....	15

5.1.1.	Volume des échantillons à collecter .....	15
5.1.2.	Stockage et transport .....	15
5.1.3.	Conservation à long terme.....	16
5.2.	Tests de la bactériologie classique.....	16
5.3.	Technique de PCR en temps réel .....	17
5.3.1.	Technologies de détection .....	18
5.3.2.	Cycle seuil (Threshold cycle) .....	20
6.	Pneumocoque et vaccins.....	21
6.1.	Vaccin polyosidique 23- valent .....	21
6.2.	Vaccin 13 valent (Pevnar ®13) .....	22
<b>DEUXIEME PARTIE : Matériels et méthodes .....</b>		<b>23</b>
1.	<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>24</b>
1.1.	Cadre théorique : Présentation de l'INSP.....	24
1.2.	Type de l'étude.....	25
1.3.	Echantillonnage .....	25
1.7.	Matériels et méthodes.....	26
1.7.1.	Equipements.....	26
1.7.2.	Réactifs et consommables .....	28
1.7.3.	Méthode.....	29
<b>TROISIEME PARTIE : Résultats et discussions.....</b>		<b>32</b>
1.	Résultats .....	33
1.1.	Résultats généraux : fréquence, âge, saison, Répartition géographique des méningites à pneumocoque .....	33
1.2.	Caractérisation des sérotypes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	37
2.	Commentaires .....	48
2.1.	Résultats généraux .....	48
2.2.	Caractérisation des sérotypes .....	50
<b>Conclusion et perspectives</b>		
<b>Recommandations</b>		
<b>Références</b>		
<b>Résumé en français</b>		
<b>Résumé en Anglais</b>		

## Dédicaces

Ce travail est dédié à ma famille, particulièrement à mes enfants qui me donnent toujours le courage d'avancer et qui représentent les raisons de tous mes combats.

## Remerciements

Ce travail n'aurait pas été concrétisé sans le concours d'un bon nombre de personnes qui, chacune à leur façon, ont apporté une aide précieuse à sa réalisation. C'est pour cette raison que je tiens à leur exprimer ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

A mon mari **Abdoulaye A TRAORE** ;

Peu sont les hommes qui ont ton sens du sacrifice. Merci pour ton accompagnement, ta compréhension, ton soutien indéfectible et surtout pour ta patience. Que Dieu te bénisse et nous donne longue vie auprès de nos enfants.

Au **Professeur Flabou BOUGOUDO**, Maître de conférences en Bactériologie-virologie à la Faculté de Pharmacie de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako.

Merci pour avoir accepté de présider ce jury.

Au **Professeur Abdoulaye DJIMDE**, Professeur titulaire en parasitologie à l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, Directeur du Malaria Research Training Center- Parasitologie (MRTC- Parasitologie), Responsable de l'unité d'Epidémiologie Moléculaire et de Chimio-résistance du MRTC, Président de African Association for Research and Control of Antimicrobial Resistance (AAAMR)

Tous mes remerciements pour avoir accepté d'encadrer ce travail.

Au **Docteur Ibrehima GUINDO**, Maître-assistant en Bactériologie-virologie à la Faculté de Pharmacie de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, chef du Département Laboratoire et recherche biomédicale de l'INSP,

Encore merci pour avoir mis à ma disposition les ressources nécessaires à la réalisation de ce travail, mais aussi pour avoir accepté de codiriger les travaux de ce mémoire, pour votre aide, votre accompagnement et disponibilité, vos encouragements et votre patience.

Au **Docteur Issa KONATE**, Maître-assistant en Maladies infectieuses à la Faculté de Médecine de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, CHU Point G,

Merci pour avoir accepté de participer à ce jury, soyez sûr que cela contribuera largement à l'amélioration de la qualité de ce travail.

A toute l'équipe du **Département de Diagnostic Biologique de l'INSP**, particulièrement à Mr Brehima ZERBO pour m'avoir épaulé pendant toute la réalisation technique de ce Travail.

Ma plus profonde reconnaissance au **Professeur Amagana DOLO**, Professeur agrégé de parasitologie-mycologie à la Faculté de pharmacie de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, coordinateur du DES de Biologie Clinique et Directeur de

l'Ecole Doctorale des Sciences et Technologies du Mali pour son engagement et pour avoir conduit le bateau à bon port.

Je suis également reconnaissante envers tous mes collègues du Centre de Santé de Référence de la commune III :

Aux **Dr N'DIAYE Hawa THIAM** et **Dr Athanase DIAWARA** pour leur flexibilité ;

A mes frères et sœurs par Alliance : **Sanougbé KOUYATE, Youma Soudou TRAORE, Ester THERA, Guediouma BOUARE, Aboubacar Naciré** ;

Vous m'avez tous autant que vous êtes soutenu, chacun à sa manière. Merci pour tout et surtout continuez d'être cette équipe de choc que vous avez toujours été.

A mes camarades de la **2<sup>e</sup> promotion du DES de Biologie Clinique** de la Faculté de Pharmacie de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako. Nous sommes à présent des frères. Puisse Dieu accroître l'élan de solidarité et de cohésion qui a toujours régné entre nous.

A mes **frères et sœurs et leurs familles** pour leur soutien au quotidien depuis toujours : Hassim, Mohamed, Diarha et Moussa SANOGO.

Merci à toutes les personnes qui ont participé de près comme de loin à la réalisation de ce Travail.

## Liste des tableaux

Tableau I : Classification de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	4
Tableau II : Caractères biochimiques de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	7
Tableau III: Classification danoise de Lund des 92 sérotypes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	9
Tableau IV: schémas des séries de réactions pour le sérotypage de <i>Streptococcus pneumoniae</i> par rtPCR (21 sérotypes) .....	31
Tableau V: Fréquence des serotypes /serogroupes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolés dans les LCS .....	38
Tableau VI : Répartition des cas de méningites à <i>Streptococcus pneumoniae</i> en fonction des tranches d'âge.....	40
Tableau VII : Répartition des sérotypes les plus fréquents en fonction des mois .....	41
Tableau VIII: Répartition des sérotypes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolés en fonction de leur appartenance ou non au vaccin.....	42
Tableau IX : Répartition des sérotypes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolés selon qu'ils appartiennent au vaccin ou non en fonction des tranches d'âge. ....	43
Tableau X : Répartition des sérotypes / sérogroupes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolées en fonction des régions.....	45
Tableau XI : Répartition des sérotypes / sérogroupes les plus fréquents de <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolées à Bamako, Koulikoro et Sikasso.....	46

## Liste des figures

Figure 1: Morphologie de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	5
Figure 2 : Aspects des colonies de <i>Streptococcus pneumoniae</i> (souche muqueuse) .....	7
Figure 3 : Hybridation de 2 sondes (Hybridization probes) .....	20
Figure 4 : Exemple de feuille de calcul Excel pour la préparation de la solution de travail (Mix).....	29
Figure 5 : Exemple plan de plaque pour l'amplification .....	30
Figure 6 : Fréquence d'isolement de <i>Streptococcus pneumoniae</i> par an.....	33
Figure 7 : Répartition des patients à LCS positif au <i>Streptococcus pneumoniae</i> en fonction de leur âge. .....	34
Figure 8 : Fréquence d'isolement de <i>Streptococcus pneumoniae</i> par mois.....	35
Figure 9 : Répartition des cas de méningites à <i>Streptococcus pneumoniae</i> en fonction de la région de provenance du patient.....	36
Figure 10 : Répartition des sérotypes / sérogroupe les plus fréquents de <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolées à Bamako, Koulikoro et Sikasso.....	47

## **Sigles et abréviations**

ANC : Acide Nalidixique Colistine

ANSSA : l'Agence Nationale de la Sécurité Sanitaire des Aliments

ADN : Acide Desoxy-Ribo Nucléique

ADH : Arginine di-hydrolase

AMI : Amidon

ARA : L-Arabinose

BHS : bouillon hypersalé

CDC : Center for Disease Control and Prevention

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CNAM : Centre National d'Appui à la Lutte contre la Maladie

CO<sub>2</sub> : Dioxyde de Carbone

DOU – SP : Département des Opérations d'Urgence en Santé Publique

CREDOS : Centre de Recherche et de Documentation pour la Survie de l'enfant

CRP : Protéine C Réactive

Ct : Threshold Cycle

CR1 : Cell-Receptor 1

CR2 : Cell-Receptor 2

CVD : Centre de Développement des Vaccins

dl : Décilitre

ESC : Esculine

GLY : Glycérol

*Hib* : *Haemophilus influenzae* type b

Ig A : Immunoglobuline A

IL : InterLeukine



INSP : Institut National de Santé Publique

INU : Inuline

LCS : Liquide Cérébro Spinal

LAC : Lactose

MAN : Mannitol

mm<sup>3</sup> : millimètre cube

mg : milligramme

ml : millilitre

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORL : Oto-Rhino-Laryngologie

PCV : Vaccin Pneumococcique Conjugué

pH : potentiel d'Hydrogène

PMT : Tube Photo-Multiplicateur

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

RAF : Raffinose

RIB : Ribose

rtPCR : real time Polymerase Chain Reaction

*S. pneumoniae* : *Streptococcus pneumoniae*

SOR : Sorbitol

SOS : Sorbose

T-I : Trans-Isolate

T<sub>m</sub> : Température de dissociation

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

TRE : Tréhalose

VP : Réaction de Voges-Proskauer

## Introduction

Les infections bactériennes invasives, en particulier les infections à *Streptococcus pneumoniae* constituent les causes majeures de mortalité et de morbidité surtout chez les nourrissons et les enfants de moins de 5 ans à travers le monde [1, 2]. Il s'agit entre autres des méningites, pneumonies et septicémies. *Streptococcus pneumoniae* est l'une des premières étiologies des méningites bactériennes avec *Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae type b (Hib)*.

Ce sont des maladies graves de par leurs complications (méningoencéphalites, septicémies et choc hémodynamique) qui peuvent conduire éventuellement à la mort, surtout chez les enfants de moins de 5 ans lorsque la prise en charge n'est pas précoce et adaptée.

Au Mali *Neisseria meningitidis* était la bactérie la plus incriminée dans les cas d'épidémies et communautaires de méningites bactériennes avant l'introduction du vaccin MenAfrivac en 2010 [3]. *Haemophilus influenzae* occupait la deuxième place avant de voir le nombre de cas diminué après l'introduction du vaccin pentavalent contre *Haemophilus influenzae type b (Hib)* en 2007 [1].

De nos jours *Streptococcus pneumoniae* constitue le chef de file des bactéries responsables de méningites bactériennes et l'OMS estime qu'il survient 250.000 à 400.000 décès par an dus à *Streptococcus pneumoniae*. Environ 70% des cas de décès d'enfants par an par suite de pneumonie se trouvent en Afrique et au Sud-Est Asiatique [4]. L'incidence annuelle est de 250 pour 100 000 chez les enfants de moins de 5 ans [5].

Une étude de surveillance réalisée sur les infections invasives chez les enfants de 0 à 16 ans hospitalisés dans le service de Pédiatrie de l'hôpital Gabriel Touré de juin 2002 à mai 2003, a estimé l'incidence de l'infection à pneumocoque à 44 pour 100 000 chez les enfants de 0 à 4 ans avec une létalité d'environ 10 % [6].

De 2005 à 2007, la surveillance épidémiologique au Mali a montré qu'environ 30% des cas confirmés de méningite étaient dus à *Streptococcus pneumoniae* [3].

Face au poids de la maladie, et en vue de réduire la mortalité et la morbidité dues à l'infection chez les enfants, le Mali a introduit dans le Programme Elargi de Vaccination (PEV), le vaccin anti pneumocoque (Pevnar 13®) en 2011. Ce dernier contient 13 antigènes correspondant à 13 sérotypes fréquemment responsables de méningite. Cependant, la fréquence d'isolement de *Streptococcus pneumoniae* reste encore élevée chez les enfants.

En 2012 *Streptococcus pneumoniae* occupait la 2ème place parmi les différentes étiologies de la méningite (18,8%) après *Neisseria meningitidis* W135 (63,0%) [3].

En 2014, nous avons réalisé une étude sur la caractérisation des souches de *Streptococcus pneumoniae* chez les enfants de 0 à 5 ans et nous trouvions que sur 58 cas identifiés, *Streptococcus pneumoniae* était prédominant avec 62,1% (36 cas). Sur ces 36 cas, 13 n'étaient pas typables par les techniques de la PCR en temps réel. Les sérotypes 2 et 12F/12A/12B/44/46, non inclus dans le vaccin actuellement utilisé dans le PEV de routine étaient majoritairement représentés avec respectivement 11,1% et 16,7 %. Parmi les sérotypes inclus dans le vaccin, le sérotype 1 était le plus fréquent. La méthode de PCR en temps réel utilisé n'explorait que 21 sérotypes /sérogroupes. Certains sérogroupes n'avaient pas pu être dissociés [7].

Cette situation a soulevé plusieurs questions. Quels sont donc les sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* responsables de méningite au Mali ? Le vaccin actuellement utilisé dans le PEV permet-il de protéger contre les infections à pneumocoque, particulièrement des méningites à pneumocoque ?

La présente étude issue des recommandations de la précédente se propose donc de déterminer les sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* circulant au Mali, responsables de méningites après l'introduction du vaccin Prevnar 13® sur un nombre d'échantillon plus représentatif.

## **1. OBJECTIFS**

### **1.1. Objectif général**

Etablir la cartographie des sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* responsables de méningites après l'introduction du vaccin Prevnar13® entre 2014 et 2018 au Mali.

### **1.2. Objectifs spécifiques**

- Déterminer la fréquence des sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* circulants au Mali entre 2014 et 2018 par les techniques de la PCR en temps réel.
- Déterminer la fréquence des sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* en fonction des caractéristiques socio-démographiques, épidémiologiques et des saisons.

## **PREMIERE PARTIE : Généralités**

## 2. Aspects microbiologiques du pneumocoque

### 2.1. Taxinomie

*Streptococcus pneumoniae* appartient au :

- Règne : Bacteria
- Phylum : Firmicutes
- Classe : Bacilli
- Ordre : Lactobacillales
- Famille : Streptococcaceae
- Genre : *Streptococcus*
  - Ce genre comprend actuellement 44 espèces et sous-espèces, regroupées en trois ensembles : pyogènes, oraux et du groupe D (Tableau I).
  - Dans l'ensemble des streptocoques pyogènes :
    - *Streptococcus pyogenes* est l'espèce type du genre ; c'est le streptocoque  $\beta$ - hémolytique du groupe A.
    - *Streptococcus agalactiae* possédant l'antigène de groupe B est souvent désigné streptocoque B.
    - Dans le sous-ensemble 3, on trouve les streptocoques  $\beta$ - hémolytiques des groupes C, G ou L.
    - Les souches des sous-ensembles 4 et 5, non hémolytiques, sont d'origine animale.
  - Dans l'ensemble des streptocoques du groupe D, on trouve trois espèces commensales du tube digestif de l'homme et des animaux.
    - *Streptococcus bovis* est le plus fréquemment isolé.
  - Les streptocoques oraux correspondent aux streptocoques autrefois dénommés viridans. Ils sont, pour la plupart, alpha- ou non- hémolytiques et non groupables.
    - *Streptococcus pneumoniae* est inclus dans l'ensemble des streptocoques oraux, mais reste dans le Bergey's manual, édition 1986, parmi les *Streptocoques pyogènes* pour son pouvoir pathogène.
    - Les streptocoques oraux sont regroupés en cinq sous-ensembles (or1, or3 à or6)

*Streptococcus pneumoniae* constitue à lui seul le sous-ensemble or3. L'analyse génomique montre une étroite similitude entre *Streptococcus pneumoniae* et les espèces *Streptococcus mitis* et *Streptococcus oralis*. Ces trois espèces sembleraient capables d'échanger entre elles des fragments d'acide désoxyribonucléique (ADN) formant ainsi une mosaïque complexe, plutôt que trois espèces séparées [8].

Tableau I : Classification de *Streptococcus pneumoniae*. [8]

<b>PYOGENES</b>	<b>GROUPE D</b>	<b>ORAUX</b>
<b>Sous-ensemble 1</b>	<i>S. bovis</i>	<b>Sous-ensemble 1</b>
<i>S.pyogenes</i>	<i>S. equinus</i>	<i>S.mitis, S.sanguis</i>
	<i>S.alactolyticus</i>	<i>S.oralis</i>
		<i>S.gordonii</i>
<b>Sous-ensemble 2</b>		<b>Sous-ensemble 2</b>
<i>S.agalactiae</i>		
<b>Sous-ensemble 3</b>		<b>Sous-ensemble 3</b>
<i>S.equismilis</i>		<i>S. pneumoniae</i>
<i>S.dysgalactiae</i>		
<b>Sous-ensemble 4</b>		<b>Sous-ensemble 4</b>
		<i>S.milleri</i>
<b>Sous-ensemble 5</b>		<b>Sous-ensemble 5</b>
		<i>S.mutans</i>
		<b>Sous-ensemble 6</b>
		<i>S.salivarius</i>

## 2.2. Habitat

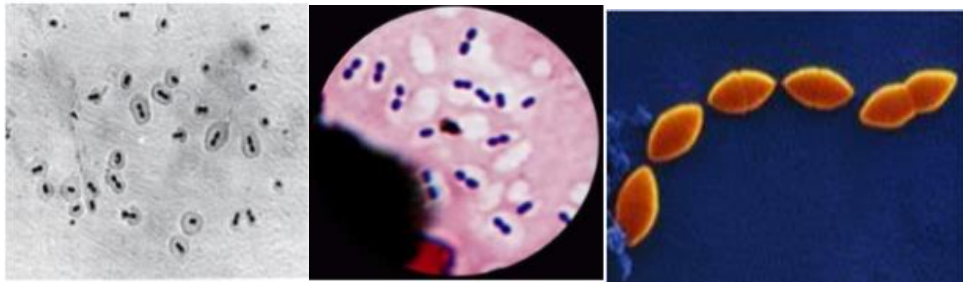
*Streptococcus pneumoniae* est un commensal des voies aériennes supérieures (rhinopharynx). C'est un germe essentiellement humain. Il est très rarement isolé chez les animaux. Il y a une colonisation précoce chez les enfants de moins de 2 ans. La transmission est aérienne. Il est fragile et survit peu dans le milieu extérieur [9].

## 2.3. Caractères bactériologiques

### 2.3.1. Caractères morphologiques

A l'examen microscopique, le pneumocoque se présente comme des Cocci Gram positif (0.5 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre) immobiles, en diplocoques ovoïdes, lancéolés, en flamme de bougie capsulée, en "8" ou en courtes chaînettes (figure 1).

Les formes virulentes sont capsulées. Cependant, l'aspect n'est pas toujours évocateur. Par exemple, si l'environnement est carencé en magnésium ou en présence d'anticorps dirigés contre le sérotype capsulaire, on peut observer des chaînettes relativement longues. Dans certains cas, si le malade est sous traitement, les pneumocoques peuvent prendre un aspect pseudobacillaire. Dans certains produits pathologiques fibrineux et dans les cultures anciennes, le pneumocoque prend mal le Gram et peut apparaître Gram négatif [10].



a)

b)

c)

a) b) : Aspect en diplocoque et de la capsule de *Streptococcus pneumoniae* après coloration au Gram

c) : Aspect lancéolé et en flamme de bougie de *Streptococcus pneumoniae* à la microscopie électronique

Figure 1: Morphologie de *Streptococcus pneumoniae*. [9]



## **2.3.2. Caractères cultureux**

### **2.3.2.1. Milieux de culture**

La culture de *Streptococcus pneumoniae* nécessite l'adjonction de facteurs de croissance. Les milieux les plus couramment utilisés sont la gélose Trypticase soja, la gélose Columbia ou la gélose Mueller-Hinton enrichies de 5 % de sang de cheval ou de mouton. On peut utiliser également la gélose chocolat dont la composition est proche de celle du milieu de Mueller Hinton dans lequel sont incorporés 1 % d'hémoglobine et un mélange polyvitaminique remplaçant les facteurs de croissance du sang. La culture en milieu liquide se fait en bouillons cœur-cerveille ou Todd-Hewitt tamponnés qui favorisent la croissance bactérienne. L'utilisation d'un milieu sélectif comme la gélose Columbia ANC (acide nalidixique, colistine) permet l'inhibition de la flore bactérienne à Gram négatif des produits polymicrobiens. L'addition de gentamicine à la concentration de 6 µg/ml rend le milieu sélectif au pneumocoque [8].

### **2.3.2.2. Conditions de culture**

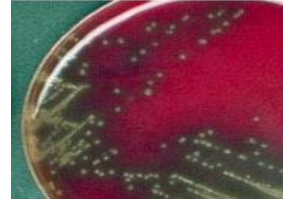
*Streptococcus pneumoniae* est une bactérie anaérobie - aérotoleant. L'anaérobiose est parfois indispensable en primo-culture. C'est un germe exigeant. Sa culture peut être réalisée à une température comprise entre 25 et 42°C et à des pH situés entre 6,5 et 8,3. En routine, on cultive le germe en 24 à 48 heures, entre 35 et 37°C. Le pH optimal est de 7,8. Ce germe nécessite des conditions d'anaérobiose ou tout au moins une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> à 5%.

### **2.3.2.3. Aspect macroscopique des colonies**

Le pneumocoque se présente sous forme de petites colonies transparentes, rondes, brillantes, non pigmentées, gouttes de rosée, ayant tendance à confluer, de 0,5 à 1,5mm de diamètre. Les colonies sont entourées d'une zone d'hémolyse incomplète ou  $\alpha$  (pneumolysine) avec un verdissement du milieu, comme les streptocoques viridans. Les pneumocoques en culture sont sujets à une autolyse spontanée ; une ombilication au centre de la colonie correspond à un début d'autolyse (figure 2). Les colonies ont un aspect muqueux lorsque la capsule est de grande taille. Plus les capsules sont grandes, plus les colonies sont grosses (type smooth ou S). Des colonies rugueuses, d'aspect ridé, sont rarement observées ; elles sont formées par des souches non capsulées [11].



a) *Streptococcus pneumoniae* sur la gélose chocolat



b) *Streptococcus pneumoniae* sur la gélose au sang frais

Figure 2 : Aspects des colonies de *Streptococcus pneumoniae* (souche muqueuse) [9].

#### 2.4. Caractères Biochimiques

Le pneumocoque ne possède ni catalase, ni peroxydase, ce qui induit l'accumulation de l'eau oxygénée responsable en partie de son autolyse. Ce germe fermente le glucose, le lévulose, le maltose, pousse sur la gélatine sans la liquéfier. D'autres caractères biochimiques de *Streptococcus pneumoniae* sont présentés dans le Tableau II. Les galeries biochimiques s'avèrent décevantes quant à la discrimination de *Streptococcus pneumoniae* des autres streptocoques [6].

Tableau II : Caractères biochimiques de *Streptococcus pneumoniae*. [11]

Test	VP	ESC	ADH	BHS	ARA	MAN	SOR	TRE	RAF	SOS	INU	LAC	RIB	AMI	GLY
Résultat	-	-	d	-	-	-	-	+	+	d	d	+	-	-	d

VP : Réaction de Voges-Proskauer      RAF : Raffinose      (-) = Caractère négatif  
 ADH : Arginine di-hydrolase      SOS : Sorbose      (+) = Caractère positif  
 ESC : Esculine      INU : Inuline      (d) = Caractère variable  
 ARA : L-Arabinose      LAC : Lactose  
 BHS : bouillon hypersalé      RIB : Ribose  
 MAN: Mannitol      AMI : Amidon  
 SOR: Sorbitol      GLY : Glycérol  
 TRE: Tréhalose

Trois caractères biochimiques essentiels permettent de différencier *Streptococcus pneumoniae* des autres streptocoques  $\alpha$  hémolytiques :

- Sensibilité à l’optochine
- Lyse par la bile et les sels biliaires
- Sensibilité à la vancomycine en anaérobiose avec aspect dentelé et hémolyse alpha autour du diamètre d’inhibition.

## **2.5. Structure antigénique**

La caractérisation antigénique des pneumocoques se fait essentiellement à l’aide de la capsule qui est un polysaccharide immunogène.

Ce polysaccharide antigénique est à la base de la classification sérotypique des pneumocoques. Les sérotypes sont classés selon deux nomenclatures, une américaine et une danoise qui reste la plus couramment usitée. Dans la classification danoise, les sérotypes antigéniquement proches sont réunis en 46 sérogroupes numérotés de 1 à 48. Elle classe 90 sérotypes de pneumocoques. Ils sont tous potentiellement pathogènes pour l’homme [12]. Actuellement la classification danoise de Lund comprend 92 sérotypes capsulaires différents regroupés en 45 sérogroupes (Tableau III). En 2007, l’équipe de Park et al décrit le sérotype 6C, un variant du sérotype 6A, par échange au niveau du polysaccharide capsulaire d’un résidu galactose par un résidu glucose [13]. En 2009, cette même équipe décrit un sérotype expérimental, le 6D, en modifiant génétiquement le sérotype 6B (transfert expérimental du locus du gène codant pour la glucosyltransferase du sérotype 6C sur un sérotype 6B) [14].

Tableau III: Classification danoise de Lund des 92 sérotypes de *Streptococcus pneumoniae*

1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B,6C,6D, 7F, 7A, 7B, 7C, 8, 9A, 9L, 9N, 9V, 10F, 10A, 10B, 10C, 11F, 11A,11B, 11C, 11D, 12F, 12A, 12B, 13, 14, 15F, 15A, 15B, 15C, 16F, 16A, 17F, 17A, 18F, 18A,18B, 18C, 19F, 19A, 19B, 19C, 20, 21, 22F, 22A, 23F, 23A, 23B, 24F, 24A, 24B, 25F, 25A,27, 28F, 28A, 29, 31, 32F, 32A, 33F, 33A, 33B, 33C, 33D, 34, 35F, 35A, 35B, 35C, 36, 37,38, 39, 40, 41F, 41A, 42, 43, 44, 45, 46, 47F, 47A, 48

Il existe 21 sérogroupes /sérotypes qui sont les plus fréquents particulièrement en Afrique :1,5,23F,4,6A/6B/6C/6D,9V/9A,14,18C/18B/18A/18F,19F,3,7F/7A,19A,6C/6D, 12F/12A/12B/44/46,22F/22A, 15A/15F,23A, 33F/33A/37, 2,11A /11D,16F.

### 2.5.1. Facteurs de virulence

La paroi de *Streptococcus pneumoniae* est composée de peptidoglycane et d'acides teichoïques majoritairement représentés par le polysaccharide C commun à toutes les souches de *Streptococcus pneumoniae* quel que soit le sérotype. Le peptidoglycane est constitué de chaînes polysaccharidiques de N-acétyl glucosamine et d'acide N-acétylmuramique reliés par des ponts peptidiques. Celui-ci est surmonté d'une capsule épaisse composée de polysaccharides. Les facteurs majeurs de virulence de *Streptococcus pneumoniae* sont la capsule bactérienne et la pneumolysine [15].

#### 2.5.1.1. Capsule bactérienne

La capsule est le premier facteur de virulence découvert et le plus important. Elle a l'aspect d'un gel muqueux constitué de polymères homo- et hétéropolyosidiques de haut poids moléculaire (500 à 2000 kDa) branchés ou linéaires et spécifiques du type capsulaire. C'est le premier antigène connu, non protéique, qui induit une réponse anticorps sans pour autant induire de réponse mémoire. Toutes les souches isolées chez l'homme sont capsulées [16].

Les polysaccharides capsulaires sont à l'origine de la classification sérotypique. La différence de virulence est attribuée à la qualité du polysaccharide qui est respectivement constitué de glucose et d'acide glucuronique ou de glucose uniquement. De même, à composition égale, la quantité de capsule influe sur la virulence d'une souche puisqu'une diminution de la production de polysaccharide capsulaire diminue la virulence [17]. L'influence de la composition de la

capsule sur la virulence a été confirmée, des souches de sérotypes 6, 5 et 2 transformées en sérotype 3 ont respectivement une virulence augmentée, diminuée ou inchangée [15].

Le rôle de la capsule est fondamental. Seules les souches capsulées possèdent un pouvoir pathogène expérimental. Ce complexe polysaccharidique forme un gel hydrophile à la surface de la bactérie.

#### **2.5.1.2. Antigènes capsulaires**

Ils sont de nature polysaccharidique complexé avec des aminoacides. Ils peuvent être mis en évidence par gonflement capsulaire, contre-immuno-électrophorèse ou agglutination.

#### **2.5.1.3. Pneumolysine**

Protéine de 53 kDa, la pneumolysine, est une toxine cytoplasmique libérée dans le milieu extérieur sous l'action d'une autolysine, la *LytA*. Elle appartient à la famille des toxines thiol activables. Sa pathogénicité est multifonctionnelle : elle est d'une part liée à son activité cytotoxique sur les cellules respiratoires et endothéliales et d'autre part à un effet pro-inflammatoire. Dans les méningites, la pneumolysine entraîne la destruction des jonctions serrées des cellules endothéliales de la barrière hémato-méningée. Elle joue aussi un rôle dans l'apoptose neuronale et dans la survenue de surdité post-méningitique [18].

La pneumolysine est responsable d'une diminution de l'activité bactéricide des monocytes et des polynucléaires neutrophiles. Il y'a également inhibition de la prolifération des lymphocytes et réduction de la synthèse des anticorps. La partie C-terminale de la pneumolysine est capable de se fixer aux fragments Fc des immunoglobulines et C1q du complément. Cette région possède aussi des séquences homologues à celle de la protéine C-réactive (CRP), une protéine de l'inflammation qui opsonise normalement les bactéries et favorise ainsi l'activation du complément par la voie classique en l'absence d'anticorps [18]. En activant et en détournant le système du complément au profit du pneumocoque, la pneumolysine permet la libération des fragments C3a et C5a qui provoquent l'afflux et l'activation des polynucléaires, et l'amplification de la réaction inflammatoire avec production de cytokines pro-inflammatoires telles IL-1 et le TNF alpha, aboutissant à la destruction de l'épithélium des voies respiratoires supérieures et des alvéoles sans qu'il y ait pour autant destruction du pneumocoque [15].

La pneumolysine est immunogène et les anticorps produits confèrent une solide immunité contre les infections pneumococciques [19]. Les mutants de pneumocoque dont le gène codant

pour la pneumolysine a été inactivé ont une virulence atténuée mais non abolie, ce qui souligne que d'autres facteurs jouent aussi un rôle dans la virulence du pneumocoque.

## **2.5.2. Autres substances biologiquement actives**

D'autres facteurs sont déterminants dans l'expression de la virulence du pneumocoque. Les principaux facteurs de virulence sont classés en fonction du type de réponse qu'ils induisent chez l'hôte [16,20].

### **2.5.2.1. Antigènes somatiques**

#### **2.5.2.1.1. Substance C**

C'est un polysaccharide, spécifique d'espèce constitué d'acide téichoïque. Elle peut parfois contaminer les polysaccharides capsulaires et peut être responsable de réactions croisées. Sa composition chimique est analogue au polysaccharide C des streptocoques mais elle est différente du point de vue antigénique.

#### **2.5.2.1.2. Antigène R**

Il est de nature protéique, souvent inapparent, car masqué par l'antigène capsulaire.

#### **2.5.2.1.3. Antigène M**

Est de nature protéique spécifique de type assez proche de l'antigène M des streptocoques du groupe A.

#### **2.5.2.1.4. Protéines PspA et PspC (pneumococcal surface protein)**

Ce sont des protéines de surface qui jouent un rôle dans la virulence par leur activité anti phagocytaire par inhibition de la voie alterne du complément. Les autres facteurs n'agissent qu'après la lyse bactérienne. Parmi eux, les éléments de la paroi bactérienne induisent des réactions inflammatoires puissantes. Le peptidoglycane active la voie alterne du complément, les acides téichoïques permettent l'attachement aux cellules activées. Certaines protéines hydrolytiques cytoplasmiques (neuraminidase, hyaluronidase, immunoglobuline A1 protéase) contribuent aux phénomènes de colonisation et d'invasion systémique.

#### **2.5.2.1.5. Acides teichoïques**

Ils sont impliqués dans la paroi bactérienne et interviennent dans les réactions inflammatoires majeures.

#### **2.5.2.1.6. Neuraminidase**

Elle agit sur les acides sialiques (rôle dans les atteintes neuroméningées). Il aide à l'adhésion aux cellules épithéliales et à la colonisation du système respiratoire.

#### **2.5.2.1.7. Autolysine**

Elle libère lors de la lyse des germes les différents facteurs intervenant dans la virulence.

#### **2.5.2.1.8. IgA protéase**

C'est une enzyme protéolytique qui, spécialement, clive la région charnière de l'IgA humain qui domine le plus les surfaces muqueuses. Cette protéase est exprimée chez toutes les souches de streptocoque et joue un rôle majeur dans les résistances des pathogènes aux réponses immunes [21].

#### **2.5.2.1.9. Hyaluronidase**

Facilite la migration des pneumocoques du site de colonisation au système vasculaire et participe au processus d'invasion de l'hôte et induit notamment des méningites.

La contribution relative de ces différents facteurs selon les souches et le foyer infecté permet d'expliquer les divers degrés de sévérité des infections. L'étude approfondie des facteurs de virulence et la découverte de nouvelles protéines ou voies métaboliques impliquées dans la virulence permettront d'améliorer la compréhension de la pathogenèse du pneumocoque. Les facteurs protéiques PspA, NanA..., constituent de nouvelles cibles pour la découverte de molécules plus sûres et de vaccins plus performants [22].

### **3. Physiopathologies**

Le pneumocoque est responsable d'infections communautaires bénignes ou graves. Certains terrains immunologiques prédisposent à des infections graves (splénectomie, traits immunosuppresseurs, déficits d'anticorps). Elles peuvent survenir à tous les âges de la vie avec une incidence plus élevée chez les jeunes enfants et les personnes de plus de 60 ans.

*Streptococcus pneumoniae* colonise les muqueuses respiratoires. Il s'en suit une adhésion spécifique aux cellules épithéliales. Au niveau du foyer infectieux, il y a une réaction inflammatoire et un afflux cellulaire en plus d'un relargage de médiateurs chimiques et de substances chimiotactiques d'origine cellulaire et humorale, en particulier, le système du complément qui joue un rôle important dans l'immunité naturelle et acquise de l'hôte contre les infections pneumococciques. Le pouvoir pathogène dû à la capsule confère les propriétés anti-phagocytaires et les autres facteurs de virulence tels que les adhésines et les substances élaborées permettent l'adhésion et la diffusion de *Streptococcus pneumoniae* [9]. Ils provoquent ainsi entre autres :

#### **3.1. Pathologies pulmonaires**

##### **3.1.1. Pneumonie franche lobaire aiguë**

Elle se manifeste par la fièvre, les crachats sanglants, le point de côté thoracique avec un risque élevé de dissémination sanguine (mortalité 20%).

##### **3.1.2. Infections broncho-pulmonaires**

Elles sont plus ou moins sévères. Les facteurs prédisposants sont le tabac, une infection virale, la pollution.

#### **3.2. Méningites purulentes**

À partir d'un site infectieux ORL ou pulmonaire, le pneumocoque doit passer la barrière hémato-méningée et produire une inflammation pour entraîner une méningite purulente. De nombreux arguments sont en faveur d'une induction de bactériémies intenses et prolongées permises par la capacité du pneumocoque à survivre dans le sang. Ces bactériémies rendent possibles un ensemencement du liquide cérébro-spinal (LCS) par voie hématogène. Dans le LCS, les moyens de défense sont limités et le pneumocoque va pouvoir entraîner une méningite, essentiellement par une réaction inflammatoire polynucléaire-dépendante. La présence de pneumocoques vivants ou d'éléments de sa paroi déclenche la production in situ de cytokines. L'action synergique du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF  $\alpha$ ) et de l'interleukine 1 (IL1)



entraîne un afflux de polynucléaires neutrophiles et un relâchement des jonctions serrées de l'endothélium des capillaires cérébraux avec baisse de l'étanchéité de la barrière hémato-encéphalique. L'altération de la barrière entraîne un œdème cérébral qui persiste même après stérilisation du LCS et l'afflux de polynucléaires neutrophiles. L'hypertension intracrânienne secondaire à l'œdème cérébral et une possible vascularité avec thrombose contribuent à l'anoxie cérébrale [23]. Les méningites purulentes à pneumocoque touchent surtout les enfants et les personnes de plus de 60 ans. Elles peuvent être primitives ou secondaires à un foyer ORL, une fracture du rocher. Le début et l'évolution peuvent être parfois foudroyants avec 30 % de décès. Il se produit une réaction leucocytaire franche à polynucléaires neutrophiles.

### **3.3. Otites moyennes aiguës**

Elles sont courantes chez les enfants de moins de 3 ans fréquentant des crèches, des garderies ou des écoles. Elles peuvent être unies ou bilatérales avec fièvre, douleurs lancinantes et risque de mastoïdite.

## **4. Diagnostic clinique**

### **4.1. Cas suspect de méningite pour la recherche de cas**

Est présumée être atteinte de la méningite toute personne présentant une fièvre soudaine (température rectale  $>38,5^{\circ}\text{C}$  ou axillaire  $>38,0^{\circ}\text{C}$ ) et l'un des signes suivants : raideur ou hypotonie de la nuque, ou tout autre signe d'atteinte méningée (bombement de la fontanelle, convulsions ou autres signes méningés) [24].

### **4.2. Méningite bactérienne probable**

Est considéré comme cas probable tout cas présumé dont le LCS apparaît trouble ou purulent à l'examen macroscopique, dont l'examen microscopique fait apparaître des diplocoques Gram négatif, des diplocoques Gram positif ou des bacilles Gram négatif ou chez lequel la numération des leucocytes est supérieure à 10 cellules/mm<sup>3</sup> [24].

### **4.3. Méningite à pneumocoque confirmée**

Un cas suspect ou probable de méningite, confirmé en laboratoire par culture ou identification de la maladie à pneumocoque (par détection de l'antigène, immunochromatographie, PCR ou d'autres méthodes) dans le LCS ou le sang d'un enfant atteint d'un syndrome clinique correspondant à la méningite [24].

## **5. Diagnostic biologique**

### **5.1. Collecte des échantillons**

Il convient avant tout de minimiser tout risque de contamination croisée au cours de la manipulation ou de l'aliquotage. Par exemple, utiliser une technique de distribution stérile avec des tubes, des outils et des pipettes adaptés. Les échantillons qui peuvent être recueillis incluent le LCS (cas de méningite), des échantillons de sang (méningite, pneumonie et septicémie) et du liquide pleural (cas de pneumonie) [25].

#### **5.1.1. Volume des échantillons à collecter**

- 3 ml au total, 1 ml dans chacun des trois tubes à essai
- Tube1: Analyse biochimique (niveaux de protéine et de glucose)
- Tube2: Tests microbiologiques, numération des leucocytes
- Tube3: conservation pour autres tests

Si un seul tube de LCS est disponible, il doit être transmis au laboratoire microbiologique pour les essais de culture / PCR / antigène. Cependant, une aliquote de 50-100 µL devrait être prélevée de ce tube et être conservée pour les tests moléculaires.

La présence de sang dans le LCS peut affecter les cultures (les antibiotiques dans le sang peuvent inhiber la croissance bactérienne).

S'il est possible de prélever plus d'un tube, le premier tube peut contenir le sang contaminé de la ponction lombaire et ne doit pas correspondre au tube qui sera envoyé au laboratoire de microbiologie [25].

#### **5.1.2. Stockage et transport**

Le LCS doit être transmis immédiatement au laboratoire. Si l'échantillon ne peut être traité en une ou deux heures, inoculer 0,5 à 1,0 ml en trans-isolat (T-I) et incuber, ventilé entre 35 et 37°C avec 5 % de CO<sub>2</sub> pendant la nuit, ou jusqu'à ce que le transport soit possible (jusqu'à quatre jours). Si le transport est reporté à plus de 4 jours, conserver à température ambiante (non ventilé) jusqu'à l'envoi.

L'échantillon de LCS ne doit pas être réfrigéré, à conserver à température ambiante.

Le LCS doit être traité par un laboratoire de microbiologie dans les deux heures suivant le prélèvement. S'il est impossible de faire appel à un laboratoire de microbiologie, le milieu

inoculé T-I doit être envoyé depuis l'établissement de santé au laboratoire du district ou de référence dès que possible [25].

### **5.1.3. Conservation à long terme**

Les isolats sont conservés, congelés à -20°C pour permettre d'autres tests (sérotypage et tests de sensibilité aux antimicrobiens) à l'avenir, ou si la capacité de la culture n'existe pas dans les hôpitaux locaux et que le traitement doit être réalisé par le laboratoire de référence.

Si possible, il est préférable de conserver les isolats dans un congélateur à -80°C.

## **5.2. Tests de la bactériologie classique**

Le syndrome de la méningite peut être causé par divers agents pathogènes ; par conséquent, la surveillance syndromique clinique doit être complétée par une composante forte de laboratoire. La confirmation en laboratoire de la présence de méningite à pneumocoque se fait par la méthode de culture, la PCR ou la détection de l'antigène [25].

La culture bactérienne est la priorité pour la confirmation et l'isolement de l'agent pathogène. La culture fait figure de référence, mais le niveau de sensibilité est faible en raison de l'utilisation potentielle d'antibiotiques par le patient avant le prélèvement de l'échantillon [25].

La PCR est recommandée pour tous les cas suspects, car la culture bactérienne peut être inhibée si le patient a déjà reçu des antibiotiques. Comme les capacités de PCR ne sont pas toujours disponibles dans les laboratoires, le volume restant de LCS d'origine non manipulé peut être congelé et envoyé à un laboratoire de référence national ou régional pour des tests supplémentaires [25].

Les kits de Test de Diagnostic Rapide (TDR) peuvent être utilisés puisqu'ils augmentent le rendement et permettent d'obtenir rapidement des résultats en termes d'identification des soins cliniques et de l'épidémie. En général, les tests de diagnostic rapide permettent seulement d'identifier l'espèce et non le sérotype ou sérotype. Il existe deux types de tests de diagnostic rapide. Les résultats doivent être interprétés conformément aux instructions du fabricant.

- Immunochromatographie : Binax NOW® est un test de diagnostic rapide basé sur l'immunochromatographie pour l'identification primaire du pneumocoque.
- Épreuve d'agglutination au latex : Les kits commerciaux au latex ont souvent une durée de vie courte et peuvent être coûteux [20].

La méthode de Gram ne doit pas être utilisée pour confirmer des cas, mais elle est fiable et relativement peu coûteuse si le personnel est bien formé et que la qualité des réactifs est contrôlée. Avec la méthode de Gram, *S. pneumoniae* est un **diplocoque gram-positif** lancéolé, formant parfois une chaîne courte. Il peut être intra ou extracellulaire [25].

### 5.3. Technique de PCR en temps réel

Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR [26].

Depuis son invention, la PCR est devenue la technique la plus utilisée pour la détection de l'ADN et de l'ARN. À partir d'une simple copie d'une séquence particulière d'acides nucléiques, cette séquence peut être spécifiquement amplifiée et détectée. Il existe plusieurs variantes dont la PCR quantitative en temps réel. La nature exponentielle de cette dernière rend cette technique attrayante pour des analyses quantitatives.

Théoriquement, il existe une relation quantitative entre la quantité de la séquence cible de départ et la quantité du produit amplifié à n'importe quel cycle. Au début de la réaction PCR, les réactifs sont en excès mais en concentration assez faible afin d'éviter que la renaturation des amplicons n'entre en compétition avec l'hybridation des amorces (**Primers**). L'amplification est alors réalisée de façon constante à un taux exponentiel à l'aide d'une ADN polymérase thermostable. Après la phase exponentielle, la réaction d'amplification entre dans une phase linéaire où le taux d'amplification devient extrêmement variable, même au niveau de réplica d'un même échantillon, à cause d'une compétition entre la renaturation des amplicons et l'hybridation des amorces. Suit ensuite une phase plateau où le taux d'amplification décroît à près de zéro générant très peu d'amplicons. Afin de recueillir des données quantitatives avec précision, chacun des échantillons doit être analysé dans sa phase exponentielle d'amplification qui est la phase la plus reproductible de la réaction de PCR. La PCR en temps réel fait donc le suivi de la fluorescence émise pendant la réaction avec un indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle, à l'opposé de la PCR quantitative conventionnelle où les amplicons ne sont détectés qu'à la fin du processus [26].

Plusieurs instruments de PCR en temps réel sont présentement sur le marché. Ces appareils utilisent généralement un système en tubes fermés et la quantification ne requiert aucune manipulation post amplification, ce qui minimise ou élimine les problèmes de contamination par les amplicons suite à la réaction de PCR et réduit le temps d'analyse [27]. Le processus

complet est donc automatisé du début à la fin rendant ainsi cette technologie intéressante pour des applications d'analyses à grande échelle [28].

### **5.3.1. Technologies de détection**

Tous les systèmes de PCR en temps réel reposent sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction. Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin (ex. SYBR Green I) et les sondes fluorescentes. Pour cette dernière catégorie, il existe présentement quatre technologies principales :

- Hydrolyse de sondes (Taqman assay),
- Hybridation de 2 sondes (Hyb Probes),
- Balises moléculaires (Molecular Beacons)
- Et amorces scorpion (Scorpion primers).

Selon Wittwer CT [29], ces différentes technologies de détection auraient une sensibilité équivalente. Cependant, ces technologies présentent des différences au niveau de la spécificité [27].

#### **5.3.1.1. Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqmanassay)**

La technologie Taqman est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Un fluorochrome émetteur (reporter) (ex. FAM : 6-carboxyfluorocéin) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3' (ex. TAMRA : 6-carboxy-tetraméthyl-rhodamine). Lorsque stimulé, le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe FRET (fluorescence resonance energy transfer) qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence [30]. Étant donné que l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase est spécifique à l'ADN double brin, les sondes libres en solution demeurent intactes et aucune fluorescence n'est émise. Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives. À l'étape suivante, la Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre sur son passage la sonde hybridée qu'elle déplace et hydrolyse avec son activité 5'-exonucléasique. Le

reporter est alors libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de fluorescence qui augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde (figure 3). Comme la Taq polymérase hydrolysera la sonde seulement lorsque celle-ci est hybridée à sa séquence complémentaire, les conditions de température de l'étape de polymérisation doivent être ajustées de façon à permettre à la sonde de rester hybridée durant cette étape. La majorité des sondes ont une température de dissociation ( $T_m$ ) autour de 70°C ou de 5 à 10° C plus élevée que les amorces. Par conséquent, la technologie Taqman utilise une étape combinée d'hybridation et de polymérisation à 60-62°C assurant l'hybridation et la stabilité de la sonde durant l'extension. Ceci permet aussi une activité 5-exonucléasique maximale de la Taq polymérase mais, l'efficacité de l'activité de polymérisation de l'enzyme sera légèrement réduite à cette température suboptimale. Pour de longs amplicons, une étape d'hybridation/polymérisation plus longue ou encore une augmentation de la concentration en  $Mn^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$  pourrait s'avérer nécessaire pour stabiliser l'hybridation de la sonde à sa séquence cible. Les principes à respecter dans le design des sondes Taqman sont aussi applicables aux autres sondes linéaires et comprennent comme règles générales :

- une longueur de 20-40 nucléotides,
- un contenu en G-C variant de 40-60%,
- aucun patron de séquence répétée,
- aucune séquence permettant une hybridation ou un chevauchement avec les amorces,
- un A, un C ou un T à l'extrémité 5' parce qu'un G supprime la fluorescence de l'émetteur même après clivage,
- un  $T_m$  de 5 à 10 ° C plus élevé que les amorces afin de s'assurer qu'elles s'hybrideront avant les amorces et qu'elles demeureront hybridées pendant l'étape combinée d'hybridation et de polymérisation [27,30].

Les sondes fluorescentes possèdent comme avantage par rapport aux agents se liant à l'ADN une spécificité accrue et une meilleure capacité de multiplexage. La spécificité d'hybridation entre la sonde fluorescente et sa séquence d'ADN cible réduit significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mauvais appariements ou des dimères d'amorces (primer-dimers). Des réactions multiplexes peuvent être élaborées en utilisant des fluorochromes émetteurs distincts liés à des sondes différentes dans une même réaction de PCR. La technologie

Taqman est toutefois moins efficace et moins flexible que d'autres technologies en temps réel pour la détection de mutations spécifiques [27,30].

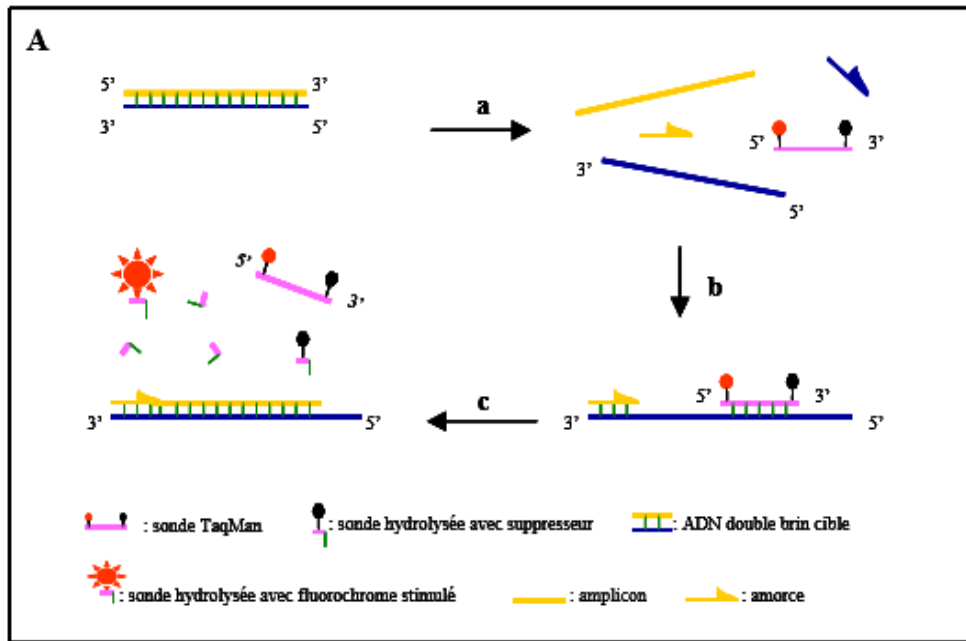


Figure 3 : Hybridation de 2 sondes (Hybridization probes)

(a) Durant l'étape de dénaturation, les deux sondes demeurent séparées et en solution.

(b) À la température d'appariement, les sondes s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'émission de fluorescence rouge par le principe FRET.

(c) Les sondes retournent libres en solution.

### 5.3.2. Cycle seuil (Threshold cycle)

Le concept du « cycle seuil » est à la base d'une quantification précise et reproductible pour les techniques fluorescentes en PCR. Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis dans la réaction. Plus il y a de matrices (Template) à amplifier au départ de la réaction PCR, moins élevé sera le nombre de cycle requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond [31]. Ce point est défini comme étant le cycle seuil (Ct) et apparaîtra toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification. Par conséquent, la quantification n'est pas affectée par l'épuisement d'un des réactifs comme lors de la phase plateau ce qui explique pourquoi le système en temps réel est si reproductible. La valeur du Ct peut être traduite en un résultat quantitatif en la comparant avec les valeurs du Ct générées avec des matrices de quantification connues [31].

## **6. Pneumocoque et vaccins**

La difficulté de développer des vaccins pneumococciques est liée à la multiplicité des sérotypes (92 sont aujourd'hui mis en évidence). Idéalement, pour obtenir un vaccin possédant une couverture optimale, il faudrait combiner dans un seul vaccin les polysides capsulaires de tous les sérotypes. En pratique, ceci s'avère impossible, et il a donc été nécessaire de se limiter aux sérotypes les plus fréquemment rencontrés. Le développement du vaccin pneumococcique s'est donc fait parallèlement à l'amélioration des connaissances sur la répartition des sérotypes isolés dans les infections pneumococciques.

### **6.1. Vaccin polyosidique 23- valent**

Le Pneumo 23 de Sanofi Pasteur appartient à la seconde génération de vaccin commercialisée aux Etats-Unis en 1983, puis en France en 1987, ce vaccin polysaccharidique contient 23 valences (sérotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F et 33F) qui représentent entre 85 et 90% des sérotypes isolés dans les formes invasives de la pathologie pneumococcique humaine.

Le vaccin polysaccharide à 23 valences induit des anticorps spécifiques du sérotype de chacun des polysaccharides contenus dans le vaccin, qui participent à l'opsonisation des pneumocoques. Les essais cliniques réalisés avec ce vaccin montrent une excellente réponse immunitaire chez les adultes jeunes et en bonne santé : à l'issue d'une injection unique, plus de 80% d'entre eux multiplient par 2 au moins leur titre d'anticorps pré vaccinal pour toutes les valences. Ces anticorps protecteurs anti-polyosides capsulaires apparaissent à partir du 15<sup>ème</sup> jour après la vaccination. Leur maintien à un taux protecteur pendant 5 ans et peut être davantage reste discuté. Ces anticorps ne sont spécifiques que des sérotypes des polysaccharides contenus dans le vaccin et n'assurent pas d'immunité croisée vis-à-vis des autres sérotypes de pneumocoques. Plusieurs études ont confirmé que les réponses en anticorps des sujets âgés en bonne santé sont comparables à celles des adultes jeunes [32].

Lors d'une étude de cohorte indirecte aux Etats-Unis les sujets immunocompétents étaient protégés à 63% contre les méningites [33],

Chez les sujets immuno-déficients à haut risque d'infection pneumococcique (splénectomisés, maladie de Hodgkin, lymphomes, myélome multiple, leucémie, séropositivité pour le virus de l'immunodéficience humaine ...), de nombreuses études montrent qu'il existe une réponse en



anticorps après la vaccination, même si elle est parfois diminuée par rapport à celle des sujets sains [34].

Chez les enfants, la réponse au vaccin anti-pneumococcique 23 est médiocre avant l'âge de 2 ans. Le vaccin induit une réponse thymo-indépendante, l'effet immunogène est donc nul avant cet âge. A partir de cet âge, la réponse, partielle et hétérogène, varie en fonction du sérotype : très bonne pour le type 3 (qui répond même à partir de 6 mois), elle est relativement bonne pour les types 4, 8 et 18C, variable pour les types 9V, 14 et mauvaises pour les autres sérotypes. En fait, il faut attendre l'âge de 8 à 10 ans pour que l'immunogénicité du vaccin soit comparable chez l'enfant et chez l'adulte [35].

Cependant, il convient d'insister sur le fait que les enfants à haut risque d'infection pneumococcique (splénectomisés, drépanocytaires ...) répondent aussi bien à la vaccination que les enfants normaux.

Ce vaccin n'est pas efficace dans la prévention des infections non systémiques et ne diminue pas le portage rhinopharyngé. Néanmoins, il est recommandé tous les 5 ans dans certaines pathologies chroniques pour prévenir les infections invasives à pneumocoque chez l'adulte et l'enfant de plus de deux ans [36].

## **6.2. Vaccin 13 valent (Pevnar ®13)**

C'est le vaccin utilisé dans le cadre du PEV au Mali depuis 2011. Ce vaccin contient 13 sérotypes pneumococciques : 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23 F conjugué à la protéine vectrice de *Corynebacterium diphtheriae* CRM197. Il assure une couverture vaccinale théorique chez 77% pour les méningites, 84 % pour les bactériémies à pneumocoques, et plus de 90 % pour les pneumococcies à pneumocoques résistants à la pénicilline. Au Mali ce vaccin est recommandé dans le PEV de routine dès l'âge de deux mois et le calendrier est adapté aux enfants de moins de 6 mois. Il est administré en même temps que le vaccin pentavalent, mais en un autre point d'injection. Il est administré par voie intra musculaire et doit être conservé entre 2-8°C. Il reste néanmoins stable à des températures allant jusqu'à 25°C pendant 4 jours. A la fin de cette période il doit être utilisé ou éliminé [37].

## **DEUXIEME PARTIE : Matériels et méthodes**

## **1. MATERIELS ET METHODES**

### **1.1. Cadre théorique : Présentation de l'INSP**

L'étude s'est déroulée dans le Département Laboratoire et Recherche biomédicale de l'Institut National de Santé Publique (INSP).

L'INSP fut Créé par l'ordonnance N° 2019-011/P-RM du 27 Mars 2019 portant création d'un établissement public national à caractère scientifique et technologique doté de la personnalité morale et de l'autonomie financière dénommé « Institut National de Santé Publique », en abrégé INSP.

L'INSP est le fruit de la fusion de l'Agence Nationale de la Sécurité Sanitaire des Aliments (ANSSA), du Centre de Recherche et de Documentation pour la Survie de l'enfant (CREDOS), du Centre de Développement des Vaccins (CVD), du Département des Opérations d'Urgence en Santé Publique (DOU – SP), du Centre National d'Appui à la Lutte contre la Maladie (CNAM)

L'Institut national de Santé publique a pour mission la mise en place d'un système de veille sanitaire et de surveillance épidémiologique et la promotion de la recherche sur les politiques et systèmes de santé au Mali.

A ce titre, il est chargé de :

- veiller à l'application du Règlement sanitaire international (RSI) 2005 et à la mise en œuvre du Programme de Sécurité sanitaire mondiale au Mali ;
- coordonner la mise en œuvre des interventions de surveillance et riposte au niveau national ;
- contribuer au développement d'une capacité nationale de veille sanitaire et de surveillance épidémiologique ;
- développer une capacité nationale en matière de vaccinologie ; d'assurer la référence dans le domaine du diagnostic biomédical ;
- assurer la gestion des réserves sanitaires notamment les stocks de produits biologiques, les équipements et les matériels nécessaires à la protection des populations face aux menaces sanitaires graves ;
- recueillir et évaluer les informations sur les effets inattendus ou toxiques des médicaments et des vaccins ;
- promouvoir la recherche médicale et pharmaceutique en santé publique ;
- participer à la formation technique, au perfectionnement et à la spécialisation des cadres ;
- promouvoir la coopération nationale et internationale dans le domaine de la recherche, la formation et la lutte contre la maladie ;
- participer à la mise en œuvre des politiques, des programmes et des stratégies de santé publique.

L'Institut national de Santé publique (INSP) a reçu en dotation initiale les biens meubles et immeubles de l'INRSP, du CREDOS, de l'ANSSA, du DOU-SP, du CVD, du Centre national Influenza et du Centre de pharmacovigilance.

Les organes d'administration et de gestion de l'institut national de Santé publique sont :

- le Conseil d'administration ;
- la Direction générale ;  
le Comité scientifique et technique ;
- le Comité de gestion ;  
le Comité d'éthique.

## **1.2. Type de l'étude**

Il s'agissait d'une étude transversale descriptive à collecte rétrospective s'étendant de janvier 2014 à décembre 2018. Elle a été réalisée dans le cadre de la surveillance épidémiologique de la méningite.

## **1.3. Echantillonnage**

Il s'agissait d'un modèle d'échantillonnage simple et exhaustif incluant systématiquement tous les échantillons de Liquide cérébro-Spinal (LCS) testés positifs au *Lyt A* (pneumocoque positif) en utilisant les techniques d'identification par la PCR en temps réel. Nous avons colligé **285 échantillons**.

## **1.4. Critères d'inclusion**

Etaient inclus dans l'étude tous les LCS testés positifs au *Streptococcus pneumoniae* (*Lyt A*) par les techniques d'identification par la PCR en temps réel pendant la période allant de janvier 2014 à décembre 2018 et dont les quantités étaient suffisantes ; les variables étudiées disponibles ; dans le cadre de la surveillance épidémiologique des méningites.

## **1.5. Critères de non inclusion**

N'ont pas été retenus dans notre étude :

- Les LCS testés positifs au *Lyt A* de quantité insuffisante.
- Tous les échantillons testés positifs au *Lyt A* et qui après contrôle de qualité sont revenus négatifs.

## 1.6. Variables à étudier

Les variables à étudier étaient :

- Les caractéristiques sociodémographiques des patients (âge, résidence)
- Les sérotypes/sérogroupe de *Streptococcus pneumoniae*
- Répartition géographique et périodique

## 1.7. Matériels et méthodes

### 1.7.1. Equipements

#### 1.7.1.1. Le STRATAGENE Mx3005P

Le STRATAGENE Mx3005P fabriqué par « Agilent Technologies » aux USA dont le siège se trouve à Santa Clara en Californie ; a été utilisé.

Il fait partie des instruments qPCR les plus fiables et disponibles.

Des résultats hautement reproductibles sont le produit de la conception de balayage optique de précision à source unique et à détecteur unique du Mx3005P, fournissant une excitation et une détection uniforme, couplée au système thermique à base de Peltier, qui assure une rampe uniforme et une précision thermique.

Il permet de quantifier rapidement et facilement les acides nucléiques pour étudier l'expression des gènes, l'analyse des mutations et le dosage des gènes. Le SYSTEME MX3005P a un format ouvert qui permet la détection par PCR en temps réel à tube fermé avec de nombreuses chimies, y compris les systèmes à colorant SYBR Green et à sonde fluorogénique, détecter jusqu'à 5 colorants différents simultanément.

Le système optique avancé utilisé par le Mx3005P offre de nombreux avantages qui sont entre autres :

- Elimine les variations optiques en assurant une intensité d'excitation uniforme et une mesure des émissions de puits à puits sur toute la plaque.
- L'élimination de la variation optique provient de la conception de la tête à fibre optique à balayage unique qui assure que :
  - Chaque puits reçoit la même quantité de lumière d'excitation
  - Chaque puits reçoit une lumière d'excitation pendant le même temps
  - Chaque puits est à la même distance du détecteur.

- Elimine le besoin de correction de signal de puits à puits par des colorants d'étalonnage ou de référence.
- Permet une quantification précise des cibles d'abondance faible à élever.
- L'utilisation d'un seul tube photomultiplicateur assurant une détection linéaire sur 10 ordres de grandeur garantit une sensibilité et une reproductibilité supérieure.
- Augmente la flexibilité
  - 4 canaux optiques avec des filtres choisis par l'utilisateur qui ouvrent une large gamme de longueurs d'onde d'excitation, permettant une utilisation avec la plupart des colorants fluorescents.

#### **1.7.1.1.1. Caractéristiques**

Le STRATAGENE Mx3005P présente les caractéristiques suivantes :

- Sources d'excitation : lampe halogène à quartz-tungstène
- Plage d'excitation : 350 à 750nm
- Détecteur : tube photomultiplicateur (PMT)
- Plage de détection : 350 à 850 nm
- Filtres : FAM TM/SYBR® Green I (492nm-516nm)

HEX TM/JOE TM/CIV TM (535nm-555nm)

ROX TM/Texas Red® (585nm-610nm)

Cy5 TM (635nm-665nm)

Cy3 (545-568)

- Système thermique : système de cyclage thermique à blocs à 96 puits à base de Peltier, plage de température 25-99°C
- Format de l'échantillon : plaques standard à 96 puits, tubes à 8 bandes, tube de 200µl, optimisées pour les réactions de 25µl
- Plage dynamique linéaire : 10 ordres de grandeur, méthode de la courbe standard
- Uniformité de la température +/-0,25°C à 72°C ; taux de rampe : jusqu'à 2,5°C/seconde.
- Taux d'amplification : réaction qPCR standard en 40 étapes à 2 cycles terminés en 90 minutes
- Discrimination : distinguer les échantillons avec 5000 et 10000 modèles de copies avec un niveau de confiance de 99,7%.

## **1.7.2. Réactifs et consommables**

Les réactifs utilisés étaient :

### **1.7.2.1. Master Mix « Perfecta Multiplex QPCR toughMix »**

Le Master Mix est un cocktail de réactif prêt à l'emploi 5 fois concentré pour la PCR quantitative en temps réel (rtPCR) avec la technologie de réactif «toughMix» qui neutralise un large éventail d'inhibiteurs de PCR compromettant les performances du dosage avec des extraits bruts, des échantillons cliniques. Il a plusieurs avantages qui sont entre autres :

- Minimiser les étapes de pipetage, simplifie l'assemblage de la réaction et améliore la précision ;
- Le réactif concentré 5x offre plus de flexibilité avec la sensibilité des échantillons d'ADN dilués (LCR) ;
- Sensibilité et spécificité du test supérieures avec la technologie enzymatique ultra-pure accuStart II-ADN polymérase Taq à rendement maximal contrôlée par un démarreur à chaud d'anticorps multi-épitope rigoureux.
- La suppression d'amplicons à faible nombre de copies par des cibles de référence à nombre élevé de copies au cours d'une co-amplification multiplex fausse la représentation et la quantification apparentes des séquences cibles à faible nombre de copies.

### **1.7.2.2. Amorces**

Ce sont des nucléotides au nombre de 10 à 25, qui s'apparient à une séquence de l'ADN à laquelle elles sont complémentaires pour initier la réaction. L'emplacement de la paire d'amorce détermine la longueur (taille) de la séquence à amplifier. Elles sont mises en excès dans la réaction.

### **1.7.2.3. Sondes Taqman**

Les sondes Taqman sont des sondes d'hydrolyse conçues pour accroître la spécificité des techniques de PCR quantitative.

Le principe de la sonde Taqman repose sur l'activité exonucléase 5'-3' de la Taq polymérase qui clive une sonde marquée lors de son hybridation à la séquence complémentaire permettant l'émission d'une fluorescence. Comme pour d'autres méthodes de PCR quantitative, le signal fluorescent résultant permet une mesure quantitative de l'accumulation exponentielle du

produit au cours des différents cycles de PCR. Cependant la méthode Taqman permet une augmentation significative de la spécificité de la détection.

Elle consiste en un fluorophore attaché de manière covalente à l'extrémité 5' d'un oligonucléotide et un désactivateur (quencher) à l'extrémité 3'. Différents fluorophores (ex : 6-carboxyfluoroscéine, acronyme : FAM), tétrafluoroscéine, acronyme : TET) et désactivateur (ex : tétraméthylrhodamine, acronyme : TAMRA) sont utilisables. Le désactivateur inhibe la fluorescence émise par le fluorophore lorsqu'il est excité par la source de lumière du thermocycleur. Ainsi, tant que le fluorophore et le désactivateur sont à proximité l'un de l'autre, le signal fluorescent est inhibé par le désactivateur.

### 1.7.3. Méthode

Le protocole pour le sérotypage direct des LCS positifs au pneumocoque par rtPCR à travers des réactions triplex, schéma spécifique à l'Afrique a été utilisé (protocole mis à jour et validé par le CDC). Ce dernier a été élaboré selon la fréquence des serotypes isolés en Afrique. La technique consiste à mettre directement 2 ul de LCR dans 23 ul de mix comme ADN.

N31														
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1	Protocol for the triplex real time PCR - <i>S. pneumoniae</i> serotyping - clinical specimens - Africa											Real-time RX1		
2	Purpose: <i>S. pneumoniae</i> serotyping directly from clinical specimens Dr SANOGO Hawa											Date: 05/09/2019		
3	Initial Conc.	Reagent	Final Conc.	Volume (µL)	Total Rxns	Final Volu						Number of Rxns:	40	
4	n/a	H <sub>2</sub> O	varv	4,75	40	190								
5	n/a	Quanta Perfecta Multiplex		12,5	40	500								
6	20µM	Fwd Primers	vary	below								Probes set up		
7	20µM	Rev Primers	vary	below								SeroProbes		
8	20µM	Probe	vary	below								1	FAM	
9	n/a	A-clinical specim	n/a	2	40							5	HEX	
10	Totals			25	40	1000						23F	ROX	
11	Primer Info		To get 20µM:	Primer/probe volumes (µL)								Thermal Cycling Parameters		
12	Reaction ID (primer/probe ID)			Vol.(µL) 1 rxn	Per X Rxns	Amount to						1X	95°C for 10min	
13	1-F			0,75	40	30						40X	95°C for 15sec	
14	1-R			0,75	40	30							60°C for 1min	
15	1-pb FAM			0,25	40	10								
16	5-F			0,75	40	30								
17	5-R			0,75	40	30								
18	5-pb HEX			0,5	40	20								
19	23F-F			0,75	40	30								
20	23F-R			0,75	40	30								
21	23F-pb ROX			0,5	40	20								
22					5,75		230							
23	RealtimeRx1 Africa													
24	RealtimeRx2 Africa													
25	RealtimeRx3 Africa													
	RealtimeRx4 Africa													
	RealtimeRx5 Africa													
	RealtimeRx6 Africa													

Figure 4 : Exemple de feuille de calcul Excel pour la préparation de la solution de travail (Mix).



La figure (4) indique les étapes à suivre pour la preparation du Mix. Il s'agit:

De renseigner dans la cellule "number of Rxns:"(où il est marqué 40), le nombre d'échantillons à preparer pour la reaction (nombre d'échantillons cliniques + nombre de contrôles positifs + nombre de contrôles négatifs + 2 volumes d'échantillons en excès pour parer aux erreurs de pipetage), la feuille calcule automatiquement tous les volumes à ajouter (derniere colonne).

Nous avons pris le nombre d'échantillons à tester + 07 (3 contrôles positifs, 2 contrôles négatifs, 2 extra) pour avoir le nombre total d'échantillons pour la reaction.

27	Triplex real time PCR - <i>S. pneumoniae</i> serotyping - clinical specimens - Africa scheme - Rx1												
28		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
29	A	7		69		147		249		339			
30	B	14		71		150		287					
31	C	17		81		154		288				NTC-Clean	
32	D	21		92		171		297				NTC-Dirty	
33	E	25		94		204		313					
34	F	29		95		218		321				pos cl st1	
35	G	50		126		234		322				pos cl st5	
36	H	58		130		237		336				pos cl st23F	
37													

Figure 5 : Exemple plan de plaque pour l'amplification

Par exemple si nous avons 33 échantillons:

Nombre total d'échantillons = 33+07 = 40 échantillons. Il s'agira alors pour la préparation de la solution de travail (Mix) de prendre pour la reaction N° 1:

- La quantité d'eau: 4,75 x 40
- Master Mix « Perfecta Multiplex QPCR toughMix » :12,5 x 40
- Pour les amorces (Forward et Reverse) et les sondes se référer à la figure 4.

IL existe 7 réactions triplex (3 sérotypes testés par réaction) à réaliser. Il y a pour chaque réaction une feuille de calcul excel auquel on pourra toujours se référer pour la préparation de la solution de travail (Mix). Les 3 sérotypes à tester par réaction sont indiqués dans le Tableau IV.

Pour chaque réaction, le mix est préparé dans la « salle propre » « Clean Room ».

Le mélange est passé au vortex et est réparti entre les puits d'une plaque à « 96 puits ». La plaque est recouverte avant le transfert dans la « salle sale » ou « Dirty Room » à l'aide d'un film adhésif stérile pour l'ajout de l'échantillon clinique (LCS). Il faudra prendre soin de mettre chaque échantillon clinique dans le puits qui lui est prévu.

Chaque réaction est réalisée avec un cycle thermique spécifique qu'il faudra respecter (cellule thermal cycling parameters).

Tableau IV: schémas des séries de réactions pour le sérotypage de *Streptococcus pneumoniae* par rtPCR (21 sérotypes)

<b>1</b>	<b>1, 5, 23F</b>
<b>2</b>	4 ,6A/6B/6C/6C, 9V/9A
<b>3</b>	14, 18C/18B/18A/18F, 19F
<b>4</b>	3, 7F/7A, 19A
<b>5</b>	6C/6D, 12F/12A/12B/44/46, 22F/22A
<b>6</b>	15A/15F ,23A, 33F/33A/37
<b>7</b>	2, 11A/11D,16F

## **TROISIEME PARTIE : Résultats et discussions**

## 1. Résultats

### 1.1. Résultats généraux : fréquence, âge, saison, Répartition géographique des méningites à pneumocoque

Du 1<sup>er</sup> janvier 2014 au 31 décembre 2018, sur les **2803 LCS** acheminés à l'INSP pour suspicion de méningite bactérienne aigüe, **557** étaient positifs soit une prévalence de 19,87%. Une infection à *Streptococcus pneumoniae* a été identifiée pour **52,80%** (294 cas). *Streptococcus pneumoniae* représentait sur l'ensemble des échantillons positifs : 68,40% en 2014 (67/98 cas) ; 47,10% en 2015 (32/68 cas) ; 48,10% en 2016 (76/158 cas) ; 47,66% en 2017 (51/107 cas) ; 53,96% en 2018 (68/126 cas) (Figure 6).

285 échantillons ont été retenus car 9 échantillons ne répondaient pas aux critères d'inclusion de l'étude. 1 échantillon n'avait pas de renseignements cliniques. Bien que sérotypés il n'a pas été pris en compte lors de l'analyse des données.

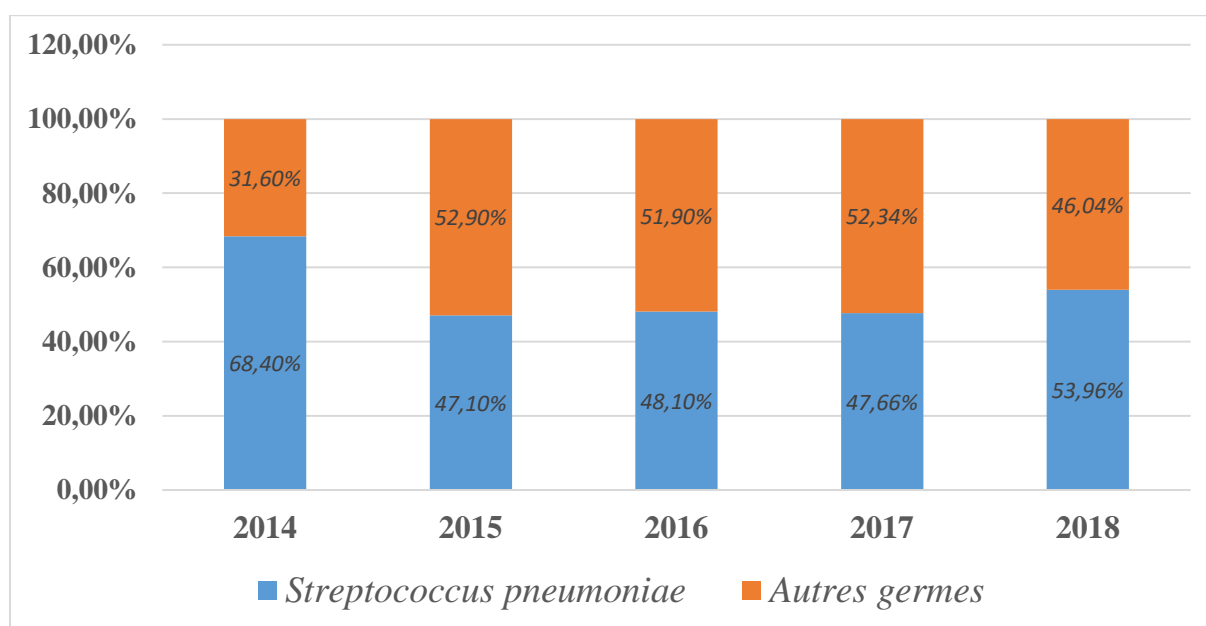


Figure 6 : Fréquence d'isolement de *Streptococcus pneumoniae* par an.

*Streptococcus pneumoniae* a été isolé en majorité chez les enfants de moins d'1 an soit 44,01% (125/284 cas), suivi respectivement des enfants de 1-4 ans et de 15-29 ans avec pour chacune des tranches d'âge 14,08 % (40/284 cas) comme indiqué sur la figure 7.

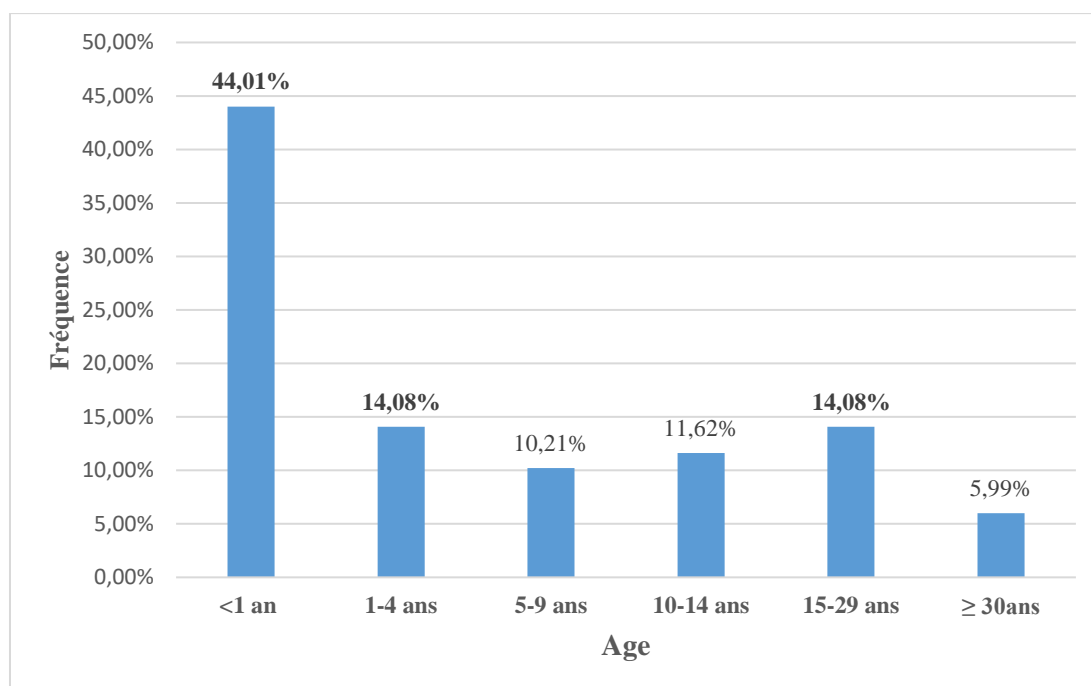


Figure 7 : Répartition des patients à LCS positif au *Streptococcus pneumoniae* en fonction de leur âge.

La fréquence d'isolement est élevée pendant les périodes froides et chaudes avec un pic au mois d'avril soit 19,37 % (55/284 cas) (Figure 8).

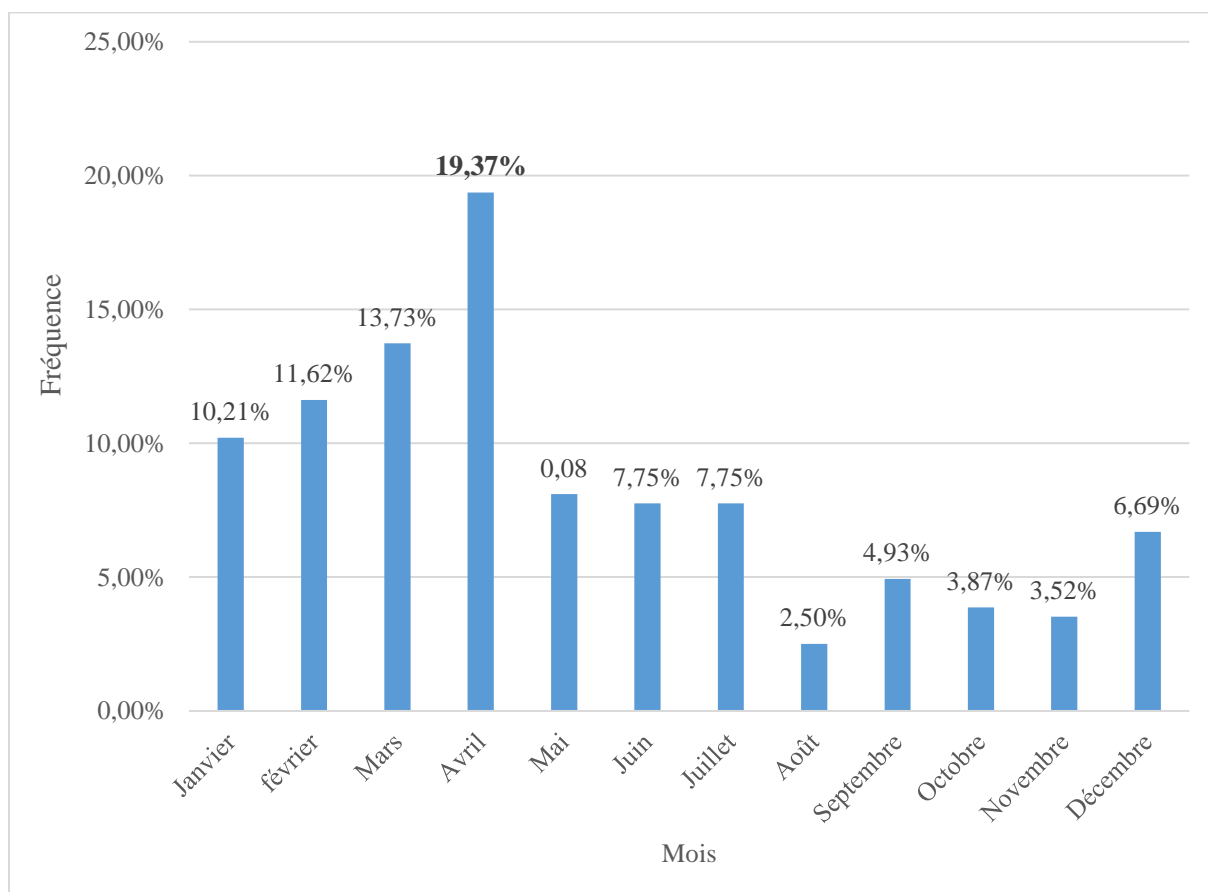


Figure 8 : Fréquence d'isolement de *Streptococcus pneumoniae* par mois.

La majorité des cas ont été identifiés dans le District de Bamako soit 36,27% (103/284), suivi des régions de Koulikoro et de Sikasso avec respectivement 27,46% (78/284 cas) et 18,66% (53/284 cas) comme indiqué sur la figure 9.

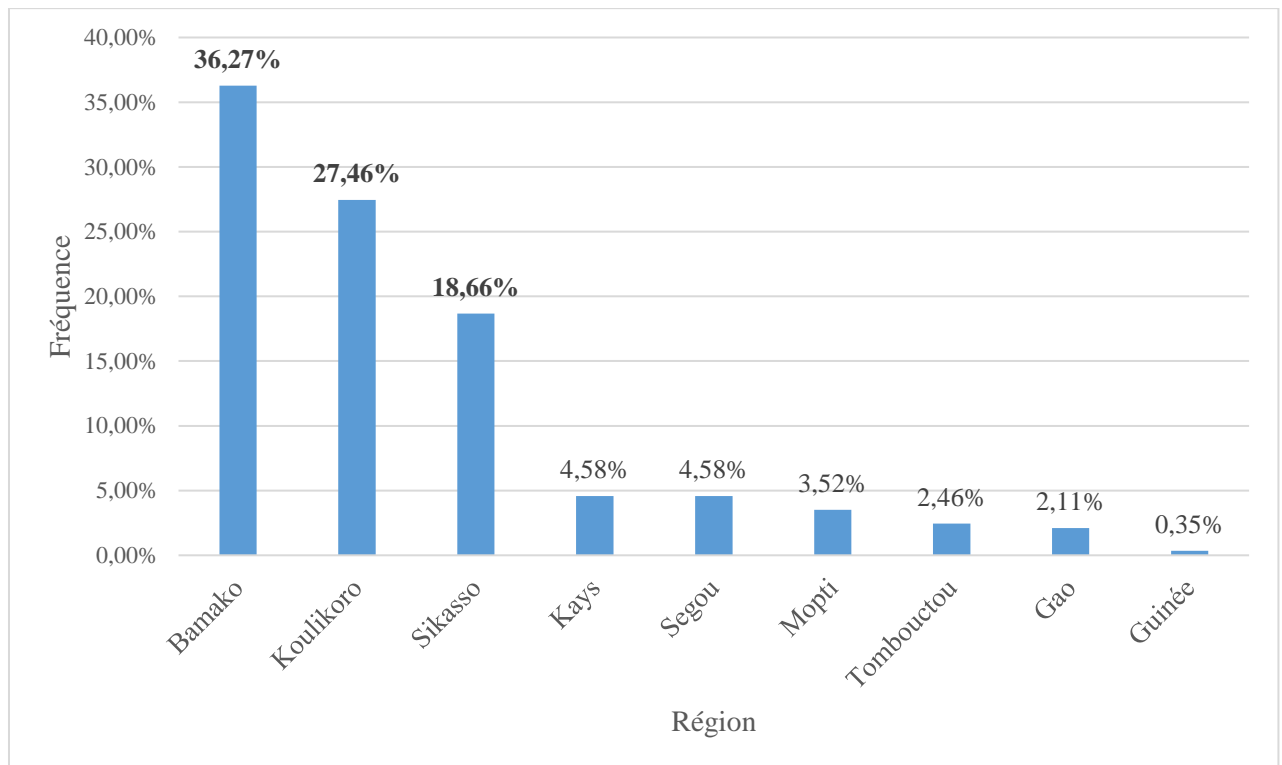


Figure 9 : Repartition des cas de méningites à *Streptococcus pneumoniae* en fonction de la région de provenance du patient.

## 1.2. Caractérisation des sérotypes de *Streptococcus pneumoniae*

L'échantillon dont les renseignements cliniques n'étaient pas disponibles était le seul de sérotype 19F.

37,0% (105/284 cas) des LCS positifs au *Lyt A* n'étaient pas typables par la rtPCR (21 sérotypes).

Le Sérotype 1 était le plus fréquent avec 15,5% (44/284 cas) ; suivi des sérotypes 2 et 12F/12A/12B/44/46 avec pour chaque sérotypes 12,0% (34/284 cas).

Les sérotypes : 2 (12,0% soit 34 cas)

12F/12A/12B/44/46 (12, 0% soit 34 cas)

33F /33A/37 (2,1 % soit 6 cas)

16F (0,7% soit 2 cas)

22F/22A (0,7% soit 2 cas)

23A (0,4% soit 1 cas) ne sont pas pris en compte dans le **Prevnar 13®** (Tableau V).

Les sérogroupes 6A/6B/6C/6D, 7F/7A, 9V/9A et 18C/18B/18A/18F incluent respectivement les serotypes 6A, 6B, 7F, 9V et 18C.

NB: le séro groupe 6C/6D a été testé et aucun cas n'a été identifié.



Tableau V: Fréquence des serotypes /serogroupes de *Streptococcus pneumoniae* isolés dans les LCS

		Fréquence	Pourcentage %
<b>Sérotypes</b>	St 1	44	15,5
	St 12F/12A/12B/44/46	34	12,0
	St 14	15	5,3
	St 16F	2	0,7
	St 18C/18B/18A/18F	3	1,1
	St 19A	3	1,1
	St 2	34	12,0
	St 22F/22A	2	0,7
	St 23A	1	0,4
	St 23F	4	1,4
	St 3	3	1,1
	St 33F/33A/37	6	2,1
	St 4	1	0,4
	St 5	13	4,6
	St 6A/6B/6C/6D	10	3,5
	St 7F/7A	3	1,1
	St 9V/9A	1	0,4
	NT	105	37,0
	Total	284	100,0

Le sérotype 1 a été fréquemment identifié dans la tranche d'âge de 15-29 ans avec 38,63% (17/44 cas).

Les sérotypes 12F/12A/12B/44/46 et 2 ont été identifié majoritairement dans la tranche d'âge des moins d'1 (un) an avec respectivement 52,94% (18/34 cas) et 91,17% (31/34 cas).

Le seul cas de sérotypes 23A a été isolé dans la tranche d'âge de 1- 4 ans (Tableau VI).

Tableau VI : Répartition des cas de méningites à *Streptococcus pneumoniae* en fonction des tranches d'âge.

		Age						Total
		< 1AN	1-4 ans	5-9 ans	10-14 ans	15 -29 ans	+30 ans	
Sérotypes	St 1	2,27% (1)	13,64% (6)	18,18% (8)	22,73% (10)	<b>38,63%</b> <b>(17)</b>	4,55% (2)	100% (n=44)
	St 12F/12A/12B/44/46	<b>52,94%</b> <b>(18)</b>	11,76% (4)	5,88% (2)	0	20,59% (7)	8,82% (3)	100% (n=34)
	St 14	53,33% (8)	26,67% (4)	6,67% (1)	6,67% (1)	0	6,67% (1)	100% (n=15)
	St 16F	100% (2)	0	0	0	0	0	100% (n=2)
	St 18C/18B/18A/18F	66,67% (2)	0	0	0	0	33,33% (1)	100% (n=3)
	St 19A	0	0	33,33% (1)	0	66,67% (2)	0	100% (n=3)
	St 2	<b>91,17%</b> <b>(31)</b>	2,94% (1)	0	5,88% (2)	0	0	100% (n=34)
	St 22F/22A	100% (2)	0	0	0	0	0	100% (n=2)
	St 23A	0	100% (1)	0	0	0	0	100% (n=1)
	St 23F	75% (3)	0	25% (1)	0	0	0	100% (n=4)
	St 3	0	33,33% (1)	33,33% (1)	0	0	33,34% (1)	100% (n=3)
	St 33F/33A/37	16,67% (1)	16,67% (1)	0	50% (3)	16,66% (1)	0	100% (n=6)
	St 4	100% (1)	0	0	0	0	0	100% (n=1)
	St 5	46,15% (6)	7,69 % (1)	7,69 % (1)	38,46% (5)	0	0	100% (n=13)
	St 6A/6B/6C/6D	60% (6)	30% (3)	0	10% (1)	0	0	100% (n=10)
St 7F/7A	33,33% (1)	0	33,33% (1)	0	33,33% (1)	0	100% (n=3)	
St 9V/9A	0	0	100% (1)	0	0	0	100% (n=1)	
<b>Total</b>	45,81% (82)	12,29% (22)	9,50% (17)	12,29% (22)	15,64% (28)	4,47% (8)	100% (n=179)	

## Sérotype 1

Le sérotype 1 a été identifié pendant la période sèche avec un pic en mois de Mars soit 29,54% (13/44 cas) suivi du mois d'avril avec 22,72% (10/44 cas).

## Le Sérotype 2 et 12F/12A/12B/44/46

Il n'y a pas de particularité d'isolement du sérotype 2 en fonction des mois.

S'agissant du sérotype 12F/12A/12B/44/46, le pic d'isolement était observé au mois d'Avril avec 26,47 % (9/34 cas) (Tableau VII).

Tableau VII : Répartition des sérotypes les plus fréquents en fonction des mois

	Sérotypes			
	St1	St2	St12F/12A/12B/44/46	Total
Janvier	11,36% (5)	11,76% (4)	17,65% (6)	13,39% (15)
Février	9,09% (4)	14,71% (5)	17,65% (6)	13,39% (15)
Mars	<b>29,54%</b> (13)	14,71% (5)	8,82 % (3)	18,75% (21)
Avril	<b>22,72%</b> (10)	14,71% (5)	<b>26,47 %</b> (9)	21,43% (24)
Mai	4,55% (2)	5,88% (2)	8,82 % (3)	6,25% (7)
Juin	6,82% (3)	8,82% (3)	2,94 % (1)	6,25% (7)
Juillet	9,09% (4)	5,88% (2)	0% (0)	5,36% (6)
Août	2,27% (1)	0% (0)	0% (0)	0,89% (1)
Septembre	0% (0)	5,88% (2)	5,88% (2)	3,57% (4)
Octobre	0% (0)	11,76% (4)	0% (0)	3,57% (4)
Novembre	0% (0)	2,94% (1)	0% (0)	0,89% (1)
Décembre	4,55% (2)	2,94% (1)	11,76 % (4)	6,25% (7)
Total	100% (44)	100% (34)	100% (34)	100% (112)

Sur l'ensemble des LCS sérotypés, 46,40% (83/179 cas) sont des sérotypes Prevnar 13®  
44,10% (79/179 cas) sont des non-Prevnar 13® sérotypes.

Pour 9,5% des cas sérotypés, l'identification n'a pas été tranchée puisqu'il s'agissait de sérogroupes, incluant des sérotypes de type Prevnar 13®/et non (Tableau VIII).

Tableau VIII: Répartition des sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* isolés en fonction de leur appartenance ou non au vaccin.

Sérotypes/ Sérogroupes		Fréquence	Pourcentage %
	Prevnar 13®	83	46 ,4
	Non- Prevnar 13®	79	44 ,1
	PT	17	9 ,5
<b>Total</b>		179	100

PT : Pas Tranché

NB: **Prevnar 13®**:1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F.

Sur les non-Prevnar 13® sérotypes, 68,35% (54/79 cas) ont été identifié chez les enfants de moins d'1 an.

La majorité soit 52,94 % (9/17 cas) des sérotypes associés en sérogroupes étaient également identifiés chez les enfants de moins d'1 an. Il n'existait pas de particularité de répartition en fonction de l'âge pour les Prevnar 13® sérotypes (Tableau IX).

Tableau IX : Répartition des sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* isolés selon qu'ils appartiennent au vaccin ou non en fonction des tranches d'âge.

Sérotypes		Age						Total
		< 1An	1-4 Ans	5-9 Ans	10-14 Ans	15- 29 Ans	+30 Ans	
	Non- Prevnar 13®serotype	<b>68,35%</b> (54)	8,86% (7)	2,53% (2)	6,33% (5)	10,13% (8)	3,80% (3)	100% (79)
	Prevnar 13®	22,89% (19)	14,46% (12)	15,66% (13)	19,28% (16)	22,89% (19)	4,81% (4)	100% (83)
	PT	<b>52,94%</b> (9)	17,65% (3)	11,76% (2)	5,88% (1)	5,88% (1)	5,88% (1)	100% (17)
<b>Total</b>		45,81% (82)	12,29% (22)	9,50% (17)	12,29% (22)	15,64% (28)	4,47% (8)	100% (179)

Le sérotype 1 a été plus isolé à Sikasso 31,82 % (14/44 cas).

Les sérotypes 12FAB/44/46 et 2 ont été fréquents à Bamako avec respectivement 35,29% (12/34 cas) et 44,12% (15/34 cas).

### **Région de Bamako**

Les sérotypes : St2 avec 44,12% (15/34 cas)

St12FAB44/46 avec 35,29 % (12/34 cas)

St1 avec 22,73% (10/44 cas)

Étaient les sérotypes les plus fréquents à Bamako.

Les seuls cas à sérotype 4 et 16F ont été isolés à Bamako.

### **Région de Koulikoro**

Les sérotypes : St1 avec 25% (11/44 cas),

St2 avec 26,47% (9/34 cas),

St14 avec 53,44% (8/15 cas)

Étaient les sérotypes les plus couramment rencontrés dans la région de Koulikoro.

Le seul cas de sérotype 9V/9A a été isolé à Koulikoro.

### **Région de Sikasso**

Les sérotypes : St1 avec 31,82 % (14/44)

St12F/12A/12B/44/46 avec 20,59% (07/34)

Étaient les sérotypes/sérogroupe les plus fréquemment isolés dans la région de Sikasso.

Le sérotype 23A a été isolé seulement dans la région de Sikasso (Tableau X).

Tableau X : Répartition des sérotypes / sérogroupes de *Streptococcus pneumoniae* isolées en fonction des régions

Serotypes/Serogroupes	Bamako	Koulikoro	Sikasso	Autres	Total
St 1	22,73% (10)	25% (11)	31,82 % (14)	20,45% (9)	100% (44)
St12F/12A/12B/44/46	35,29 % (12)	17,65 (6)	20,59% (7)	26,47% (9)	100% (34)
St 14	33,33% (5)	53,44 % (8)	0	13,33% (2)	100% (15)
St 16F	100% (2)	0	0	0	100% (2)
St 18C/18B/18A/18F	0	66,67 % (2)	33,33% (1)	0	100% (3)
St 19A	0	33,33% (1)	66,67 % (2)	0	100% (3)
St 2	44,12% (15)	26,47% (9)	11,76% (4)	14,65% (6)	100% (34)
St 22F/22A	50% (1)	0	50% (1)	0	100% (2)
St 23A	0	0	100% (1)	0	100% (1)
St 23F	25% (1)	50% (2)	0	25% (1)	100% (4)
St 3	0	75% (2)	0	25% (1)	100% (3)
St 33F/33A/37	33,33% (2)	16,67% (1)	0	50% (3)	100% (6)
St 4	100% (1)	0	0	0	100% (1)
St 5	23,08% (3)	23,07% (3)	23,08% (3)	30,77% (4)	100% (13)
St 6A/6B/6C/6D	60% (6)	30% (3)	0	10 % (1)	100% (10)
St 7F/7A	0	25% (1)	75% (2)	0	100% (3)
St 9V/9A	0	100% (1)	0	0	100% (1)
NT	42,86% (45)	26,67% (28)	17,14% (18)	13,33% (14)	100% (105)
<b>Total</b>	36,27% (103)	27,46% (78)	18,66% (53)	17,61% (50)	100% (284)



Tableau XI : Répartition des sérotypes / sérogroupes les plus fréquents de *Streptococcus pneumoniae* isolées à Bamako, Koulikoro et Sikasso

Serotypes/Serogroupes	Bamako	Koulikoro	Sikasso	Total
St 1	22,73%	25%	31,82 %	100%
St12F/12A/12B/4 4/46	35,29 %	17,65	20,59%	100%
St 14	33,33%	53,44 %	0	100%
St 16F	100%	0	0	100%
St 2	44,12%	26,47%	11,76%	100%
St 23A	0	0	100%	100%
St 4	100%	0	0	100%
St 6A/6B/6C/6D	60%	30%	0	100%
St 9V/9A	0	100%	0	100%
NT	42,86%	26,67%	17,14%	100%
<b>Total</b>	36,27%	27,46%	18,66%	100%

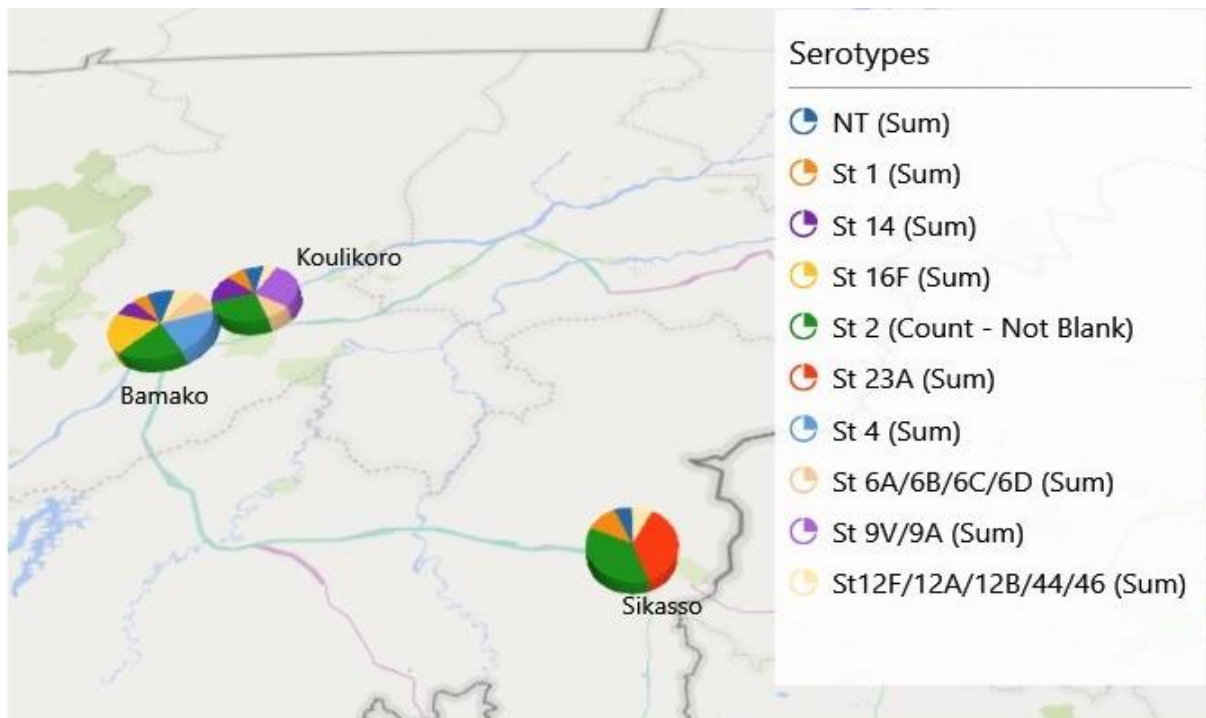


Figure 10 : Répartition des sérotypes / sérogroupes les plus fréquents de *Streptococcus pneumoniae* isolées à Bamako, Koulikoro et Sikasso

**NB :** Le tableau XI et le figure 10 se rapportent au Tableau X

## 2. Commentaires

Cette étude a été réalisée dans le cadre de la surveillance épidémiologique de routine de la méningite au niveau du département de diagnostic biologique de l'Institut National de Recherche en Santé Publique de Bamako (INSP) dont la mission principale est la mise en place d'un système de veille sanitaire et de surveillance épidémiologique ainsi que la promotion de la recherche sur les politiques et systèmes de santé.

Il s'agissait d'une étude transversale descriptive à collecte rétrospective portant sur tous les LCS positifs au pneumocoque (*Lyt A* positif) par la PCR en temps réel sur la période de janvier 2014 à décembre 2018. 285 échantillons ont été sérotypés. Cette étude a permis de démontrer la place qu'occupe *Streptococcus pneumoniae* dans la survenue des méningites bactériennes et d'établir un répertoire des sérotypes circulants au Mali.

### Difficultés et limites

Les échantillons positifs au *Lyt A* mais de quantité insuffisante n'ont pas été sérotypés.

Les sérotypes de certains échantillons n'ont pas pu être déterminé par les techniques de la PCR en temps réel utilisant les triplex mais qui sont probablement typables par d'autres techniques de PCR. L'étude n'a pas pu faire la part des sérotypes associés en sérogroupes par manque de protocole dédié et aussi du fait que les échantillons n'ont pas été sérotypés par les techniques de la PCR conventionnelle.

Malgré ces limites, notre étude a permis de déterminer la fréquence des méningites bactériennes à *Streptococcus pneumoniae* ainsi que les sérotypes typables circulants au Mali entre 2014 et 2018.

### 2.1. Résultats généraux

*Streptococcus pneumoniae* a été le germe le plus isolé dans les LCS soit **52, 80%**.

Il représentait sur l'ensemble des échantillons positifs :

- 68,40% en 2014 ;
- 47,10% en 2015 ;
- 48,10% en 2016 ;
- 47,66% en 2017 ;
- 53,96% en 2018.

Ceci s'explique par le fait qu'historiquement la majorité des cas de méningites (épidémies y compris) étaient causés au Mali par *Neisseria meningitidis*, sérotype A [39]. Suite à l'introduction avec succès du vaccin conjugué contre *Neisseria meningitidis* sérotype A (MenAfriVac) en 2010, et du vaccin pentavalent contre *Haemophilus influenzae type b* en 2005, *Streptococcus pneumoniae* est devenu l'une des bactéries les plus incriminées dans les méningites bactériennes selon la surveillance épidémiologique [40].

Ces résultats sont comparables à ceux de notre étude réalisée en 2014, à l'Institut National de Santé Publique de Bamako qui montrait que *Streptococcus pneumoniae* était le germe le plus fréquemment incriminé dans les méningites bactériennes chez les enfants de 0-5 ans au Mali avec 62,10% (36/58 cas) [7].

Nos résultats sont légèrement supérieurs à ceux de Coulibaly qui trouvait qu'il occupait la première place dans une étude réalisée au CHU Gabriel TOURE avec 37,8% en 2007 [41].

Soeters et col montraient que *Streptococcus pneumoniae* (40 %) occupait la 2<sup>e</sup> place après *Neisseria meningitidis* (56%) entre 2015-2017, dans une étude réalisée dans les pays à haut risque de la ceinture méningée africaine (Burkina Faso, Tchad, Mali, Niger, et Togo) [42].

Au Niger entre 2008 et 2015, sur un total de 6167 (40.6 %) de cas de méningites confirmés, Djibo et col trouvaient que *Streptococcus pneumoniae* représentait la 2<sup>e</sup> étiologie avec 593 (9.6 %) après *Neisseria meningitidis* pour 5507 (89.3 %) [43].

Dans une autre étude réalisée entre 2010 et 2018 après l'introduction du vaccin menAfrivac au Niger, Sidikou et col montraient que *Streptococcus pneumoniae* était la 2<sup>e</sup> étiologie des méningites bactériennes (13%) après *Neisseria meningitidis* (85%) [44].

Au Cameroun en 2012, Gervais et col trouvaient que *Streptococcus pneumoniae* représentait 57,1% des cas de méningites bactériennes [45].

Traore et col trouvaient dans une étude réalisée entre 2006 et 2008 au Togo et au Burkina Faso que *Streptococcus pneumoniae* était la 1<sup>ère</sup> étiologie des méningites bactériennes avec 17% [46].

*Streptococcus pneumoniae* a été isolé en majorité chez les enfants de moins d'1 an soit 44,01% (125/284 cas), suivi respectivement des enfants de 1-4 ans et ceux de 15-29 ans avec pour chaque tranche d'âge 14,08% (40/284 cas).

Ces résultats sont supérieurs à ceux de Traore et col qui trouvaient dans une étude réalisée au Burkina Faso et au Togo en 2008 que 21% des cas de méningites à *Streptococcus pneumoniae* sont identifiés chez les enfants de moins d'1 an, 15% étaient âgés de 1 à 4 ans, 21% étaient âgés de 5 à 14 ans et 41% étaient âgés de 15 ans et/ou plus (l'âge était inconnu pour 2%) [46].

Kambire et col trouvaient au Burkina Faso entre 2011 et 2013 que 18 % des méningites streptococciques survenaient chez les enfants de moins d'1 an suivi de la tranche d'âge de 5-9 ans [47].

La fréquence d'isolement est élevée pendant les périodes froides et chaudes avec un pic au mois d'avril soit 19, 36% (55/284 cas).

Cela corrobore avec la littérature qui dit que les cas fréquents, les épidémies commencent en début de la saison sèche, vers le mois de décembre, se développent rapidement et cessent à l'arrivée des premières pluies, vers le mois de juin.

Dans l'étude de Levy et col (2009), 65,7 % des méningites à pneumocoque surviennent en période hivernale et 2,3 % en été [48].

En Algérie, HECINI- HANNACHI trouvait que durant les 7 années de son étude, il apparaissait globalement que les infections invasives à pneumocoque survenaient tout au long de l'année avec un pic en décembre avec 17/100 cas et un minimum est observé en janvier, août et novembre avec 4/100 cas pour chaque mois. La répartition saisonnière des infections montrait que 29% des cas sont observés en hiver (décembre, janvier et février) et 29 % au printemps (Mars, Avril et Mai). Le reste de l'année, le nombre de souches fluctue entre 7 et 8 souches en février, mars, avril, juin, juillet et septembre [22] (2014).

## **2.2. Caractérisation des sérotypes**

Sur les LCS positifs au *Lyt A*, 105/284 soit 37,0% n'étaient pas typables par la rtPCR (21 sérotypes).

Ces échantillons n'ont pas été testés par les techniques de la PCR conventionnelle qui est capable de sérotyper 40 autres sérotypes contrairement à la méthode utilisée dans notre étude qui n'en explorait que 21.

Kambire et col trouvaient au Burkina Faso entre 2011 et 2012, après avoir sérotyper les échantillons positifs au *Lyt A* avec les techniques de la PCR conventionnelle et la rtPCR, que 15% étaient non typables [47].

Dans la littérature la majorité des sérotypes de pneumocoque responsables de maladies invasives (méningites, sepsis) étant contenus dans les 21 sérotypes testés nécessite d'utiliser une autre technique capable d'explorer plus de sérotypes. L'identification d'autres sérotypes permettra de déterminer leur part dans la survenue des méningites bactériennes.

Sur les LCS *Lyt A* positif, le Sérotype 1 était le plus fréquent soit 24,58 % (44/179 cas) ; suivi des sérotypes 2 et 12F/12A/12B/44/46 avec pour chaque 18,99% (34/179 cas).

La majorité des souches de *Streptococcus pneumoniae* (80 %) était de sérotype 1 dans une étude réalisée en 2016 au Ghana par Kwambana-Adams et col [49].

Sanogo montrait en 2014 que parmi les LCR *Lyt A* positif, le sérotype 12F/12A/12B/44/46 était le plus fréquent avec 26,08% suivi des sérotypes 1 et 2 avec respectivement 21,73% et 17,39% [7].

Au Canada Demczuk et col trouvaient que les sérotypes 19A, 7F, 3 et 22F étaient les sérotypes les plus courants en 2012, avec le sérotype 19A passant de 19% (521/2727) à 14% (364/2620), 7F diminuant de 14% (389/2727) à 12% (323/2620) et 22F passant de 7% (185/2727) à 11% (279/2620) depuis 2010 après l'introduction du vaccin [50].

Ces résultats sont différents de ceux de Campbell et col qui trouvaient une plus grande fréquence pour le sérotype 5 soit 54 % entre 2002 et 2003 dans un site sentinelle de l'Hôpital Gabriel Touré au Mali contre 7,26% soit (13/179) dans notre étude. Par contre ils ont trouvé 14% pour le sérotype 2 ce qui est légèrement en dessous de nos résultats qui sont de 18,99% [6].

Samaké B trouvait des résultats similaires avec 50 % de sérotype 5 suivi du sérotype 7 F (14,8 %) contre 1,67% de sérotype 7F/7A dans notre étude. Elle trouvait par contre un faible pourcentage par rapport à nos résultats du sérotype 2 soit 9,3% [51] (2004-2005).

Ramdani-Bouguessa et col avaient trouvé des résultats supérieurs aux nôtres en Algérie avec 12% de pneumocoque de sérotype 5 entre 1996 et 2000 contre 4,6% seulement dans notre étude [52].

Ces différences pourraient s'expliquer par la diminution du sérotype 5 due à l'effet du vaccin introduit en 2011 au Mali. Aussi par le fait que notre échantillonnage n'a concerné que les cas de méningites.

Le sérotype 1 a été fréquemment identifié dans la tranche d'âge de 15-29 ans soit 38,63% (17/44 cas) contre seulement 1/44 pour les moins 1 ans.

Les sérotypes 12F/12A/12B/44/46 et 2 par contre ont été identifiés majoritairement dans la tranche d'âge des moins d'1 (un) an avec respectivement 52,94% (18/34 cas) et 91,17% (31/34).

Le vaccin ayant été introduit en 2011 soit 2-7 ans avant la réalisation de notre étude pourrait expliquer cette fréquence élevée du sérotype 1 chez les 15-29 ans contre seulement 1/44 chez les moins d'1 an.

Les sérotypes 12F/12A/12B/44/46 et 2 n'étant pas inclus dans le vaccin cela pourrait expliquer leur fréquence élevée chez les moins d'1 an d'où la nécessité d'envisager l'élaboration de vaccins prenant en compte ces sérotypes.

Kambire et col montraient dans une étude effectuée sur une durée d'une année entre 2014- 2015 pour évaluer l'impact du vaccin conjugué 13-valent au Burkina Faso que St12F/12A/12B/44/46 (17%), St1 (12%), et St5 (10%) prédominaient chez les enfants de moins d'1 an [53].

Shibl et col montraient que les sérotypes/sérogroupe les plus fréquents étaient 14, 23F, 6B, 19F et 6A chez les enfants de 0 à 5 ans dans une étude pour évaluer l'épidémiologie des maladies invasives à pneumocoque dans la péninsule arabe et en Egypte en 2009 [54].

Traoré et col trouvaient en 2008 que sur les 48 isolats testés pour le sérotype, 18 provenaient d'enfants âgés de moins de 5 ans ; de ces 18, 3 isolats (17%) étaient chacun des sérotypes 1, 2 et 5, et 5 isolats (28%) étaient de sérotype 6A. Sur les 30 autres sérotypes identifiés pour les patients d'âge  $\geq 5$  ans, 18 (60%) étaient de sérotype 1, alors qu'aucun autre sérotype ne constituait plus de 10% [46].

HECINI- HANNACHI trouvait en 2014 que chez l'enfant, les sérotypes 14, 19F, 23F, 6B et 10A sont les plus fréquemment rencontrés représentant 65,9% (29/44cas), suivis des sérotypes 19A, 18C et 7F représentant 4,5% des cas chacun (2/44). Chez l'adulte, il trouvait que les sérotypes 14 et 19F sont les plus fréquemment retrouvés avec 15,38% chacun, suivis des sérotypes 23F, 6B, 1, 35B, 11, 3 et 4 identifiés chacun avec un taux de 5,12% [22].

Les sérotypes Prevnar 13® représentaient 46,40% (83/179 cas) et 44,1% (79/179 cas) étaient des non-Prevnar 13® sérotypes. Pour 9,5% (17/179) des cas sérotypés, l'identification n'a pas été tranchée puisqu'il s'agissait de sérogroupe, incluant des sérotypes de type/etnon Prevnar 13®.

Ces résultats sont supérieurs à ceux de Mackenzie et col qui montraient dans une étude réalisée en Gambie entre Mai 2008 et Mai 2010 (n= 111) que les sérotypes non-PCV-13 représentait 26%. Les sérotypes pris en charge par le vaccin 13- valent représentaient 50%. Entre 2013-2014, les 13- valent type représentaient 38% et 44 % sont des non-PCV 13 type (n=67) [51,55].

Walekhwa et col trouvaient à Nairobi en 2018 à partir de prélèvement nasopharyngé que tous les sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* isolés sont non inclus dans le vaccin 10-PCV [56].

Par contre Traoré et col montraient en 2008 que 77% des sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* étaient couverts par le vaccin 13-valent [46].

Forrester et col montraient aux USA en 1987 que 65% des isolats sanguins provenant de patients bactériémiques non vaccinés étaient des sérotypes inclus dans le vaccin, contre 69% des isolats chez des patients bactériémiques vaccinés. Le vaccin antipneumococcique ne semble pas être protecteur dans cette population à haut risque [57].

La fréquence élevée des sérotypes déjà inclus dans le vaccin pourrait s'expliquer par le fait que les sujets n'ont pas été ou correctement vacciné. Elle montre l'importance de revoir les stratégies, de faire un monitoring, une évaluation du problème pour fournir des informations épidémiologiques et déterminer la pertinence de l'utilisation du vaccin Prevnar®13 dans le PEV de routine.



## **Conclusion et perspectives**

Les méningites bactériennes à pneumocoque représentent aujourd'hui un problème de santé publique, malheureusement peu d'études sont effectuées au Mali pour déterminer les différents sérotypes de pneumocoque incriminés dans les maladies invasives.

Dans notre étude, le pneumocoque est classé comme première étiologie des méningites bactériennes surtout après la quasi disparition des méningites à *Neisseria meningitidis* serogroupe A et la diminution des cas à *Haemophilus influenzae* type b grâce à l'introduction respective des vaccins MenAfrivac et pentavalent au Mali.

L'intérêt de la connaissance des sérotypes est d'ordre épidémiologique, il est important pour le choix de la composition d'un vaccin utilisable chez les sujets à risque dont le jeune enfant, en raison de la gravité de l'atteinte pneumococcique.

Au vu des résultats acquis au cours de cette étude, il serait particulièrement intéressant d'accorder une attention particulière à la surveillance épidémiologique des méningites bactériennes à *Streptococcus pneumoniae* et, dans la continuation directe de ce travail de créer un système de recrutement maximal de produits pathologiques émanant de services hospitaliers, de traitements ambulatoires et de laboratoires périphériques hospitaliers, publics ou privés afin d'obtenir de plus amples connaissances sur les sérotypes responsables de maladies invasives au Mali.

## **Recommandations**

Au terme de cette étude, les recommandations suivantes sont formulées :

### **A l'INSP**

- Mettre en œuvre les techniques de la PCR conventionnelle classique pour l'identification de plus de sérotypes et éventuellement déterminer certains sérotypes associés en sérogroupe.
- Partager les résultats de cette étude avec les services d'immunisation et les districts sanitaires du Mali.

### **Au Programme Elargi de Vaccination (PEV)**

- Exploiter les résultats relatifs à l'existence et à la fréquence élevée des sérotypes non inclus dans le vaccin actuellement utilisé afin d'envisager l'élaboration et l'introduction d'un autre dans notre programme de vaccination qui serait alors mieux adapté à l'épidémiologie de notre pays.

## **A l'OMS et au CDC**

- Continuer d'appuyer l'INSP :
  - Dans la mise en œuvre des techniques de la PCR conventionnelle.
  - Dans la formation sur les techniques de la PCR.

## Références bibliographiques

- [1] Mymozette DN. Connaissances, attitudes et pratiques des étudiants de la faculté de médecine et d'odontostomatologie (FMOS) en matière de vaccination.[Thèse].Médecine : Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako.2019 ;98 p.
- [2] Black S, Shinefield H, Fireman B, Lewis E, Ray P, Hansen JR, et al. Efficacy Safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19:187 – 95.
- [3] Surveillance épidémiologique de Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP). 2014.
- [4] OMS. Immunization, vaccines and biologicals: Estimated Hib and pneumococcal deaths for children under 5 years of age 2008 ; 2013.
- [5] Cheung YB, Cutts FT, Zaman SM, Ruopuro ML,Greenwood B, Enwere G, et al. C-reactive protein and procalcitonin in the evaluation of the efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine in Gambian children. *Trop Med and int Health.* Mai 2008;13(5):603-11. Epub 6 MARS 2008.
- [6] Campbell JD, Kotloff KL, Sow SO, Tapia M, Keita MM,Levine MM, et al. Invasive Pneumococcal Infections Among Hospitalized Children in Bamako, Mali. *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23(7):642-9.
- [7] Sanogo H. Caractérisation des souches de *Streptococcus pneumoniae* et d' *Haemophilus influenzae* chez les enfants de 0 à 5 ans après l'introduction des vaccins pentavalent et le prevnar 13® au Mali .[Thèse]. Pharmacie.Bamako: USTTB.2014 ;112p.
- [8] Thierry J, Perrier-Gros-Claude JD, Masseron T. in :Précis de bactériologie clinique. *Streptococcus pneumoniae.* 2007.p .899 – 909
- [9] [www.infectiologie.org](http://www.infectiologie.org). 10/05/14.
- [10] Balows A, Hausler WJ, Kenneth LH, Isenberg HD, Shadomy HJ . Manual of clinical microbiology. 5th edition.1991. p.243- 4
- [11] Lemozy J, Suc C. Actualités sur les streptocoques et entérocoques (Données taxonomiques et identification). *Feuillet de Biologie* 1997;37(215):15- 22.
- [12] Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin microbiol.*1995;33:2759-62.
- [13] Park IH, Pritchard DG, Cartee R,Brandao A, Brandileone MCC , Nahm MH. Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 2007;45(4):1225-33.
- [14] Bratcher PE, Park IH, Hollingshead SK, Nahm MH. Production of a unique pneumococcal capsule serotype belonging to serogroup 6. *Microbiol.* Fev 2009;155(2) :576-83.
- [15] Rieux V. Les facteurs de virulence de *Streptococcus pneumoniae*. *Medecine et maladies infectieuses.* Mar 2002;32 suppl1:1-12.
- [16] Alanso-DeVelasco E, Verheul AF, Verhoef J, Snippe H. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev.* 1995;59:591- 603.
- [17] Varon.E. Infections invasives à pneumocoque en France : Evolution de la résistance aux antibiotiques et de la distribution des sérotypes. *J Anti Infect.* 2011;13:201- 8.
- [18] Mitchell TJ, Andrew PW. Biological properties of pneumolysin. *Microb Drug Resist.* 1997;3:19-26.
- [19] Sicard M, Gasc.AM, Giammarinaro P, Lefrancois J, Pâtes F, Samrakandi M. Molecular biology of *Streptococcus pneumoniae*: an everlasting challenge. *Res Microbiol* 2000;151:407- 11.
- [20] Bédos JP, Rolin O, Bouanchaud DH, Pocidallo L. Relationship between virulence and resistance to antibiotics in pneumococci. Contribution of experimental data obtained in an animal model. *Pathol Biol.* 1991;39:984- 90.

- [21] Paolis F, Beghetto E, Spadoni A, Montagnani F, Felici F, Oggioni MR, et al. Identification of a human immunodominant B-cell epitope within the immunoglobulin A1 protease of *Streptococcus pneumoniae*. BMC Microbiology. 2007;7:113.
- [22] Hecini-Hannachi A. *Streptococcus pneumoniae* dans les infections invasives : identification, résistance aux antibiotiques et sérotypage Université [Thèse]. Bactériologie :Constantine I Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Microbiologie ; 2014.269p.
- [23] Tunkel AR, Scheld WM. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. Clin Microbiol Rev. Avril 1993;6(2):118-36.
- [24] WHO. Gestion des épidémies de méningite en Afrique : guide de référence rapide à l'intention des autorités sanitaires et des soignants. 2010.
- [25] European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.EUCAST guidance documents in susceptibility testing. Dans : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. ; 2016; Available from: ([http://www.eucast.org/guidance\\_documents/](http://www.eucast.org/guidance_documents/)).
- [26] Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel: principes et applications by The Moroccan Society of Biology in Canada. Rev. Biol. Biotech. Dec 2002;2:2-11.
- [27] Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology. 2000;25:169-93.
- [28] Martell M, Gomez J, Esteban JI, Sauleda S, Quer J, Cabot Beatriz, et al. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of Hepatitis C virus RNA. Journal of Clinical Microbiology. 1999; 37:327-32.
- [29] Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Biotech. Jan 1997;22:130-8.
- [30] Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real time PCR in virology 2002 ; p.1292-305.
- [31] Gibson UEM, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Res.1996 ;6 : 995-1001.
- [32] Gaillat J, Zmirou D, Mallaret M. Essai Clinique du vaccin antipneumococcique chez des personnes âgées vivant en institution. Rev Epidemiol et Sant Publ. 1985;33 :437- 44.
- [33] Bolan G, Broome CV, Facklam RR, Plikaytis BD, Fraser DW, Schlech WF. Pneumococcal vaccine efficacy in selected populations in the United States. Ann Intern Med 1986;104:1- 6.
- [34] Rodriguez-Barradas MC, Musher DM, LaHart C, Lacke C , Groover J, Watson D, et al . Antibody to capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* after vaccination of human immunodeficiency virus-infected subjects with 23-valent pneumococcal vaccine. J Infect Dis.1992;165:553- 6.
- [35] Lee HJ, Kang JH, Henrichsen W. Immunogenicity and safety of a 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in healthy children and in children at increased risk of pneumococcal infection Vaccine. 1995;13:1533- 38.
- [36] Whitney CG, Pilishvili T, Farley MM, Schaffner W, Craig AS, Lynfield R, et al. Effectiveness of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease: a matched case-control study. Lancet. 2006;368:1495- 502.
- [37] [WWW.GOOGLE.FR](http://WWW.GOOGLE.FR). 20/05/2014
- [38] Harrington SM, Stock F, Kominski AL, Campbell JD, Hormazabal JC, Livio S, et al. Genotypic analysis of invasive *Streptococcus pneumoniae* from Mali, Africa, by semiautomated repetitive-element PCR and pulsed-field gel electrophoresis. J clin microbiol. 2007;45(3): 707-14.
- [39] OMS:Division des Maladies émergentes et autres Maladies transmissibles (Surveillance et Lutte) :Lutte contre les épidémies de méningite à méningocoque :Guide pratique OMS.
- [40] Doumbia S. Aspects épidémiologiques et bactériologiques de la méningite dans le district de Bamako avant et après l' introduction du MenAfriVac: :Etude comparative des données des périodes (2009-2010) ET (2011-2012). [Thèse]. Médecine.Bamako: Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako.2013 ;69p.

- [41] Coulibaly F. Infections bactériennes invasives dans le service de pédiatrie du chu-Gabriel Toure (à propos de 341 cas). [Thèse]. Médecine. Bamako: Université de Bamako. 2007 ; p103.
- [42] Soeters HM, Diallo AO, Bicaba BW, Kadade G, Dembélé AY, Acyl MA, et al. Bacterial Meningitis Epidemiology in Five Countries in the Meningitis Belt of Sub-Saharan Africa, 2015-2017. *J Infect Dis.* Oct 2019 ; 220 : S165-S174.
- [43] Djibo Je, Yanogo PK, Kaboré J, Sawadogo B, Alkassoum Je, Antara S, et al. Meningitis trends in Niger 2008-2015: a secondary data analysis. *Med Sante Trop.* Nov 2019;29(4):435-9.
- [44] Sidikou F, Potts CC, Zaneidou M. Épidémiologie de la méningite bactérienne au cours des neuf années écoulées depuis l'introduction du vaccin conjugué contre le méningocoque du sérotype A, Niger, 2010-2018. *J Infect Dis.* oct 2019;220 (Supplément\_4):S206-S15.
- [45] Gervais A, Taguebue J, Bescher BN, Corbeil J, Raymond F, Alcoba G, et al. Bacterial meningitis and pneumococcal serotype distribution in children in Cameroon. *Pediatr Infect Dis J.* oct 2012;31(10) : 1084-7.
- [46] Traore Y, Tameklo TA, Lourd M, Yaro S, Niamba D, Drabo A, et al. Incidence, seasonality, age distribution, and mortality of pneumococcal meningitis in Burkina Faso and Togo. Mar 2008 ; *Clin Infect Dis.* 48 Suppl 2:181-9.
- [47] Kambire D, Soeters HM, Ouedraogo Traore R, Medah I, Sangare L, Yaméogo I, et al. Nationwide Trends in Bacterial Meningitis before the Introduction of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine—Burkina Faso, 2011–2013. *PLoS ONE.* 2016;16 :6-11.
- [48] Levy C, De La Rocque F, Cohen R. Epidemiology of pediatric bacterial meningitis in France. *Med Mal Infect.* Avril 2009, 39 (7-8) : 419-431.
- [49] Kwambana-Adams BA, Asiedu-Bekoe F, Sarkodie B, Afreh OK, Kuma GK, Owusu-Okyere G, et al. An outbreak of pneumococcal meningitis among older children ( $\geq 5$  years) and adults after the implementation of an infant vaccination programme with the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in Ghana. *BMC Infect Dis.* Oct 2016;16(1):575.
- [50] Demczuk WHB, Martin I, Griffith A, Lefebvre B, McGeer A, Lovgren M, et al. Serotype distribution of invasive *Streptococcus pneumoniae* in Canada during the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Can J Microbiol.* Dec 2013 ; 59(12) : 778-88.
- [51] Samaké B. Caractères bactériologiques et place des *Streptococcus pneumoniae* dans les infections bactériennes invasives chez les enfants hospitalisés dans le service de pédiatrie de l'Hôpital Gabriel Touré. [Thèse]. Bamako: FMPOS. 2004-2005. p97.
- [52] Ramdani-Bouguessa N, Rahal K. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Algiers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* Fev 2003;47(2):824–6.
- [53] Kambiré D, Soeters HM, Ouédraogo-Traoré R, Medah I, Sangaré L, Yaméogo I, et al. Early impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis—Burkina Faso, 2014-2015. *J Infect.* 2018 March; 76 (3): 270-279.
- [54] Shibl A, Memish Z, Pelton S. Epidemiology of invasive pneumococcal disease in the Arabian Peninsula and Egypt. *Antimicrob Agents Int J.* 2009 May;33(5):410. Epub 2008 Oct 30.
- [55] Mackenzie GA, Hill PC, Jeffries DJ, Hossain I, Uchendu U, Ameh D, et al. Effect of the introduction of pneumococcal conjugate vaccination on invasive pneumococcal disease in The Gambia: a population-based surveillance study. *Lancet Infect Dis.* 2016 ; 16 (6) : 703-711. Epub February 17, 2016.
- [56] Walekhwa M, Muturi M, Gunturu R, Kenya E, Kabera B. *Streptococcus pneumoniae* Serotype Epidemiology among PCV-10 Vaccinated and Unvaccinated Children at Gertrude's Children's Hospital, Nairobi County: A Cross-Sectional Study. 2018 ;7:879. Epub 2018 Jun 22 (revised 2019 Jan 31).
- [57] Forrester HL, Jahnigen DW, LaForce FM. Inefficacy of pneumococcal vaccine in a high-risk population. *Am J Med.* 1987 ; 83: 425-30.

## Résumé en français

**Introduction :** Au Mali *Streptococcus pneumoniae* est devenu le germe le plus incriminé dans les méningites bactériennes après l'introduction du vaccin MenAfrivac contre le meningocoque et le vaccin pentavalent contre *Haemophilus influenzae* type b. Bien qu'un vaccin ait été introduit dans le Programme Elargi de Vaccination contre *Streptococcus pneumoniae*, sa fréquence d'isolement ne diminue pas pour autant. Le but de cette étude était de faire une cartographie des sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* responsables de méningites au Mali.

**Matériels et méthodes :** Il s'agissait d'une étude transversale descriptive à collecte rétrospective réalisée dans le cadre de la surveillance épidémiologique de la méningite au Mali du 1<sup>er</sup> janvier 2014 au 31 décembre 2018 à l'Institut National de Santé Publique (INSP). Le sérotypage a été effectué par rtPCR avec le par le STRATAGENE mx3005p. Il a concerné tous les LCS examinés positifs au *Lyt A* par rtPCR dont les conditions de conservation étaient adéquates et leur quantité suffisante pour permettre le sérotypage (284+1 cas). Un contrôle de qualité a consisté à retester tous les échantillons pour le *Lyt A*. **Résultats :** *Streptococcus pneumoniae* est le germe le plus isolé avec 52,80%. 37,0% des échantillons (105/284) n'étaient pas typables par les techniques de la PCR en temps réel. Sur les sérotypes identifiés, le sérotype 1 a représenté avec 24,58 % (44/179 cas) majoritairement chez les sujets de 15-29 ans ; le sérotypes 2 et 12F/12A/12B/44/46 représentaient chacun 18,99 % (34/179 cas) en majorité chez des enfants de moins d'un (1) an respectivement 91,17% (31/34 cas) et 52,94% (18/34 cas). 46,4% étaient des sérotypes Prevnar 13® (83/179 cas) et 44,1% sont des non-Prevnar 13® sérotypes (79/179 cas). **Conclusion :** L'existence de sérotypes inclus /ou non dans le Prevnar 13® implique de revoir les stratégies de vaccination contre les infections invasives à pneumocoque ; d'où la nécessité d'envisager l'élaboration d'un nouveau vaccin incluant ces sérotypes.

**Mots clés :** Méningites bactériennes, Sérotypes, *Streptococcus pneumoniae*, Mali, vaccins.

## Résumé en Anglais

**Introduction :** In Mali *Streptococcus pneumoniae* has become the most implicated germ in bacterial meningitis after MenAfrivac and pentavalent vaccines introduction against meningococcus and *Haemophilus influenzae* type b. Although a vaccine introduced against *Streptococcus pneumoniae* in the Widen immunization Program, its frequency didn't decrease. The objective of this study was to map the serotypes of *Streptococcus pneumoniae* circulating in Mali. **Populations and methods :** It was a descriptive cross-sectional study with retrospective collection. It was carried out as part of epidemiological surveillance of meningitis in Mali from January 2014 to December 2018 at the National Institute of Public Health. It concerned all LCS positive for Lyt A by real time techniques with quantity was allow for serotype. All samples undergone quality control to confirm cases. **Résultats :** Study concerned 285 samples and *Streptococcus pneumoniae* was the most implicated germ with 52,80%. 37,0 % of samples (105/284 cases) was not typables by the real time PCR. On identified serotypes, the main one was serotype 1 with 24,58 % (44/179 cases) mostly into people who was 15-29 years old. the serotype 2 and 12F/12A/12B/44/46 represented for every one 18,99 % (34 cases) mainly identified in children who ages was under 1 year respectively 91,17% (31/34 cases) et 52,94% (18/34 cases). 46,4% was Prevnar 13® serotypes (83/179 cases) and 44,1% the none -Prevnar 13® one (79/179 cases). **Conclusion :** The existence of included /or no serotypes in Prevnar 13® vaccine involved to review the vaccination strategies against invasive pneumococcal infections, which is the necessity to consider the elaboration of a new vaccine including those serotypes.

Mots clés : Bacterial meningitis, Sérotypes, *Streptococcus pneumoniae*, Mali, vaccines.

