

Ministère de l'enseignement
Supérieur et de la recherche



République du Mali
Un peuple Un But Une Foi

Scientifique

U.S.T.T-B

**Université des Sciences, des Techniques et
des Technologies de Bamako**

FACULTÉ DE PHARMACIE

(FAPH)



Année académique 2012-2013

N° _____

THÈSE

Étude comparative de la PCR classique et de la PCR en temps réel dans le diagnostic des méningites dues à *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* de type b

Présentée et soutenue publiquement le 23 /10 /2014 devant la
faculté de pharmacie

par :

Mr Adama Sounkalo DIARRA

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'État)

Jury

Président du jury :	Pr Sounkalo DAO
Membres du jury :	Dr Mahamadou Farka MAIGA Pr Souleymane DIALLO Dr Seydou DIARRA
Co-directeur :	Dr Ibrahim GUINDO
Directeur :	Pr Flabou BOUGOUDOGO

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2013-2014

ADMINISTRATION

DOYEN : **BOUBACAR TRAORE** - MAITRE DE CONFERENCES

VICE-DOYEN : **MR ABABACAR I MAIGA** - MAITRE DE CONFERENCE

SECRETAIRE PRINCIPAL : **SEYDOU COULIBALY** – ADMINISTRATEUR CIVIL

AGENT COMPTABLE : **Famalé DIONSAN** - CONTROLEUR DES FINANCES

LES PROFESSEURS A LA RETRAITE

Mr Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
Mr Boukassoum	H Aidara	Législation
Mr Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
Mr Massa	SANO GO	Chimie Analytique
Mr Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
Mr Moussa	HARAMA	Chimie Organique
Mr Abdourahamane S.	MAIGA	Parasitologie

DER DE SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

1. PROFESSEURS

Mr Brahma	KOUMARE	Bactériologie-Virologie
Mr Amagana	DOLO	Parasitologie- Mycologie
Mr Bakary M	CISSE	Biochimie
Mr Abdoulaye	DABO	Biologie/Parasitologie Chef DER

2. MAITRE DE CONFERANCES

Mr Flabou	BOUGOUDO GO	Bactériologie-Virologie
Mr Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie
Mr Mounirou	BABY	Hématologie
Mr Bourèma	KOURIBA	Immunologie
Mr Souleymane	DIALLO	Bactériologie-Virologie
Mr Ousmane	KOITA	Parasitologie moléculaire
Mr Abdoulaye	TOURE	Entomologie Médicale
Mr Abdoulaye	DJMDE	Microbiologie-Immunologie
Mr Mahamadou	DIAKITE	Immuno logie-Généti que

3. MAITRESASSISTANTS

Mme Fanta	SANGHO	Santé Publique
Mr Aldjouma	GUINDO	Hématologie

4. ASSISTANTS

Mr Seidina Aboubacar Samba	DIAKITE	Immunologie
Mr Klétigui Casmir	DEMBELE	Biochimie clinique
Mr Yaya	GOITA	Biochimie clinique
Mr Oumar	GUINDO	Biochimie
Mr Samba Adama	SANGARE	Bactériologie-Virologie

DER DE SCIENCES DU MEDICAMENT

1. PROFESSEURS

Mr Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
Mr Ousmane	DOUMBIA	Pharmacie chimique
Mr Elimane	MARIKO	Pharmacologie Chef DER

2. MAITRES DE CONFERANCES

Mr Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
Mr Ababacar I	MAIGA	Toxicologie

3. MAITRES ASSISTANTS

Mr Sékou	BAH	Pharmacologie
----------	-----	---------------

4. ASSISTANTS

Mr Aboubacar	ALASSANE OUMAR	Pharmacologie
Mr Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
Mr Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
Mr Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
Mr Madani	MARIKO	Chimie Analytique
Mr Tidiane	DIALLO	Toxicologie
Mr Blaise	DACKOUO	Chimie Analytique

DER DE SCIENCE PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS

Mr Drissa DIALLO Pharmacognosie

2. MAITRES DE CONFERANCES

Mr Alou KEITA Galénique

Mr Saibou MAIGA Législation **Chef DER**

Mme Rokia SANOGO Pharmacognosie

3. MAITRES ASSISTANTS

Mr Yaya COULIBALY Législation

Mr Loséni BENGALY Pharmacie Hospitalière

4. ASSISTANTS

Mr Bakary Moussa CISSE Galénique

Mr Bourama TRAORE Législation

Mr Issa COULIBALY Gestion

Mr Hamma Boubacar MAIGA Galénique

Mr Hammadou Abba TOURE Législation

Mr Balla Fatogoma COULIBALY Pharmacie Hospitalière

Mr Adama DENOUE Pharmacognosie

Mr Mahamane HAIDARA Pharmacognosie

Mr Karim TRAORE Pharmacien

DER DE SCIENCE FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS

Mr Mamadou	KONE	Physiologie
Mr Albert Yenimegue	DEMBELE	Chimie Organique
Mr Mahamadou	TRAORE	Génétique

2. MAITRES DE CONERENCES

Mr Mouctar	DIALLO	Biologie/Parasitologie-Mycologie Chef DER
Mr Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
Mr Lassana	DOUMBIA	Chimie minéral
Mr Mamadou	CISSE	Biologie

3. ASSISTANTS

Mr Moussa	KONE	Chimie Organique
Mr Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie
Mr Oumar	GUINDO	Biochimie

CHARGES DE COURS ET ENSEIGNANTS VACATAIRES

Mr N'Golo	DIARRA	Botanique
Mr Bouba	DIARRA	Bactériologie
Mr Boubacar	KANTE	Galénique
Mr Mahamadou	TRAORE	Génétique
Mr Lassine	SIDIBE	Chimie Organique

ENSEIGNANTS EN MISSION

Pr. Babacar	FAYE	Pharmacodynamique
Pr. Amadou Papa	DIOP	Biochimie
Pr. Pascal	BONNABRY	Pharmacie Hospitalière

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	9
LISTE DES TABLEAUX	11
LISTE DES FIGURES	12
DEDICACES.....	13
REMERCIEMENT	14
HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY.....	16
INTRODUCTION.....	18
PREMIÈRE PARTIE : GENERALITES	20
1. La technique de PCR.....	21
1.1. Définition de la PCR	21
1.2. L'ADN.....	21
1.3. Historique	22
1.4. Principe de la PCR [15].....	23
1.4.1. Étapes de réalisation de la PCR [16]	24
1.4.1.1. Variantes associées à la PCR.....	28
2. Les méningites bactériennes aiguës.....	30
2.1. Agents fréquemment responsables des méningites bactériennes aiguës :.....	30
2.1.1. <i>Neisseria meningitidis</i> : [17,18, 19]	30
2.1.2. <i>Haemophilus influenzae</i> de type b [18]	30
2.1.3. <i>Streptococcus pneumoniae</i> [18]	31
2.2. Formes cliniques : [23, 24, 25,26].....	32
2.2.1. Période de début:.....	32
2.2.2. Période d'état.....	32
2.2.3. Évolution	33
2.3. Diagnostic biologique.....	33
2.3.1. Modalité de recueil du LCR [27].....	33
2.3.2. Moyen de transport du LCR [9, 25]	34
2.3.3. Techniques de diagnostic	34
2.3.4. Le traitement [32, 24, 33, 34, 35]	37
DEUXIÈME PARTIE	41
1. JUSTIFICATION	42
2. OBJECTIFS.....	43
2.1. Objectif général :	43

2.2.	Objectifs spécifiques :	43
3.	METHODOLOGIE	43
3.1.	Cadre et Lieu de l'étude	43
3.2.	Type et période de l'étude :	46
3.3.	Matériels de l'étude	47
3.3.1.	L'échantillon utilisé.....	47
3.3.2.	Patients	47
3.3.2.1.	Définition des cas	47
3.3.2.2.	Critères d'inclusion et de non inclusion	47
3.3.2.3.	Échantillonnage	48
3.3.2.4.	Taille de l'échantillon.....	48
3.3.3.	Matériels de ponction	48
3.3.4.	Matériel de conservation et de transport du LCR.....	48
3.3.5.	Matériels, réactifs, consommables et milieux de culture de la bactériologie classique.	49
3.3.6.	Matériels, équipements, consommables et réactifs des techniques de PCR.....	50
3.4.	Méthodes de l'étude	56
3.4.1.	Méthode de conservation et de transport du LCR	56
3.4.2.	Méthodes de diagnostic	57
3.4.2.1.	Méthodes de diagnostic de bactériologie classique	57
3.4.2.2.	Les méthodes de diagnostic par la PCR	62
3.4.2.2.1.	Technique de la PCR classique [42].....	62
3.4.2.2.2.	Technique de la PCR en temps réel.....	69
3.4.3.	Phase de collecte des données	75
3.4.4.	Saisie et analyse des données	75
3.4.5.	Considérations éthiques.....	76
3.4.6.	Chronogramme des activités	76
4.	RESULTATS	77
4.1.	Description de la population étudiée	77
4.2.	Répartition des LCR analysées à l'INRSP en 2012 par Région et par district sanitaire ...	79
4.3.	Répartition des LCR selon l'aspect, le conditionnement et la qualité du prélèvement	81
4.4.	Résultat de la bactériologie classique et de la PCR.....	82
4.5.	Analyse comparée des résultats de la bactériologie classique et des deux PCR	84
5.	COMMENTAIRE ET DISCUSSION	91
6.	RECOMMANDATIONS	96
7.	CONCLUSION	96

8. REFERENCES	98
9. ANNEXES	103

LISTE DES ABREVIATIONS

%	: Pourcentage
°C	: Degré Celsius
µl	: Microlitre
ADN	: Acide Désoxyribo Nucléique
AFRO/OMS	: Bureau OMS pour la région Afrique
AMP	: Agence de Médecine Préventive
BET	: Bromure d'Ethydium
BGN	: Bacille à Gram Négatif
CDC	: Centers for Diseases Control and Prevention
CGP	: Cocci à Gram Positif
CHU	: Centre Hospitalier Universitaire
CSRéf	: Centre de Santé de Référence
Ct	: cycle threshold
CVD	: Center for Vaccine Development (Centre pour le Développement des Vaccins)
DGN	: Diplocoque à Gram Négatif
DGP	: Diplocoque à Gram Positif
DMSO	: Di Méthyle Sulfoxyde
DNS	: Direction Nationale de la Santé
dNTP	: desoxy nucléotide triphosphate
g	: gramme
g/l	: gramme par litre
H	: Heure
HCl	: Acide chlorhydrique
Hib	: <i>Haemophilus influenzae</i> de type <i>b</i>
I.M	: Intra musculaire
I.V	: Intra veineux
INRSP	: Institut National de Recherche en Santé Publique
LCR	: Liquide Céphalo-Rachidien
MBA	: Méningite Bactérienne Aigue
mg/kg/j	: Milligramme par kilogramme par jour
MgCl ₂	: Chlorure de Magnésium

ml	: Millilitre
mm ³	: Millimètre cube
N°	: Numéro
(NH ₄) ₂ SO ₄	: Sulfate d'ammonium
NTC	: No Template Control
OMS	: Organisation mondiale de la Santé
ORL	: Oto-rhino-laryngologie
PCR	: Polymerase by Chain Reaction
PEV	: Programme Élargi de Vaccination
pH	: Potentiel d'Hydrogène
PL	: Ponction Lombar
PNUD	: Programme des Nations Unies pour le Développement
SC	: Sous-cutané
Taq	: Thermus aquaticus
T-I	: Trans-Isolate
TBE	: Tris Borate EDTA
Tm	: Temperature melting
UNICEF	: Nations of International Children's Emergency Fund
USAID	: United States Agency for International development
UV	: Ultra-violet

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Amorces de la PCR classique	54
Tableau II: listes des amorces et sondes spécifiques des gènes à amplifier de la PCR en temps réel...	56
Tableau III : critères d'appréciation de la qualité des LCR en fonction du matériel de transport et le délai d'acheminement.....	57
Tableau IV : Réactifs et leurs volumes nécessaires pour une PCR multiplex espèce	65
Tableau V : Température d'hybridation des amorces de la PCR classique.....	66
Tableau VI: cycle thermique PCR multiplex ou simplex de confirmation de l'espèce.....	66
Tableau VII : cycle thermique PCR multiplex ou simplex de sérotype de <i>Neisseria meningitidis</i> ou sérotype de <i>Haemophilus influenzae</i> de type <i>b</i>	67
Tableau VIII : Cycles thermiques.....	73
Tableau IX : Interprétation des valeurs du C_t	74
Tableau X : Algorithme d'interprétation des résultats en fonction des amorces.....	75
Tableau XI: Répartition des patients selon le sexe.....	77
Tableau XII: Répartition des LCR par région et par district sanitaire.....	79
Tableau XIII : Répartition des LCR selon l'aspect macroscopique, le milieu de transport et la qualité	81
Tableau XIV : Résultat des LCR selon le résultat de la coloration du Gram, l'agglutination au latex et la culture.....	82
Tableau XV : Répartition des germes selon le résultat de la PCR en temps réel et de la PCR classique	83
Tableau XVI: Comparaison des résultats de la PCR en temps réel et de la PCR classique	84
Tableau XVII: Comparaison des résultats de la PCR classique avec ceux de la coloration de Gram, de l'agglutination au latex et de la culture	85
Tableau XVIII : Comparaison de la PCR en temps réel au Gram, au test d'agglutination au latex et à la culture.....	86
Tableau XIX : Répartition des résultats de la culture en fonction de l'aspect, du matériel de transport et de la qualité du prélèvement.....	87
Tableau XX : répartition des résultats de la PCR classique en fonction de l'aspect macroscopique, du matériel de transport et de la qualité.....	88
Tableau XXI : Répartition des résultats de la PCR en temps réel selon l'aspect, le matériel de transport et la qualité du LCR	89
Tableau XXII : Taux détection de <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> et <i>Haemophilus influenzae</i> type <i>b</i> par l'agglutination de latex, la culture et les deux PCR	90

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Molécule d'ADN [14].....	22
Figure 2 : Recherche du mot clé « PCR » sur pubmed à la date du 22 avril 2014.....	22
Figure 3 : Évolution de la température et des différents types de brin d'ADN au cours des quatre premiers cycles de la PCR.....	24
Figure 4 : Bandes d'une migration électrophorétique sur gel d'agarose.....	27
Figure 5: Coloration de Gram de <i>Neisseria meningitidis</i> à partir du LCR. [20].....	30
Figure 6 : Coloration de Gram d' <i>Haemophilus influenzae</i> de type b [21]	31
Figure 7: Coloration de Gram de <i>Streptococcus pneumoniae</i> [22]	31
Figure 8: Schéma d'une ponction lombaire [28].....	34
Figure 9 : Cartographie des districts sanitaires du Mali (mise à jour du 19/07/2012 [43]	44
Figure 10: Thermocycleur avec couvercle chauffant	51
Figure 11 : Appareil utilisé pour visualiser la taille des amorces.....	51
Figure 12: Bac de migration électrophorétique sur gel d'agarose.....	52
Figure 13 : a) Stratagene® Mx3005P™ et b) bloc à support de plaque	52
Figure 14 : Mise en place des peignes et des joints de coulage du gel.....	67
Figure 15 : Image du gel après PCR multiplex sérogroupage NmW135	69
Figure 16 : Schéma de plaque utilisé lors de la PCR en temps réel [13]	72
Figure 17 : Amplification/détection	73
Figure 18 : Courbe d'amplification [13]	74
Figure 19 : diagrammes de Gantt	76
Figure 20: Répartition de la population par tranche d'âge	77
Figure 21: Répartition des LCR par mois de réception.....	78
Figure 22 : Répartition des LCR par région	80
Figure 23 : Hotte de la salle sale pendant l'extraction de l'ADN bactérien.....	103
Figure 24: Hotte de la salle propre pendant la préparation des mix	103

DEDICACES

Je dédie cette thèse :

A ALLAH le tout puissant et miséricordieux de m'avoir donné l'énergie nécessaire, la chance et le courage pour franchir les différentes étapes jusqu'aujourd'hui.

Je le prie de me guider dans mes futurs projets.

Au Prophète MOHAMED (Salut et Paix sur lui) que les bénédictions et la paix de **Dieu** soient sur lui et ses **compagnons**. Nous vous témoignons notre respect et notre gratitude pour tout ce que vous avez fait pour l'humanité.

A mon père Dr Soukalo Diarra : Pour ton sens profond du devoir, l'amour de la famille, pour toutes ces valeurs morales et sociales que tu nous a inculquées. Tu n'as ménagé aucun effort quant à notre éducation. Tu m'as toujours soutenu surtout pour l'éducation que tu nous as donnée. Cher Papa je prodiguerai ce dont à mes enfants s'il plait au bon Dieu.

Que Dieu vous prête longue vie.

A ma mère Haby Damba : Cette assertion a été toujours la tienne. Courageuse, infatigable et patiente ; Tu as tout fait pour ma réussite dans la vie. J'avais toujours besoin de ton affection qui m'a beaucoup consolé dans la vie, surtout dans les moments, difficiles. Sans tes sacrifices, tes conseils, tes encouragements et tes bénédictions ce travail n'aurait jamais pu être réalisé. Qu'**ALLAH** le tout puissant t'accorde longévité et bonne santé à nos côtés.

A mes frères et sœurs : Mamadou Diarra, Mariam Tintio Diarra et Aissata Diarra ; Que l'amour fraternel qui existe entre nous perdure pour toujours. Vous êtes adorables que Dieu vous donne longue vie. Merci de votre amour. Faites mieux que moi.

A tous mes **cousins** et **cousines** je vous souhaite longue vie, santé et succès merci pour tous ces moments agréables passés ensemble puisse l'entente perdurer entre nous.

A mes amis ;

Mes chers, aucun mot ne peut traduire ce qui nous unit et ce que nous avons vécu ensemble, vous êtes ma famille et rien n'est plus important que l'amitié et pour nous, c'est la vraie.

Recevez à travers ce modeste travail qui est du reste de vous tous mes sentiments de fraternité.

A mes Oncles et Tantes

Pour l'amour, l'attachement et le respect que vous avez toujours témoigné à mon égard. Je vous remercie pour le soutien que vous m'avez apporté.

A mes belles sœurs, mes beaux-frères et à toute la famille DIAKITE. Merci de votre compréhension et de votre soutien que la paix continue de régner entre nous.

REMERCIEMENT

Au terme de ce travail j'adresse mes vifs remerciements :

A l'état Malien, pour les efforts consentis à ma formation
A tous les enseignants qui ont contribué à ma formation depuis le cycle fondamental jusqu'au cycle supérieur.

Au corps professoral de la **faculté de pharmacie**.

Pour la qualité de l'enseignement dispensé et sa disponibilité permanente.

A Mlle Kadiatou DAO biologiste au laboratoire de PCR méningite.

Votre apport au cours de ma formation de pharmacien a été inestimable.

Vos qualités humaines m'ont comblé. Ce travail est le vôtre.

A Mr Souleymane Coulibaly biologiste au laboratoire de méningite.

Vous avez été pour moi un refuge, vos conseils et votre soutien ne m'ont jamais fait défaut tout au long de mes études de pharmacien. Veuillez trouver ici les témoignages de ma profonde reconnaissance.

A tout le personnel du service de bactériologie-virologie de l'INRSP

Dr Seydou DIARRA, Dr Abdelaye KEITA, Dr Mahamadou ABDOU, Mr Boureima ZERBO Mlle Kadiatou DAO, Dr Ibrahim GUINDO Mr Alou SANOGO, Mr Demba KOITA, Mr Mamadou GUINDO, Mlle Nana kadidja Kouma, Mr Amadou YOSSSI, Mr Alfousseyni MAIGA, Mr Soumana NIARE, Mr Djibril DEMBELE, Mr Issa BOUGOUDOGO, Dr Adam SANGARE , Dr Souleymane ONGOIBA, Mr Chaka FOFANA, Mr Madou CAMARA, Mme MAIGA, Mme SAMAKE Christiane, Mme TOURE Fatimata COULIBALY, Mme GARIKO Adam GANABA, Mme TRAORE Awa SAMAKE, Dr Aissata Cissé, Mr Amadou TRAORE, Mr Marcelle KONE, Mr Ibrahima DJILLA, Mr Adrienne SIDIBE, Mr Adama DEMBELE, Dr CISSE et Mme KOITA Lobo

Vous m'avez accueilli les bras ouverts dans votre service. J'ai reçu de vous un encadrement parfait et vous n'avez ménagé aucun effort pour me transmettre toutes vos connaissances tant sur le plan théorique que pratique. Veuillez trouver ici mes sincères remerciements.

Au Professeur **Rasmata OUEDRAGO /TRAORE** chef de service de laboratoire de bactériologie virologie de Centre Hospitalier Universitaire Pédiatrique Charles de GAULLE –

CHUP-CDG de Burkina Faso et son équipe, particulièrement à **KAMBIRE Dinanibè Koffi Léopold, Mr TAMBOURA Mamadou, Mr Yoli**. Pour ne citer que cela !

Pour leur enseignements reçus sur la PCR en temps réel ; Les conseils pratiques prodigués leur sympathie et leur sagesse.

A **Daniel YEYE, Benjamin, Sanou** et **Monique ROUAMBA** à OUAGA vous m'avez émerveillé par votre sympathie. Ce travail est le vôtre.

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

➤ **A notre Maitre et Président du jury : Professeur Soukalo DAO**

Professeur titulaire des maladies infectieuses et tropicales,
Chef de service des maladies infectieuses du CHU-Point G,
Chef de DER de médecine à la FMOS,
Président de SOMAPIT,

Cher maitre,

C'est un grand honneur pour nous que vous acceptiez de présider le jury de cette thèse. Nous avons été fascinés par votre connaissance.

Homme de rigueur et de fermeté dans l'esprit scientifique, vos grandes qualités humaines et scientifiques, votre sens aigu de l'honneur, votre disponibilité dans l'encadrement de vos étudiants qui voient en vous une admiration sans partage, de votre franchise, font de vous un maitre très apprécié.

Toute notre reconnaissance pour cet honneur que vous avez fait en acceptant de présider le jury de cette thèse malgré votre programme chargé.

➤ **A notre Maitre et juge : Professeur Souleymane DIALLO**

Maitre de conférences en Bactériologie à la faculté de pharmacie ;
Colonel Major des services de Santé des armées ;

Directeur Général du centre d'infectiologie Charles Mérieux, Bamako ;

Nous sommes très touchés par l'honneur et le privilège que vous nous faites en acceptant de juger ce travail malgré vos multiples obligations.

Votre contact facile, vos grandes qualités scientifiques et humaines nous ont toujours émerveillés.

Veillez accepter, cher maitre nos sincères remerciements et notre profonde reconnaissance.

➤ **A notre Maitre et juge : Docteur Mahamadou Farka MAIGA**

Chef de la section surveillance épidémiologie de la Direction Nationale de la Santé.

C'est un honneur que vous nous faites en acceptant de siéger dans ce jury de thèse malgré vos multiples occupations.

Votre disponibilité et votre simplicité nous ont beaucoup impressionnés.

La courtoisie et l'esprit de collaboration qui vous animent nous ont beaucoup marqué.

Veillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.

➤ **A notre Maitre et juge : Monsieur Seydou DIARRA**

Biologiste, chef de service de bactériologie –virologie de l'INRSP

Homme de grande simplicité, nous sommes flattés d'avoir appris à vos côtés. Nous vous remercions cher maitre pour la patience dont vous avez fait preuve à notre égard durant toute notre formation, vous nous avez appris le sens de la rigueur dans le travail

Votre générosité, votre disponibilité ainsi que vos qualités intellectuelles nous honorent.

Recevez ici très cher maitre, l'expression de notre profonde reconnaissance et gratitude.

➤ **A notre Maitre et Co-directeur de thèse : Docteur Ibrahim GUINDO**

Pharmacien biologiste,

Responsable du laboratoire des IST/VIH de l'INRSP

Honorable Maitre,

Ce fut pour nous une opportunité de vous avoir eu comme encadreur.

Votre détermination, votre courage et votre rigueur font de vous un exemple dans le domaine de la recherche. Vos qualités humaines et intellectuelles, votre disponibilité permanente nous ont permis de mener à bien ce travail.

Trouvez ici cher Maitre, l'expression de notre gratitude et de notre profond respect.

➤ **A notre Maitre et Directeur de thèse : Pr Flabou BOUGOUDOGO**

Maitre de conférences Agrégé de bactériologie et virologie à la faculté de pharmacie et de médecine ;

Responsable de l'enseignement de la bactériologie et de la virologie à la faculté de pharmacie ;

Directeur de l'INRSP de 2002 à 2012 ;

Chevalier de l'ordre duss mérite de la Santé

Cher maitre,

Nous avons bénéficié de vos qualités pédagogiques et humaines.

Vos remarque et suggestions ont sans doute contribué à l'amélioration de la qualité de ce travail.

Nous gardons de vous l'image d'un grand homme.

Permettez-nous cher Maitre, de vous exprimer à travers ce travail tout notre respect et profonde gratitude.

INTRODUCTION

La méningite est une maladie infectieuse grave qui provoque une inflammation des méninges et du liquide céphalorachidien (LCR). Elle est souvent mortelle si elle n'est pas traitée le plus rapidement possible [1]. Dans le monde, selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), on estime à 1,2 million le nombre de cas de méningites bactériennes dont 135.000 cas mortels chaque année [2].

Les principales bactéries en cause sont : *Haemophilus influenzae* de type b avec 13%, *Streptococcus pneumoniae* (le pneumocoque) avec 32%, *Neisseria meningitidis* (le méningocoque) avec 46%. Les sérogroupes généralement responsables des épidémies à méningocoque sont les A, B, C, X et W135 [3].

Ces pathogènes sont aussi responsables d'infections invasives comme les septicémies, les pneumonies, les otites et d'autres avec une morbidité et une mortalité importantes chez l'enfant en Afrique [4].

L'hématome sous dural et la surdité qui peuvent en résulter, sont des complications redoutables [5].

En Afrique, c'est dans la ceinture de la méningite qui s'étend du Sénégal à l'Ouest jusqu'en Éthiopie à l'Est que l'on enregistre les taux les plus élevés de prévalence de cette maladie [6]. Les conditions climatiques dans le sahel pendant la saison sèche, caractérisées par la poussière, la chaleur et la sécheresse de l'air, accélèrent également la transmission. Les particules de poussière irritent les voies nasales, la chaleur dessèche les mucoités nasales, la poussière irrite et fragilise le nasopharynx ; ce qui facilite la pénétration des germes dans le sang [7]. En 2012 selon l'OMS, les pays les plus touchés dans la ceinture étaient le Burkina Faso (5300 cas cliniques), le Benin (381 cas), le Ghana (569 cas), le Nigeria (78 cas), le Tchad (2828 cas), la Cote d'Ivoire (399 cas), le Soudan (275 cas) et le Mali (565 cas). La République Démocratique du Congo, pays situé en dehors de la ceinture de la méningite, signale aussi 705 cas la même année [8].

Face à l'ampleur de ce problème majeur de santé publique, les autorités sanitaires du Mali ne ménagent aucun effort pour la mise en place d'outils efficaces de surveillance microbiologique et épidémiologique. C'est ainsi qu'au cours de la saison épidémiologique de 2009, le Mali et 13 pays Africains ont mis en œuvre une surveillance renforcée qui a permis d'enregistrer 88199 cas confirmés par la PCR, 352 décès constituant le nombre de décès le plus élevé depuis l'épidémie de 1996 [9].

Le pronostic dépend de la précocité du diagnostic. Le laboratoire joue à cet effet un rôle très important dans la confirmation des cas de méningite en cas d'épidémie et au cours de la surveillance épidémiologique. Cette confirmation nécessite une culture de la bactérie responsable, une identification des sérogroupes/sérotypes, voire des génotypes [10]. Au Mali, en plus de la bactériologie classique composée de la cytologie, de la coloration de Gram, du test d'agglutination aux particules de Latex et de la culture bactérienne, le laboratoire national de référence de la méningite dispose de deux plateformes de PCR pour améliorer le diagnostic des agents responsables de méningite bactérienne aiguë. Il s'agit de la PCR conventionnelle et de la PCR en temps réel.

Le but de notre travail est de comparer les deux plateformes de PCR dans le cadre du diagnostic moléculaire des méningites bactériennes aiguës.

Notre travail se divise en deux parties :

- une première partie portant sur les généralités concernant la PCR et les principaux agents responsables des méningites bactériennes aiguës ;
- une deuxième partie concernant la justification, les objectifs, la méthodologie, les résultats, la discussion, les conclusions et les recommandations.

PREMIÈRE PARTIE : GENERALITES

1. La technique de PCR

1.1. Définition de la PCR

La PCR (Polymerase by Chain Reaction) est une technique de biologie moléculaire, d'amplification génique *in vitro*. Elle permet de copier en grand nombre (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard), une séquence d'ADN connue, à partir d'une faible quantité (de l'ordre de quelques pictogrammes).

En moins de dix ans, cette technique, maintenant capable de faire plus d'un milliard de copie en moins d'une heure, s'est imposée dans les laboratoires. Ainsi elle a révolutionné la biologie moléculaire [12].

1.2. L'ADN

L'acide désoxyribonucléique est une macromolécule contenant l'ensemble de l'information génétique et est ainsi, le support de l'hérédité. Il permet de constituer le génome des êtres vivants et se transmet lors de la reproduction. [12]

Il se compose d'un sucre, d'une base azotée et d'un phosphate ; l'ensemble est appelé nucléotide. Le sucre et le phosphate forment le « squelette » de la molécule d'ADN tandis que les bases azotées se succèdent pour former le brin d'ADN.

Il existe deux types de bases azotées : les bases pyrimidiques (Cytosine et Thymine) et les bases puriques (Adénine et Guanine). La complémentarité des brins est possible grâce à la liaison entre l'adénine et la thymine (par deux ponts d'hydrogène) et entre la cytosine et la guanine (par 3 ponts d'hydrogène) donnant à l'ADN une structure alors bicaténaire (**voir figure 1**). L'ADN est aussi hélicoïdal. Pour former cette double hélice, deux chaînes de nucléotides complémentaires s'enroulent autour du même axe. L'appariement des deux chaînes entre elles, se font dans une position antiparallèle, c'est à dire que les 2 chaînes ont un sens inverse l'une par rapport à l'autre : Sens 5' → 3' et Anti sens 3' → 5'.

Les propriétés de synthèse enzymatique et d'initiation *in vitro*, spécifiques à l'ADN double brin sont assurées par l'ADN polymérase ADN dépendante thermostable.

Les propriétés de dénaturation et d'hybridation des brins complémentaires d'ADN sont assurées *in vitro* grâce à des transitions de température (assurées par un thermocycleur) répétées de manière cyclique lors de l'amplification.

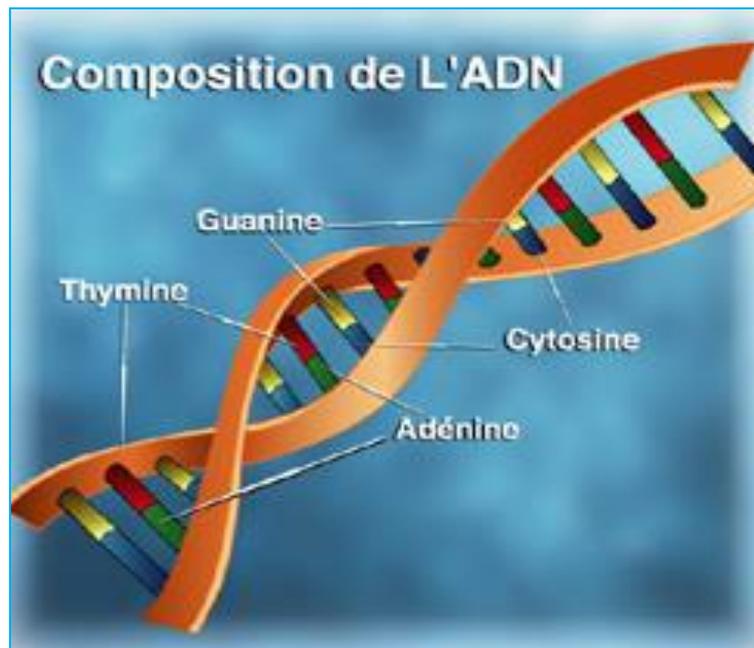


Figure 1: Molécule d'ADN [14]

1.3.Historique

La PCR est une technologie qui a bouleversé la biologie moléculaire et s'est implantée très rapidement dans les laboratoires. Et depuis sa mise au point, elle a connu des succès dans plusieurs domaines des sciences de la vie. Le nombre d'articles par année répondant aux mots clés « PCR » sur le moteur de recherche pub Med (voir figure 2) donne une assez bonne idée de leur importance dans le monde scientifique.

Figure 2 : Recherche du mot clé « PCR » sur pubmed à la date du 22 avril 2014

La technologie PCR est marquée par de grandes évolutions :

- La généralisation des thermocycleurs a permis de rendre la PCR moins contraignante et plus reproductible. Elle est devenue un pré requis indispensable à la plupart des applications nouvelles.
- La première PCR a été réalisée en 1988 avec une ADN polymérase thermostable, provenant de *Thermus aquaticus* par Saiki RK.
- Le remplacement du fragment de klenow et ADN polymérase de l'*Escherichia coli* par polymérase thermorésistante (initialement le taq) qui évite de devoir remettre de l'enzyme à chaque cycle.
- En 1953, Watson et Crick découvrent que l'ADN contient deux brins et qu'ensemble, ils forment une double hélice. La même année, James Dewey, Watson et Francis Harry Compton découvrent la structure en double hélice de l'ADN.
- En 1956, Arthur Komboy découvre l'ADN polymérase ADN dépendante (ADN polymérase).
- En 1970, Temin HM et Baltimore D co-découvrent indépendamment l'ADN polymérase ARN dépendante.
- En 1986, Kary Mullis fait la première publication sur la PCR.
- En 1992, Hirguchi R invente la PCR en temps réel. Ceci facilita la méthode quantitative et évita plusieurs étapes expérimentales contraignantes, telles l'électrophorèse sur gel d'agarose, l'acquisition de fluorescence, la calibration de l'acquisition du signal.
- En 1995, Yang Liu fait la première publication sur la taille-PCR.
- En 1996, la mise au point des polymérases temporairement inactives et activables a été faite par Lacholem et Birch DE.
- En 1997, Carl WITWERT a mis en évidence de la variation de température T_M dépendant du SYBR green.
- En 1997, Lay MD a fait les premières discriminations d'allèle grâce à la courbe de fusion.

1.4.Principe de la PCR [15]

Le principe de la PCR repose sur l'extraction de l'acide nucléique, l'amplification de l'acide nucléique extrait et la détection de l'amplicon.

1.4.1. Étapes de réalisation de la PCR [16]

- Extraction [15]

L'extraction peut être manuelle ou automatisée. Une lyse préalable des cellules est effectuée ; elle est couramment faite par des produits chimiques ou par variation thermique. Les produits les plus fréquemment utilisés en lyse chimique sont : le sulfate de guanidine et le chloroforme. Le reste du principe d'extraction consiste à capter les acides nucléiques et éliminer les éléments non nécessaires par purification. Les acides nucléiques sont le plus souvent captés par la silice magnétique, le fer et les résines échangeuses d'ions.

La lyse thermique, effectuée par choc thermique ou variation thermique consiste à passer brusquement de -20°C à 100°C provoquant aussi une lyse de la paroi bactérienne et la libération de l'ADN.

- Amplification

La PCR est une technique basée sur une répétition de cycles de transition de température. A l'exception de certaines méthodologies utilisant des sondes d'hydrolyse, chaque cycle contient trois étapes comme détaillées dans la **figure 3**.

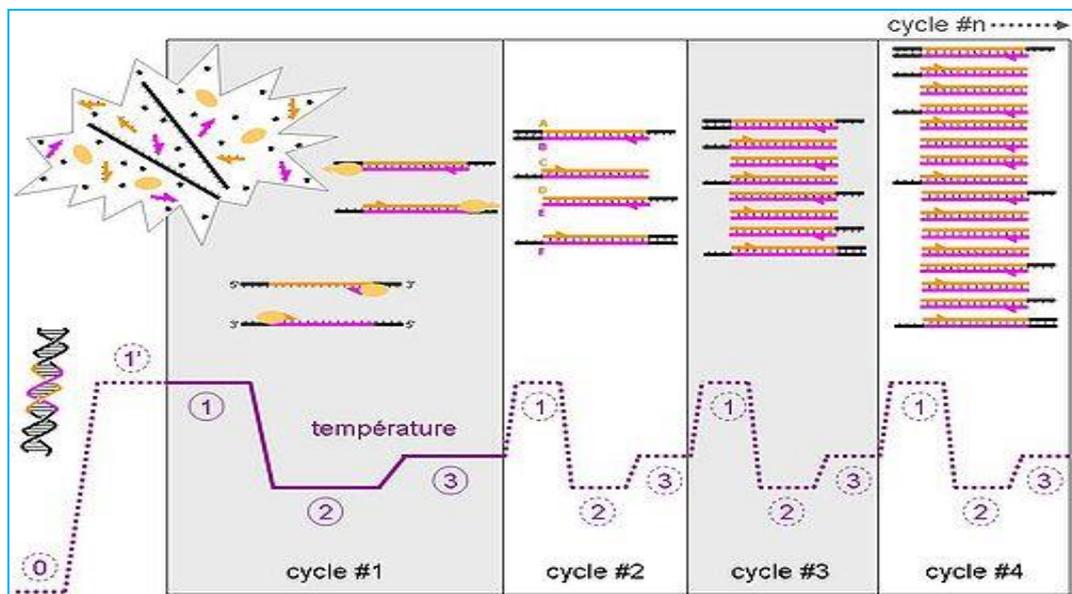


Figure 3 : Évolution de la température et des différents types de brin d'ADN au cours des quatre premiers cycles de la PCR

- **Les Composantes**

Matrice : la matrice est constituée de l'ADN obtenu par extraction.

Amorces : Dans la mise au point de la réaction PCR, le choix des amorces est crucial. Elles jouent un rôle en s'hybridant à l'ADN matrice. Elles délimitent également la région de l'ADN à amplifier avec leur extrémité 3'OH libre servant d'amorce pour l'ADN polymérase. Les séquences nucléotidiques des amorces doivent être spécifiques des séquences complémentaires de l'ADN simple-brin auxquelles elles vont s'apparier ; la complémentarité parfaite n'étant par ailleurs pas obligatoire. De plus, la spécificité de la séquence est importante dans le sens où celle-ci ne doit pas pouvoir s'apparier à une autre séquence de l'ADN que l'on ne souhaite pas répliquer.

Les séquences des amorces doivent être choisies de sorte à minimiser les possibilités d'appariement entre elles. De même, chaque amorce est choisie pour ne pas pouvoir former une structure secondaire.

Le procédé même de la PCR reposant, entre autres, sur des équilibres thermodynamiques, les amorces doivent avoir des températures de fusion le plus proche possible, autrement dit le rapport entre les bases A-T et G-C des deux amorces ne doit pas être trop différent.

dNTP (desoxynucleotide triphosphate) : est un mélange de quatre nucléotides triphosphates (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Il est utilisé au cours d'une PCR comme élément de synthèse des brins d'ADN.

Cofacteur : Le cofacteur est une substance dont la présence est nécessaire en plus d'une enzyme pour qu'une réaction se déroule. Le magnésium (Mg) est le cofacteur le plus couramment utilisé.

Tampon : Le tampon utilisé pour la réaction PCR sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour la Taq polymérase. Il contient souvent des cations bivalents Mg^{2+} servant de cofacteur.

- **Conditions natives (voir étape 0, figure 3)**

Cette étape se fait généralement à température ambiante. L'ADN bicaténaire adopte sa conformation en double hélice. Dans cet exemple, nous considérerons qu'il n'y a qu'une

molécule initiale d'ADN double brin dans la solution, la zone colorée (rose et orange) correspondant à notre amplicon.

- **Dénaturation initiale (voir étape 1', figure 3)**

Avant de commencer les cycles de PCR proprement dit, une étape de chauffage (généralement 10 à 15 minutes à 95 °C) est réalisée. Cette étape permet de dénaturer les ADN double brin, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique, d'activer les polymérases de type « Hot start », de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution (Transcriptase Inverse, Uracil-N-Glycosylase).

- **Phase de dénaturation (voir étape 1, figure 3)**

Cette étape (généralement 0 à 1 minute à 95 °C) permet de dénaturer l'ADN, de « décrocher » les polymérases qui seraient encore liées à une matrice et d'homogénéiser le milieu réactionnel. L'ADN initial adopte une conformation « linéaire » (sans structure secondaire) et simple brin. Les amorces, les dNTPs et les polymérases sont en large excès et répartis de façon homogène dans la solution.

- **Phase d'hybridation ou d'appariement des amorces (voir étape 2, figure 3)**

Cette étape (généralement 2 à 60 secondes à 56-64 °C) permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux ADN matrice grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable. Certaines des amorces dites « sens » s'hybrident avec leur séquence complémentaire sur le brin anti-sens (en rose) ; d'autres amorces dites « anti-sens » se lient aux brins sens (en orange). Deux polymérases peuvent alors interagir avec les deux complexes amorces/ADN matrice.

Peu de brins d'ADN matrice peuvent s'hybrider avec leur brin complémentaire, ce qui empêcherait la fixation des amorces, car ces dernières sont bien plus courtes et en concentration bien plus importante.

- **Phase d'élongation (voir étape 3, figure 3)**

Cette étape (généralement 4 à 120 secondes à 72 °C) permet aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température qui leur est optimale. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel. La durée de cette

étape dépend normalement de la longueur de l'amplicon. Les polymérases parcourent leur brin matrice de son extrémité 3' vers son extrémité 5' tout en synthétisant le brin complémentaire. Elles s'arrêteront au bout de leur ADN matrice, décrochées par la phase de dénaturation du cycle suivant. Les ADN néo-synthétisés sont donc précisément définis à leur extrémité 5' mais pas à leur extrémités 3' (parties noires). Les ADN sont alors bicaténaires sur une longueur plus ou moins importante ; nous obtenons alors deux brins d'ADN matrice, deux brins (un sens et un anti-sens) d'ADN précisément définis à leur extrémité 5' uniquement.

- Détection

La détection des produits de PCR varie selon le mode de PCR.

Dans la PCR classique, la détection est faite en end-point (à la fin des réactions de PCR) soit en couplant un test ELISA, soit en réalisant une migration électrophorétique sur gel d'agarose. Dans la migration électrophorétique, un agent intercalant comme le bromure d'éthidium (BET) ou le Syber[®]Green est associé pour la visibilité des bandes. Un marqueur de poids moléculaire (**Bande 1, figure 4**) est utilisé comme échelle aidant dans l'identification de nos bas d'intérêt. Une bande contrôle de la taille de notre bande d'intérêt doit être utilisée. Dans certains cas, des témoins faibles sont utilisés (Bandes 2 et 3, figure 4).

Dans la PCR en temps réel, la détection est faite en même temps que les PCR par utilisation de sondes fluorescentes. Ce sont des oligonucléotides couplés à leurs extrémités à des fluorophores. Les sondes les plus connues sont : les sondes Taqman, les sondes FRET, les sondes scorpions, les balises moléculaires.

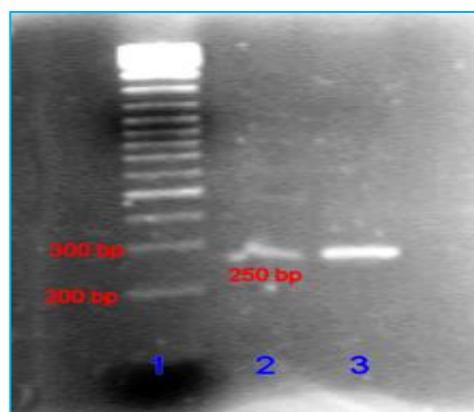


Figure 4 : Bandes d'une migration électrophorétique sur gel d'agarose

1.4.1.1. Variantes associées à la PCR

PCR multiplex

La PCR multiplex (*multiplex PCR*) est un protocole destiné à amplifier plus d'un amplicon à la fois, par l'utilisation d'au moins trois amorces par réaction de PCR. Les produits de PCR ne seront alors compétitifs que pour la polymérase, les dNTP et, éventuellement, le marqueur d'ADN. Il est également possible d'amplifier différents types d'ADN reconnus par un même couple d'amorces, tels les mimics. La PCR multiplex peut se faire en point final (les produits de PCR étant usuellement différenciés par leur taille ou la présence d'un site de restriction) elle peut aussi se faire en temps réel (chaque produit étant mesuré par une sonde spécifique couplée à un fluorophore dont le spectre d'émission est différent des autres). Ses applications qualitatives sont nombreuses (détection de souche virale, de mutations, etc.).

PCR asymétrique

C'est l'amplification par PCR en présence d'une faible quantité d'une des amorces. Elle permet le séquençage direct des fragments amplifiés. Pendant les 20 à 25 premiers cycles, l'ADN double brin est généré, jusqu'à épuisement de l'amorce limitant et de l'ADN simple brin est produit pendant les 5 à 10 derniers cycles. Les rapports d'amorces utilisés sont de 50 pmole/1-5 pmoles/100 µL (1-3 pmoles simple brin après 30 cycles).

PCR en gradient de température

Il s'agit d'une technique aidant à la mise au point d'un nouveau protocole de PCR. Elle nécessite des thermocycleurs capables d'assurer des températures différentes, pour une même étape, aux différents échantillons. Elle est surtout utilisée pour optimiser l'étape d'hybridation, notamment en PCR multiplex.

PCR quantitative ou PCR en temps réel

La PCR en temps réel (*Real-time PCR*) est une révolution dans l'utilisation de la PCR. Cette technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle (temps réel) grâce à un marqueur fluorescent. Elle permet par son principe de faire des mesures quantitatives (expliquant l'appellation PCR quantitative, *qPCR*) mais elle nécessite des thermocycleurs particuliers. Il ne faut surtout pas la confondre avec la RT-PCR (*Reverse Transcription PCR*), on préférera donc les appellations PCR quantitative ou *qPCR*. Certaines expériences en PCR

compétitive ou PCR radioactive permettent l'obtention de mesure quantitative exploitable.

RT-PCR en une étape

La RT-PCR en une étape (*single step RT-PCR*). Elle est un protocole mélangeant les réactifs de RT et de PCR afin que les deux étapes puissent se faire sans avoir à ouvrir le tube. Cela permet de réduire le risque de contamination ou d'inversion d'échantillon mais il est plus difficile d'optimiser le milieu réactionnel pour chaque étape. Cela induit en outre un risque de biais pour normaliser l'étape de RT car cela implique d'utiliser la PCR multiplex.

RT-PCR quantitative

La RT-PCR quantitative (qRT-PCR) est une technique destinée à pouvoir quantifier un type d'ARN initialement présent dans un échantillon. Ce terme désigne l'utilisation de deux techniques successivement, une transcription inverse suivie d'une PCR en temps réel. Elle nécessite l'utilisation de calibrateur externe ou interne (gène de ménage).

2. Les méningites bactériennes aiguës

2.1. Agents fréquemment responsables des méningites bactériennes aiguës :

2.1.1. *Neisseria meningitidis* : [17,18, 19]

Neisseria meningitidis apparaît en diplocoque à Gram négatif en grain de café extra et surtout intra cellulaire avec présence de nombreux polynucléaires (**figure 5**). Il appartient à la famille de *Neisseriaceae*. On recense douze 12 sérogroupes de *Neisseria meningitidis* (A, B, C, X, Y, Z, W135, 29E, H, I, K et L) dont cinq ont été associés à des épidémies (*Neisseria meningitidis* A, B, C, X et W135). La méningite à méningocoque est plus grave aux âges extrêmes. La transmission bactérienne ne s'opère de personne à personne par les gouttelettes de sécrétions respiratoires ou un contact étroit et prolongé (baiser, éternuement et toux, aussi la vie en collectivité, la mise en commun etc.) favorisent la propagation de la maladie. La période d'incubation se situe entre 2 et 10 jours, mais est généralement inférieure à 4 Jours.

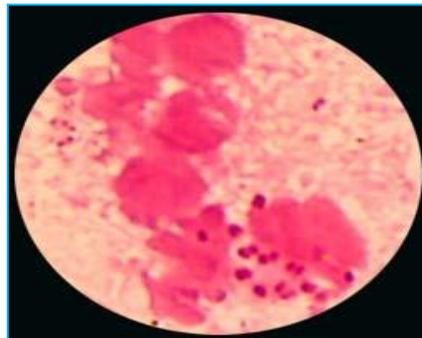


Figure 5: Coloration de Gram de *Neisseria meningitidis* à partir du LCR. [20]

2.1.2. *Haemophilus influenzae* de type b [18]

Haemophilus influenzae de type b a été découvert en 1890, par la bactériologiste allemande Pfeiffer. C'est un petit bacille ou coccobacille volontiers polymorphe à Gram négatif (**figure 6**), anaérobie facultatif. Certaines souches présentent une capsule qui est surtout retrouvée dans des bactéries issues de produits pathologiques. Contaminant les méninges par bactériémie à partir d'un foyer ORL, pulmonaire dont l'homme est le seul hôte naturel. Le genre *Haemophilus* est classé dans la famille des *Pasteurellaceae* avec les genres *Pasteurella* et *Actinobacillus*. La capsule polysaccharidique permet de différencier 6 sérotypes. Les souches couramment responsables de méningites sont de sérotype b. Avant les années 1990, c'était la principale forme de méningite bactérienne chez les enfants de moins de cinq ans et les nourrissons, avec une mortalité supérieure à 30%.

Des complications redoutables comme l'apparition d'une surdité, des séquelles neurologiques et l'hématome sous-dural peuvent apparaître.

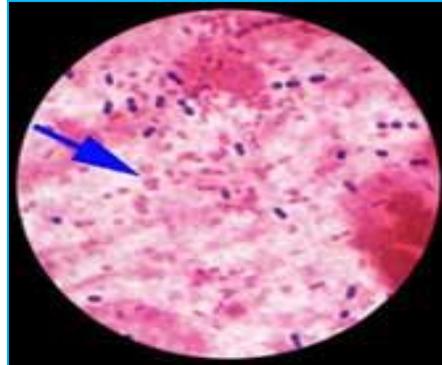


Figure 6 : Coloration de Gram d'*Haemophilus influenzae* de type b [21]

2.1.3. *Streptococcus pneumoniae* [18]

Découvert par Pasteur dès 1881, *Streptococcus pneumoniae* (les pneumocoques) sont des cocci à Gram positif, se groupant en diplocoques en flamme de bougie ou en courtes chainettes (**figure 7**), colonisant le rhino-pharynx de l'homme et des animaux.

L'infection des méninges se fait par voie septicémique à partir d'un foyer pneumococcique ORL ou d'une brèche ostéoméningée de la base du crâne qui sera systématiquement recherchée en cas de méningites récidivantes à pneumocoque. Les enfants de moins de deux ans et les personnes de plus 60 ans sont les plus touchés.

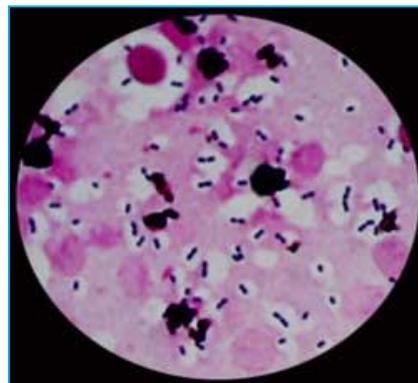


Figure 7: Coloration de Gram de *Streptococcus pneumoniae* [22]

2.2. Formes cliniques : [23, 24, 25,26]

2.2.1. Période de début:

Chez le grand enfant et l'adulte, le début est brutal après une incubation généralement silencieuse de deux à quatre jours. La température s'élève à 39-40°C, tandis que surviennent des frissons, des céphalées et des vomissements. Le début peut encore être plus subite, marqué par l'installation d'un coma. A l'inverse, les symptômes s'installent parfois plus progressivement, au cours des premières heures, la nuque est un peu raide, et douloureuse ; il existe une ébauche de signe de Kernig. A la ponction lombaire, le LCR est hypertendu, opalescent, louche et parfois clair. Il contient des polynucléaires plus ou moins altérés.

Chez le nourrisson, le début est souvent insidieux, lent et marqué par une discrète somnolence, avec des troubles digestifs prédominants (anorexie, vomissements), la tension de la fontanelle est ici le signe capital.

2.2.2. Période d'état

Elle survient vers le deuxième jour d'incubation, comprend un syndrome méningé et un syndrome infectieux.

- Le syndrome méningé

Il est évident à ce stade et se caractérise par des signes principaux qui sont : céphalées, vomissements, constipation dont l'ensemble porte le nom de trépied méningitique. Si les vomissements et la constipation sont inconstants, les céphalées sont intenses et constantes. Il faut noter que l'hyperesthésie cutanée rend difficile l'examen clinique qui retrouve la raideur de la nuque, les signes de Kernig et de Brudzinski.

- **le signe de Brudzinski** : se caractérise par la douleur et la raideur majorées par le maintien des jambes en extension.
- **le signe de Kernig** : se caractérise par le fait que la tête se rejette en arrière et les céphalées augmentent, si on ramène les jambes laissées en extension sur le tronc.

Ces deux signes sont intéressants pour le diagnostic des formes frustes.

- **Le syndrome infectieux**

Il se traduit par une fièvre élevée, un pouls rapide, un faciès vultueux. Dans le sang, on note une hyperleucocytose avec polynucléose neutrophile.

2.2.3. Évolution

- **Évolution favorable**

Elle est spectaculaire, sous l'influence d'une antibiothérapie adaptée, précoce et bien menée ; on assiste à une guérison spectaculaire, la fièvre et les céphalées disparaissent en 48 heures, le LCR quant à lui redevient limpide en 3 ou 4 jours.

- **Complications**

Elles surviennent lorsque la prise en charge n'est pas adéquate et précoce. Les complications peuvent apparaître sous forme de : paralysies oculaires, atteintes auditives, visuelles, troubles du caractère ou retard scolaire ultérieur. Les rechutes et les septicémies à méningocoques sont moins exceptionnelles.

2.3. Diagnostic biologique

Le diagnostic des méningites purulentes est un diagnostic d'urgence. Il est important de pouvoir affirmer rapidement la nature bactérienne de la méningite et de disposer sans retard d'indication sur l'étiologie afin de mettre en œuvre au plus tôt l'antibiothérapie la mieux adaptée [10].

2.3.1. Modalité de recueil du LCR [27]

Le produit pathologique est le LCR. Dès les premiers signes cliniques de la maladie, le LCR est prélevé par ponction lombaire entre le 4^{ème} (L4) et le 5^{ème} (L5) vertèbre lombaire (**figure 8**). Le prélèvement doit être fait par un personnel qualifié et dans les conditions d'asepsie afin d'éviter la contamination par les germes banals. Au moment du prélèvement, il est nécessaire de s'assurer que le patient est calme, assis ou en décubitus latéral, le dos en arc de manière à ce que la tête touche les genoux. Ensuite le LCR doit être transporté dès que possible au laboratoire pour être examiné. Il ne doit pas être réfrigéré, il faut éviter l'exposition à une chaleur excessive ou à la lumière solaire.

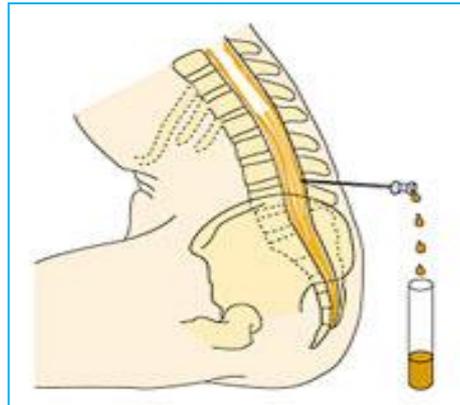


Figure 8: Schéma d'une ponction lombaire [28]

2.3.2. Moyen de transport du LCR [9, 25]

Deux moyens de transport sont couramment utilisés : le tube sec et le Trans-Isolate (T-I).

Le tube sec : Dans le tube avec fermeture à vis le LCR est recueilli et transporté en moins 1 heure au laboratoire.

Le Trans-Isolate : C'est un milieu utilisé pour le transport du LCR de la périphérie vers les laboratoires nationaux de référence et constitue un outil essentiel dans la confirmation biologique de la méningite bactérienne. Ce milieu dysphasique permet la culture primaire de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* à partir de prélèvements du LCR. Il peut être utilisé comme milieu de culture, de conservation et de transport.

2.3.3. Techniques de diagnostic

2.3.3.1. Techniques de diagnostic en routine

- **Examen macroscopique**

L'aspect macroscopique du LCR, dès réception, permet de préciser s'il est clair (eau de roche), trouble, hémorragique ou xanthochromique.

- **Cytologie et examen microscopique [10, 18,30]**

- o **Cytologie**

L'examen cytologique doit être réalisé rapidement puisque l'on considère que les polynucléaires neutrophiles sont lysés à 32% en 1 heure et 50% en 2 heures [30].

○ **L'examen direct**

Permet de préciser la présence ou l'absence de bactéries, leur morphologie (cocci ou bacilles) et le Gram (positif ou négatif), la présence d'une capsule, intra ou extra leucocytaire. Néanmoins, cette caractérisation peut s'avérer difficile, soit du fait du faible nombre de bactéries, soit en raison de leur aspect polymorphe. Les résultats seront immédiatement transmis au clinicien. Par ailleurs, au cours des méningites purulentes authentiques, lorsque la ponction lombaire est réalisée précocement, il arrive que l'examen direct soit positif alors que la cytologie est encore normale ou très faible. Il s'agit cependant de cas rares, puisque entre 0 et 0,07% seulement des LCR ayant moins de 10 leucocytes/mm³ présentent à la fois une coloration de Gram et une culture positive. L'examen direct et la mise en culture doivent être systématiques quel que soit le résultat de la cytologie [18].

○ **La coloration de Gram**

Étape essentielle et rapide, la coloration de Gram est réalisée sur une préparation obtenue de préférence par cyto-centrifugation. Elle augmente les performances de l'examen de 100 à 1000 fois. Ces performances dépendent de la densité bactérienne, elle-même variable selon l'espèce en cause, la durée d'évolution de la méningite, l'existence d'une antibiothérapie préalable. On estime entre 60 et 90% le nombre d'examens directs positifs à la coloration de Gram en l'absence de traitement. Ce chiffre passe à 40% voire 60% chez les patients ayant reçu des antibiotiques. Du fait de la plus grande densité bactérienne, le pourcentage d'examens directs positifs à la coloration de Gram serait le plus important pour *S. pneumoniae* et *H. influenzae* et plus faible pour *N. meningitidis* [10].

- **Culture**

Le choix des milieux de culture doit permettre le développement de bactéries exigeantes. Il fautensemencer systématiquement une gélose au sang frais et une gélose au sang cuit enrichi d'un supplément vitaminique, incubée en atmosphère de CO₂ à 5 % pendant 24 à 48 heures. Actuellement, le recours à des inoculations de flacons gérés par des automates d'hémoculture a permis un gain de 24 à 48 heures. La culture permet la réalisation de l'antibiogramme, la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et une éventuelle recherche d'enzyme de résistance (β- lactamase). L'antibiogramme s'effectue par la méthode des disques (méthode de Chabber) [18].

- **Biochimie**

Les paramètres biochimiques couramment recherchés concernent le dosage du glucose et des protéines du LCR. Une glycorachie inférieure à 50% de la glycémie ou inférieure à 0,4g/l, même si elle est normale dans 9% des méningites purulentes, et une protéinorachie comprise entre 1 et 5 g/l sont quasi pathognomoniques d'une méningite purulente [31].

- **Diagnostic immunologique**

Le diagnostic immunologique concerne la recherche d'antigènes solubles. En routine, la technique d'agglutination de particules de latex sensibilisées est la plus utilisée. Elle peut confirmer le diagnostic lorsque le Gram est douteux, mais elle apporte peu en terme de gain diagnostique lorsque le résultat du Gram est négatif [31].

- **Recherche des facteurs V et X**

Haemophilus influenzae de type b exige pour sa culture, des milieux enrichis contenant les facteurs de croissance intervenant dans les enzymes de la chaîne respiratoire, facteurs X (hémine) et V (hémophile ou NAD) présents dans le sang. Cette double exigence permet de distinguer *Haemophilus influenzae* des autres espèces.

2.3.3.2. Techniques de diagnostic moléculaire

Elles permettent une identification des séquences d'acide nucléiques présentent l'avantage d'être applicable même si le germe n'est pas vivant. Elles sont utilisées pour l'identification d'espèces, le groupage et le typage, les séquences-types et clones. Les techniques les plus utilisées actuellement sont :

- La PCR classique et la PCR en temps réel
 - Ont permis d'améliorer considérablement le diagnostic de la bactériologie classiques en routine ;
 - Sont utilisées pour l'identification d'espèce, le groupage et le typage ;
 - Elles sont basées sur les techniques conventionnelles d'amplification par PCR ;
 - Sont disponibles dans les laboratoires nationaux de références.
- Les MLST (multi-locus séquence type) :

- Permettent la détermination de clones épidémiques à travers les séquences-types ;
- sont basées sur l'identification des locus des gènes de ménages appelés « housekeeping genes » ;
- et sont disponibles dans les laboratoires spécialisés de recherche sur les méningites et les centres collaborateurs de l'OMS.

2.3.4. Le traitement [32, 24, 33, 34, 35]

- Antibiothérapie

L'ampicilline ou l'amoxicilline restent le traitement de référence de la méningite cérébro-spinale de l'adulte. En revanche, les céphalosporines de troisième génération sont maintenant recommandées dans le traitement de première intention des méningites du petit enfant. La durée du traitement varie en fonction du germe. Le traitement consiste en l'administration d'une céphalosporine de troisième génération injectable : Cefotaxime (voire Ceftriaxone). [18]

- **Méningite à *Streptococcus pneumoniae***

La posologie utilisée est Cefotaxime à la dose 300 mg/Kg/j en association avec Vancomycine à la posologie de 60 mg/Kg/j pendant les deux premiers jours. Le traitement est ensuite à adapter en fonction des résultats de l'antibiogramme. Si le pneumocoque est de sensibilité normale à la pénicilline, le traitement est poursuivi par céfotaxime à une posologie plus faible de 200 mg/Kg/j. La Vancomycine est arrêtée. Si l'antibiogramme trouve un pneumocoque de sensibilité anormale à la pénicilline, la bi antibiothérapie est poursuivie. L'efficacité du traitement est contrôlée systématiquement par une ponction lombaire dans les 48 heures. [24]

- **Méningite à *Neisseriae meningitidis***

La Cefotaxime (200 mg/Kg/j) ou Ceftriaxone (100 mg/Kg/j) est efficace. La durée du traitement est de 7 jours.

- **Méningite à *Haemophilus influenzae* de type b**

En cas d'infection à *Haemophilus influenzae* de type b ce sont les Céphalosporines de troisième génération qui sont administrées en monothérapie.

- **La prévention**
 - o **Prévention de la transmission : [36]**

La prévention repose sur le changement des facteurs comportementaux et environnementaux.

Préventions de base en cas d'épidémie de méningite

Hygiène

- Se laver souvent les mains.
- Ne pas partager une brosse à dents, aliments, rouges à lèvres, boissons, cigarettes, etc.
- Bien nettoyer les lieux communs, notamment les toilettes avec une préparation de 1 dose d'eau de Javel pour 10 doses d'eau, une fois par jour.

Mode de vie

- Mener une vie saine pour avoir un système immunitaire résistant.

Soigner les infections respiratoires et les otites des jeunes enfants.

La transmission de *Neisseria meningitidis* se fait de personne à personne à partir d'un porteur nasopharyngé le plus souvent que d'un malade. Elle se fait par contact avec des gouttelettes ou des sécrétions orales infectées. La prévalence du portage nasopharyngé est variable et n'est pas corrélée avec le risque d'épidémie.

La contagiosité disparaît rapidement chez les malades traités par antibiotiques. Comme le méningocoque est relativement sensible aux changements de température et à la dessiccation, ce germe n'est pas transmis par l'intermédiaire d'équipements ou de matériels.

- o **Vaccination : [37, 36]**

La prévention par la vaccination est devenue une priorité en raison de la gravité des infections sur un terrain fragilisé et l'augmentation de la résistance du germe aux β -lactamines.

Neisseria meningitidis : Quatre antigènes polysaccharidiques spécifiques sont actuellement disponibles, relevant des sérogroupes A, C, Y et W135 de *Neisseria meningitidis*. Ils sont distribués sous forme lyophilisée, et injectés par voie IM ou SC. Il existe un vaccin bivalent A-C et un vaccin quadrivalent A-C-Y-W135 contenant 50 mg de chaque antigène.

Les vaccins méningocoques qui sont des polysaccharides capsulaires induisent une réponse

immunitaire thymo-indépendante, variable avec l'âge. Chez les adultes et les enfants de plus de 4 ans, une dose unique induit en une dizaine de jours, une ascension rapide des anticorps et une protection dans plus de 80 % des cas. La protection dure au moins un an, souvent plusieurs années. La réponse est plus faible chez les nourrissons et les jeunes enfants. Cependant, le vaccin du sérogroupe A est plus immunogénique que d'autres polysaccharides, il peut induire même chez les nourrissons de 3 mois un taux d'anticorps appréciable. Les vaccins polysaccharidiques méningococciques ne sont pas utilisés en routine au cours de la première enfance à cause de leur efficacité insuffisante à cet âge.

Un vaccin plus récent, le MenAfriVac (vaccin conjugué monovalent) a permis de réduire de façon très significative, les cas de méningite liés à *Neisseria meningitidis* de sérogroupe A. Il procure une immunité contre la maladie pendant dix ans, et est recommandé pour la tranche d'âge de 1 à 29 ans.

***Haemophilus influenzae* de type b** : la généralisation du vaccin contre les infections à *Haemophilus influenzae* de type b a permis de diviser par dix le nombre de méningites bactériennes chez les enfants de moins de cinq ans. Le vaccin anti *Haemophilus influenzae* de type b est souvent associé au vaccin contre la diphtérie, le tétanos, la poliomyélite et la coqueluche et éventuellement l'hépatite B.

- Vaccin diphtérie, tétanos, poliomyélite, coqueluche, infection à *Haemophilus influenzae* de type b sont :
 - Infanrixquinta
 - Pentavac
- Vaccin diphtérie, tétanos, poliomyélite, coqueluche, infection à Hib, hépatite B est :
 - Infanrix Hexa
- Vaccin contre infection à *Haemophilus influenzae* de type b est :
 - ACT-Hib

Le vaccin contre le *Haemophilus influenzae* de type b est recommandé pour tous les nourrissons. Il est habituellement administré en même temps que le vaccin DTP sous forme combinée. Il a été introduit dans le programme élargi de vaccination au Mali en 2005.

DTP : vaccin avec une dose normale d'anatoxine diphtérique.

Streptococcus pneumoniae : C'est le Prevenar 13 qui est recommandé dans le programme élargi de vaccination au Mali depuis juin 2011. C'est un vaccin anti pneumocoque conjugué à

13 valences. Ce dernier contient 13 antigènes correspondant à 13 sérotype fréquemment responsables de méningite.

Il existe un autre vaccin anti pneumococcique, le Pneumo 23 qui est disponible dans les officines de Pharmacie.

Ces vaccins contiennent des polysaccharides possèdent une immunité contre chaque serotype. Ce sont les jeunes adultes en bonne santé qui répondent le mieux à ce type de vaccin. Le vaccin Prevenar, le seul vaccin combiné contre le pneumocoque immunise les jeunes enfants (2 mois à 4 ans) à 90% contre ce type de méningite et permet une faible protection contre l'otite provoquée par le pneumocoque.

Pour les personnes âgées de plus de 65 ans, un vaccin antipneumococcique permet diminuer les risques d'attraper une méningite causée par le *Streptococcus pneumoniae*. Le vaccin est également conseillé pour les personnes qui ont eu une ablation de la rate ou le système immunitaire est affaibli.

○ Chimio prophylaxie

Elle s'applique à l'entourage proche du patient atteint de méningite à *Neisseria meningitidis*. Ce traitement repose sur la Rifampicine. Cet antibiotique est actif sur le *Neisseria meningitidis* et sur *Haemophilus influenzae*.

En cas de méningite à *Neisseria meningitidis* :

- Dose enfant (pendant 2 jours)
 - Enfant <1 mois : 5mg/kg 2 fois par jour ;
 - D' 1 mois à 15 ans : 10mg/kg 2 fois par jour ;

En cas de méningite à *Haemophilus influenzae* de type b:

- Dose enfant (pendant 1 jour) :
 - Enfant <1mois :10mg /kg ;
 - Nourrisson et enfant : 20mg/kg.

En cas de contre-indication, la Spiramycine peut être utilisée [38].

DEUXIÈME PARTIE

1. JUSTIFICATION

Dans le cadre de la surveillance épidémiologique des méningites bactériennes, le laboratoire national de référence (LNR) reçoit des prélèvements de liquide céphalorachidien (LCR) en provenance de tous les districts sanitaires du Mali pour le diagnostic microbiologique.

En raison des limites dans le diagnostic bactériologique (coloration de Gram, agglutination au Latex, culture bactérienne), des cas de méningites se retrouvent négatifs à la bactériologie classique. Des études ont ainsi montré que des traces d'ADN d'agents responsables de méningite bactérienne aiguë (MBA) ont pu être amplifiées dans des LCR négatifs à la bactériologie classique [1] justifiant ainsi la mise en place des technologies de PCR au niveau du LNR pour un diagnostic fiable et pour la surveillance.

Les techniques de la biologie moléculaire sont basées sur l'amplification génique et permettent d'amplifier spécifiquement un fragment d'ADN dans un prélèvement biologique (LCR, sang, liquide articulaire, etc.). Dans le monde, ces techniques ont révolutionné rapidement le diagnostic étiologique en raison de leur grande spécificité et sensibilité.

Dans notre contexte, elles trouvent leur intérêt d'une part dans la rapidité et la fiabilité diagnostique et d'autre part dans les situations où il existe une forte suspicion de méningite avec culture du LCR non contributive.

Les techniques de PCR en temps réel sont en pleine expansion. Elles présentent de nombreux avantages tels que leurs polyvalences, le nombre réduit de maintenance liée à l'appareillage.

La rapidité et la sensibilité de la technique leur confèrent des atouts incontournables face à la technique conventionnelle. Par la PCR en temps réel, la détection et la quantification des produits d'amplification se font en même temps que la réaction de PCR et dans un système fermé. La technique de PCR classique détecte plutôt à la fin de la réaction. L'apport des sondes en PCR temps réel permet une identification fiable des séquences amplifiées [11].

La PCR en temps réel, basée sur le principe de la PCR classique, serait plus sensible et détecterait plus de germes selon des études réalisées [11]. A l'INRSP, deux plateformes de PCR sont disponibles : la PCR en temps réel et la PCR conventionnelle. Le laboratoire de bactériologie – virologie a acquis de l'AMP la plateforme de la PCR conventionnelle dans le cadre du renforcement des capacités de diagnostic et de surveillance microbiologique des méningites. Cette acquisition a permis d'assurer une « surveillance renforcée ». Il a acquis également du CDC –Atlanta branche méningite la plateforme de la PCR en temps réel pour accompagner la « surveillance cas par cas de la méningite » après l'introduction du vaccin conjugué anti-méningocoque A (MenAfriVac®).

2. OBJECTIFS

2.1. Objectif général :

- Faire une analyse comparative entre la PCR classique et la PCR en temps réel dans le diagnostic des germes responsables de méningites bactériennes aiguës.

2.2. Objectifs spécifiques :

- Décrire les caractéristiques des LCR (qualité, aspect macroscopique) et leur conditions d'acheminement ;
- Identifier les bactéries responsables de méningites bactériennes aiguës dans le cadre de la surveillance épidémiologique par la bactériologie classique, la PCR en temps réel et la PCR classique ;
- Comparer les résultats de la PCR classique et de la PCR en temps réel à la bactériologie conventionnelle ;
- Comparer le résultat final rendu de la PCR classique à celui de la PCR en temps réel.

3. METHODOLOGIE

3.1. Cadre et Lieu de l'étude

Notre étude s'est réalisée au Mali à travers la surveillance épidémiologique des méningites bactériennes. La collecte a eu lieu dans les districts sanitaires (**voir figure 9 et tableau XII**) et les tests des PCR ont été réalisés au laboratoire de bactériologie-virologie de l'Institut National de Recherche en Santé publique (INRSP) de Bamako.

3.1.1. Description de la surveillance épidémiologique

La surveillance épidémiologique a pour but principal d'alerter à temps opportun les autorités sanitaires nationales de la survenue d'une épidémie et de leur fournir les informations nécessaires afin de prendre les mesures d'urgence nécessaires. À plus long terme, les investigations épidémiologiques devraient permettre d'anticiper les risques d'épidémies et prévoir leur diffusion.

La mise en place d'un réseau de laboratoires pour le diagnostic étiologique des méningites bactériennes dans tous les différents districts sanitaires et aires de santé (**figure 9**) a permis d'élargir la base de la surveillance dans notre pays.

La direction nationale de la santé, l'Organisation mondiale de la Santé et le CDC, branche méningite sont les structures partenaires pour la surveillance de la méningite.

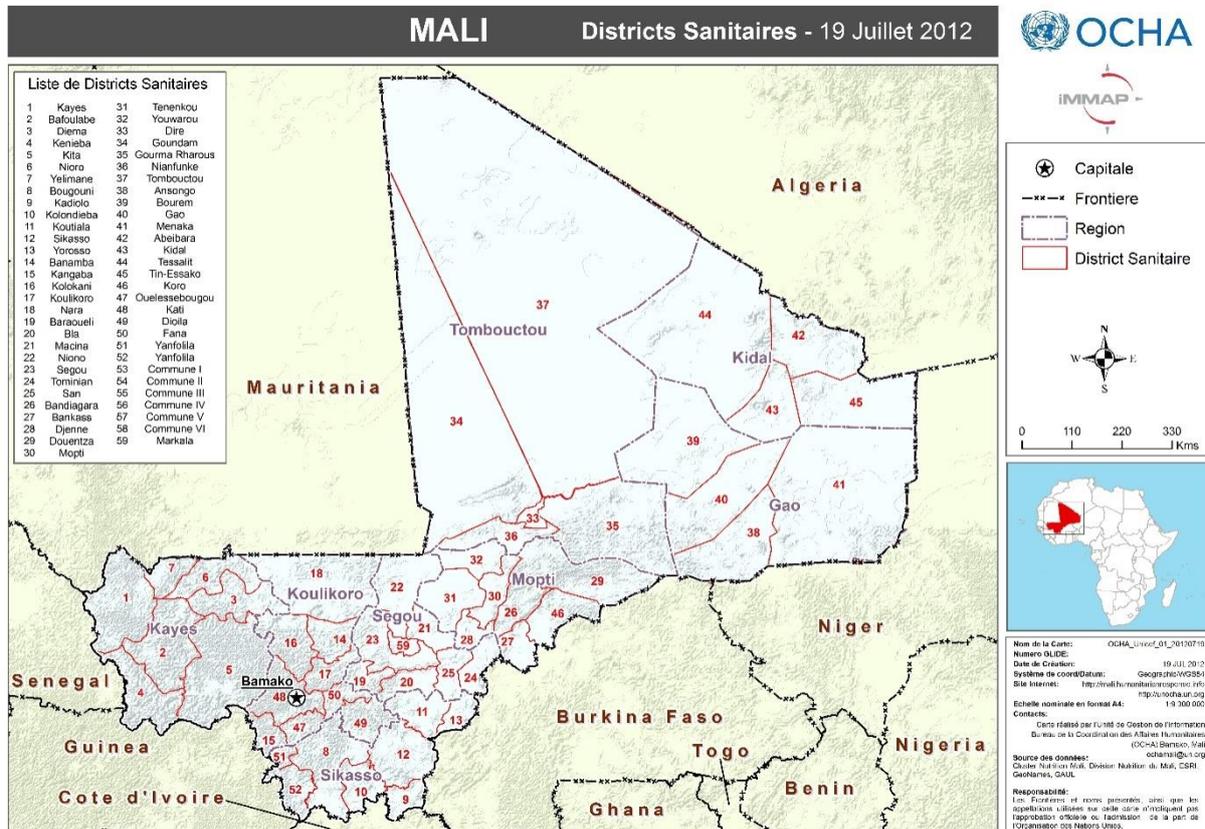


Figure 9 : Cartographie des districts sanitaires du Mali (mise à jour du 19/07/2012) [43]

3.1.2. Description de l'INRSP

Créé par la loi N° 81-17/AN-RM du 31 mars 1981, et érigé en Établissement Public à caractère Administratif (EPA) par la loi N° 93-014 du 11 février 1993, l'INRSP est passé de ce statut à celui d'Établissement Public à caractère Scientifique et Technologique (EPST) par l'ordonnance N° 06-007/P- RM du 28 Février 2006.

Ses missions se résument comme suit :

- Promouvoir la recherche médicale et pharmaceutique en santé publique, notamment dans les domaines des maladies infectieuses, néoplasiques et sociales, de la santé familiale, de l'éducation sanitaire, de l'hygiène du milieu, de la biologie clinique appliquée à la nutrition et aux affections endémo-épidémiques, de la toxicologie

médicale et expérimentale, de la bromatologie, de la génétique, de la socio économie, de la médecine et pharmacopée traditionnelle ;

- Participer à la formation technique, au perfectionnement et à la spécialisation dans le domaine de sa compétence ;
- Assurer la référence dans le domaine de la biologie clinique ;
- Assurer la mise au point et la formulation des médicaments traditionnels améliorés ;
- assurer la protection du patrimoine scientifique relevant de son domaine ;
- Promouvoir la coopération nationale et internationale dans le cadre des programmes et d'accords d'assistance mutuelle ;
- Gérer les structures de recherche qui lui sont confiées.

L'INRSP comprend cinq départements et une agence comptable qui sont :

- Département Santé Communautaire (DSC) ;
- Département Médecine Traditionnelle (DMT) ;
- Département Formation (DF) ;
- Département Administration et Personnel (DAP) ;
- Département de Diagnostic et de Recherche Biomédicale (DDRBR).

Le Département de Diagnostic et de Recherche Biomédicale (DDRBR) se compose de laboratoires de :

- Sérologie-Immunologie ;
- **Bactériologie-virologie ;**
- Hématologie biologie ;
- Biochimie clinique ;
- Parasitologie ;
- Cytogénétique.

En outre, l'institut dispose des centres de formation en zone rurale qui sont :

- le centre de Sélingué ;
- le centre de Kolokani ;
- le Centre Régional de Médecine traditionnelle de Bandiagara (CRMT).

3.1.2.1. Description du service de Bactériologie

Le service de bactériologie-virologie relève du Département de diagnostic et recherche biomédicale. Il a servi de cadre de travail à notre étude. Il comprend :

- Une section de bactériologie générale où sont réalisées les analyses sur les prélèvements de frottis vaginal, de pus (liquide d'ascite, prélèvement urétral, liquide d'épanchement etc.), d'urines, de sang (hémoculture), de coprocultures et les des prélèvements pathologiques divers ;
- Le laboratoire de référence pour la tuberculose ;
- Une section de stérilisation et de préparation des matériels de travail (milieux de culture, eau distillée, etc.).
- Un laboratoire de référence pour la méningite doté d'équipements permettant l'identification des espèces bactériennes responsables de la méningite ;
- Un Laboratoire de PCR pour la détermination de la charge virale du VIH et le diagnostic précoce du VIH chez le nouveau-né de mère séropositive.

Par ailleurs, l'INRSP entretient des relations étroites avec des laboratoires africains et occidentaux. Il reçoit souvent de ces laboratoires, dans le cadre du partenariat, des échantillons pour analyse (étude de confirmation ou d'identification). Il arrive que pour les mêmes raisons, l'INRSP aussi adresse à ces laboratoires des échantillons de produits pathologiques. De même, plusieurs laboratoires de l'INRSP sont inclus dans des réseaux de contrôle de qualité. Les partenaires de l'INRSP dans le cadre de la méningite sont : CQNICD ; Centre de Recherche pluri pathologique de Ouagadougou, CDC Atlanta branche méningite ; le centre collaborateur de l'OMS pour la méningite à Oslo (Norvège) ; Unité Bactériologie l'hôpital Charles de Gaulle de Ouagadougou.

3.2. Type et période de l'étude :

Il s'agit d'une étude transversale comparative de la PCR classique et de la PCR en temps réel dans le diagnostic des méningites bactériennes aiguës réalisée du 1^{er} janvier 2012 au 31 juin 2012.

3.3. Matériels de l'étude

3.3.1. L'échantillon utilisé

Le liquide céphalo- rachidien (LCR) est le spécimen d'échantillon utilisé dans notre étude.

3.3.2. Patients

Les patients de notre étude sont constitués de cas suspects de méningite chez qui les LCR ont été ponctionnés.

3.3.2.1. Définition des cas

- **Cas suspect :**

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, nuque molle, bombement de la fontanelle, convulsions ou autres signes méningés. [39].

- **Cas probable :**

Tout cas suspect chez qui la ponction lombaire ramène un LCR d'aspect macroscopique louche, trouble, purulent, xanthochromique ou la présence de diplocoque Gram négatif, diplocoque Gram positif, bacille Gram négatif à l'examen microscopique, ou si le compte de leucocytes est supérieur à 10 cellules/mm^3 [39].

- **Cas confirmé :**

Tout cas suspect ou probable chez qui l'agent causal (*Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* de type b) a été mis en évidence à partir du LCR soit par de test d'agglutination, soit par la culture ou par la PCR [39].

3.3.2.2. Critères d'inclusion et de non inclusion

3.3.2.2.1. Critères d'inclusion

Sont inclus dans notre étude :

- Tous les cas suspects de méningite ayant bénéficié d'un prélèvement de LCR envoyé à l'INRSP pour la confirmation pendant la période d'étude dans le cadre de la surveillance de routine.
- Pour lesquels les résultats de la Bactériologie classique, de la PCR classique et ceux de la PCR en temps réel sont disponibles.

3.3.2.2. Critères de non inclusion

- Les échantillons de LCR non identifiés ;
- Les échantillons de LCR de quantité insuffisante pour les deux PCR.

3.3.2.3. Échantillonnage

Il s'agit d'un échantillonnage simple basé sur le recrutement systématique des cas suspects de méningite adressés dans le cadre de la surveillance épidémiologique.

3.3.2.4. Taille de l'échantillon

Elle concerne l'ensemble des 217 cas suspects de méningite définis cliniquement et prélevés du 1^{er} janvier 2012 au 31 juin 2012.

3.3.3. Matériels de ponction

Le matériel nécessaire pour la ponction lombaire comprend :

- Désinfectant cutané ;
- Compresse et pansement adhésif ;
- Aiguille à ponction lombaire pour adultes et pour enfant ;
- Seringue et aiguille ;
- Tube à hémolyse stérile avec capuchon pour recueillir le LCR.

3.3.4. Matériel de conservation et de transport du LCR

Deux types de matériels ont été utilisés pour la conservation et le transport.

Le milieu Trans –Isolate est un milieu diphasique qui permet la culture primaire de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* à partir de prélèvement du liquide céphalorachidien (LCR). Il peut être utilisé comme milieu de culture, de conservation et de transport. Le volume total de la phase solide et de la phase liquide est environ égale à la moitié du volume du flacon quel que soit le flacon. Il compose comme suit : Charbon actif (2g), amidon soluble (3g), gélatine (8g), agar (2g) et bouillon de soja (12g), de tampon 0,1M MOPS 3- (N- morpholino) acide propane-sulfonique et de IsoVitalax ou Vitox. Le tube à hémolyse stérile encore appelé tube sec avec fermeture hermétique est utilisé pour recueillir le LCR à transporter au laboratoire national de référence des méningites.

3.3.5. Matériels, réactifs, consommables et milieux de culture de la bactériologie classique

- Matériels

- Hotte stérile ;
- Étuve pour l'incubation des cultures ;
- Réfrigérateur pour la conservation des consommables ;
- Microscope ;
- Centrifugeuse ;
- Bain marie ;
- Tube à hémolyse ;
- Trans-Isolate (T-I) ;
- Boite de pétri ;
- Anses à usage unique ;
- Seringue de 5ml pour ensemencement ;
- Cellule de Malassez ;
- Lames porte objet ;
- Gants stériles.

- Réactifs et consommables

- PastorexTM meningitis ;

Le PastorexTM Meningitis est un kit complet pour 25 tests. Il est composé de :

- cartes d'agglutination jetable ;
- bâtonnets mélangeurs jetables ;
- réactif 1 (R1) : *N. meningitidis* B/*E.coli* K1 latex ;
- réactif 2 (R2) : *N. meningitidis* B/*E.coli* K1 negative control ;
- réactif 3 (R3) : *H. influenzae* de type b ;
- réactif 4 (R4) : *S. pneumoniae* ;
- réactif 5 (R5) : Streptococcus B ;
- réactif 6 (R6) : *N. meningitidis* A ;
- réactif 7 (R7) : *N. meningitidis* C ;
- réactif 8 (R8) : *N. meningitidis* Y/W135 ;
- réactif 9 (R9) : Contrôle polyvalent négatif ;
- réactif 10 (R10) : Contrôle polyvalent positif ;

- réactif 11 (R11) : Diluent.
- Les sérums anti-méningocoques :
 - Sérums anti-méningocoque A ;
 - Sérums anti-méningocoque B ;
 - Sérums anti-méningocoque C ;
 - Sérums anti-méningocoque W135.
- Les milieux de culture et autres éléments associés :
 - Gélose au sang cuit enrichi au polyViteX[®] ;
 - Gélose au sang frais.
 - Le réactif du test à l'oxydase ;
 - Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 3% pour le test à la catalase ;
 - Le disque du test à l'optochine ;
 - Les disques des facteurs V et X.

3.3.6. Matériels, équipements, consommables et réactifs des techniques de PCR

3.3.6.1. Matériels et consommables

- Hotte de biosécurité avec lumière UV ;
- Microtubes 2ml, 1,5ml, 0,5ml ;
- Micropipettes P2, P20, P100, P200 et P1000 ;
- Cône à filtre 0,1µl -2,5µl, 0,5µl-10µl, 2µl-20µl , 20µl-200µl ,100µl-1000µl ;
- Portoirs ;
- Congélateur ;
- Vortex ;
- Blouse et gant ;
- Désinfectant spray ;
- Poubelle ;
- Minuteur chrono-rebours ;
- Plaque chauffante ;
- Four micro-onde ;
- Masque de protection anti UV ;
- Microtube PCR de 1,5ml

3.3.6.2. Équipements

3.3.6.2.1. Equipements de la PCR classique

- **Thermocycleur**

Il s'agit d'un équipement utilisé pour les variations de températures permettant la réalisation des cycles d'amplification. Les formes manuelles (**figure 10**) sont utilisées pour la PCR classique. Dans la PCR en temps réel, les thermocycleurs sont incorporés dans les automates.



Figure 10: Thermocycleur avec couvercle chauffant

- **Transluminateur**

Cet équipement utilisé pour la révélation des amplicons ayant préalablement fait l'objet de migration électrophorétique sur gel d'agarose. Il est muni d'une lampe UV, d'un appareil photo connecté à un ordinateur et une imprimante, d'un support de dépôt de gel (**figure 11**).



Figure 11 : Appareil utilisé pour visualiser la taille des amorces

- **Appareil d'électrophorèse**

C'est un appareil permettant la migration électrophorétique des amplicons. Il est muni d'un bac de migration servant de support de gel. Cet appareil est accompagné d'un générateur de courant électrique connecté au bac de migration à travers deux électrodes, l'une la cathode et l'autre l'anode (**figure 12**).



Figure 12: Bac de migration électro phorétique sur gel d'agarose

3.3.6.2.2. Equipement de la PCR en temps réel

- **Le Stratagène Mx 3005P**

L'instrument Stratagène® Mx3005P™ (Agilent technologies, La Jolla, California) est un système fermé d'amplification et de détection en temps réel (**figure 13a**). Sa source d'excitation est une lampe halogène tungstène-quartz et la détection se fait par photomultiplicateur PMT. Elle comporte cinq filtres de longueurs d'ondes différentes variant de 350 à 700nm et un block chauffant de 25 à 99°C à support de plaque de 96 puits (**figure13b**).

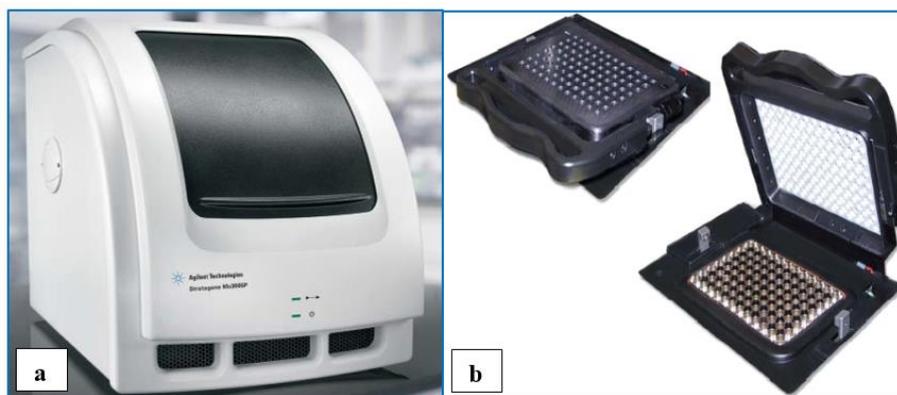


Figure 13 : a) Stratagene® Mx3005P™ et b) bloc à support de plaque

3.3.6.3.Réactifs

3.3.6.3.1. Réactifs utilisés à la PCR classique :

- Amplification
 - Taq polymerase (5µl Invitrogen[®])
 - DNTP 100mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) Invitrogen[®]
 - DMSO 2% (NH₄)₂SO₄
 - MgCl₂ 50mM
 - Eau stérile qualité biologie moléculaire VW Eppendorf
 - Amorces (**voir tableau I**)
- Detection
 - Bromure d'éthidium (BET) 0,7 mg/ml
 - Tris borate EDTA 1(X) Tampon de migration Invitrogen[®]
 - Agarose Invitrogen[®]
 - Tampon de charge (pH8) 10X
 - Eau stérile qualité biologie moléculaire VW Eppendorf[®]

Tableau I : Amorces de la PCR classique

Nom	Séquence	Espèce Sérogroupe Sérotype	Gène	Taille en paire de base (pb)
98-6	5'-gctggcgccgctggcaacaaaattc-3'	<i>N.meningitidis</i>	crgA	230
98-10	5'-cttctgcagattgcggcgtgccgt-3'			
98-28	5'-cgcaataggtgtatatattctcc-3'	Nm A	mynB	400
98-29	5'-cgtaatagtttcgtttccacca-3'			
98-19	5'-ggatcattcagtgtttccacca-3'	Nm B	siaD	450
98-20	5'-gcatgctggaggaataagcattaa-3'			
98-17	5'-tcaaatgagtttgcaatagaaggt-3'	Nm C	siaD	250
98-18	5'-caatcacgattgccaattgac-3'			
98-30	5'-ggtgaatctccgagcagga-3'	<i>Nm Y/W135</i>	siaD	350
98-31	5'-aaagctgcgcggaagaatagtg-3'			
98-32	5'-cagaaagtgagggattccata-3'	NmW135	siaD	120
98-33	5'-cacaaccatttcattatagttactgt-3'			
98-34	5'-ctcaaagcgaaggcttggtta-3'	Nm Y	siaD	120
98-35	5'-ctgaagcgtttcattataattgctaa-3'			
99-10	5'-aagaacagattgcctcaagtcggc-3'	<i>S. pneumoniae</i>	lytA	390
99-11	5'-ttggttattcgtgcaatactcgtgcg-3'			
H11	5'-gtcgtttgatgatgtgaccagactac-3'	<i>H. influenzae</i>	bexA	355
H12	5'-gctttgtccatgtcttcaaatgtgcat-3'			
b 1	5'-gcgaaagtgaactcttattctc-3'	Hi sérotype	cap	480
b 2	5'-gcttacgcttctatctcgggtgat-3'			
X-10	5'-acagccataaaacaccggtatcatc-3'	Nm X	xcbA	202
X-11	5'-gtgattggaatcttgcaatatcgg-3'			

3.3.6.3.2. Réactifs utilisé en PCR en temps réel :

Réactifs d'extraction

- Mutanolysine (4000UI/ml) sous forme de lyophilisat conservé à – 20°C
- Lysozyme (0,004g/l) : conservé à – 20°C
- TE Buffer (à 100mM- Tris, 1mM EDTA)
- Kit Qiagen® : composé d’Ethanol, de tampon à différentes concentrations (Buffer AL, Buffer Aw1, Buffer Aw2, Buffer AE), de proteinase K.

Réactifs d'amplification et de détection

- TaqMan® Universal PCR Master Mix (www.appliedbiosystems.com, productnumber 4304437) : C’est le mélange contenant les dNTPs (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), le cofacteur MgCl₂, l’ADN polymérase (Taq polymérase) et le tampon.
- Les amorces : ce sont des oligonucléotides complémentaires des régions connues des gènes d’intérêt. Nous avons utilisé des amorces sens (ou forward F) pour les brins sens et les amorces anti-sens (ou reverse R) pour les brins anti-sens spécifiques des chaque gène (**Tableau II**).
- Les sondes ou probe Pb: ce sont des sondes de la chimie TaqMan avec fluorophore (donneur de signal) et quencher (accepteur de signal), n’émettant de fluorescence que lorsque le donneur et l’accepteur sont distants. Elles s’hybrident aux régions complémentaires sur le brin d’ADN, et sont hydrolysées par l’activité 5’exonucléasique de la Taq polymérase s’il y a élongation. Nous avons utilisé des sondes spécifiques de chaque gène à amplifier (**Tableau II**)
- L’eau de qualité PCR (www.roche-applied-science.com, référence 03315843001)
- Qanta® : c’est un mélange de concentration deux supérieure aux autres, contenant des NTPs, le cofacteur MgCl₂, la Taq polymérase et un tampon. Il est utilisé dans les cas d’identification non concluante.

Tableau II: listes des amorces et sondes spécifiques des gènes à amplifier de la PCR en temps réel

Gènes	Espèces/Groupes/types	Amorces et sondes	Séquences (5'→3')
sodC	<i>N. meningitidis</i>	F : 351 R : 478 Pb : 387	GCACACTTAGGTGATTTACCTGCAT CCACCCGTGTGGATCATAATAGA CATGATGGCACAGCAACAAATCCTGTTT
SacB	<i>N. meningitidis</i> A	F : 2531 R : 2624 Pb : 2591i	AAAATTCAATGGGTATATCACGAAGA ATATGGTGCAAGCTGGTTTCAATAG CTAAAAG"T"AGGAAGGGCACTTTGTGGCATAAT
SynD	<i>N. meningitidis</i> B	F : 737 R : 882 Pb : 839i	GCTACCCCATTTTCAGATGATTTGT ACCAGCCGAGGGTTTATTTCTAC AAGAGATGGGYAACAAC"T"ATGTAATGTCTTTATTT
SynE	<i>N. meningitidis</i> C	F : 478 R : 551 Pb : 495i	CCCTGAGTATGCGAAAAAATT TGCTAATCCCGCCTGAATG TTTCAATGC"T" AATGAATACCACCGTTTTTTTTGC
SynF	<i>N. meningitidis</i> Y	F : 787 R : 929 Pb : 1099i	TCCGAGCAGGAAATTTATGAGAATAC TTGCTAAAATCATTCGCTCCATAT TATGGTG"T"ACGATATCCCTATCCTTGCCTATAAT
synG	<i>N. meningitidis</i> W135	F : 857 R : 964 Pb : 907i	TATTTATGGAAGGCATGGTGTATG TTGCCATTCCAGAAATATCACC AAATATGGAGCGAATGATTACAGTAACTATAATGAA
xcbB	<i>N. meningitidis</i> X	F : 173 R : 237 Pb : 196	TGTCCCAACCGTTTATTGG TGCTGCTATCATAGCCGCC TGTTTGCCACATGAATGGCGG
Hpd	<i>H. influenzae</i>	F : 822 R : 952 Pb : 896i	GGTTAAATATGCCGATGGTGTG TGCATCTTACGCACGGTGTA TTGTGTACTACTCCGT"T"GGTAAAAGA AACTTGCAC
BcsB	<i>H. influenzae</i> type b	F : 192 R : 359 Pb : 244i	TGA TGC ATT GAA AGA AGG TGT AAT TT CCT GCG GTA ATA ACA TGA TCA TAA A TGT CGT GCA G"T" A GCA AAC CGT AAC CTT ACT C
LytA	<i>S. pneumoniae</i>	F : 373 R : 424 Pb : 400i	ACGCAATCTAGCAGATGAAGCA TCGTGCGTTTTAATTCAGCT TGCCGAAAACGC"T"TGATACAGGGAG

F : amorce sens (Forward)

R : amorce anti-sens (Reverse)

Pb : sonde spécifique (Probe)

3.4. Méthodes de l'étude

3.4.1. Méthode de conservation et de transport du LCR

Les LCR qui provenaient des différentes structures de santé du district de Bamako étaient contenus dans des tubes secs stériles et acheminés par un agent de santé ou par un parent du malade immédiatement après prélèvement, à la température ambiante. Ceux provenant des différentes régions et des cercles du Mali étaient transportés en tube sec et sur milieu T-I non réfrigéré après inoculation. Nous avons apprécié la qualité des LCR reçus en fonction des critères énumérés dans le **tableau III**.

Tableau III : critères d'appréciation de la qualité des LCR en fonction du matériel de transport et le délai d'acheminement

CONSOMMABLES UTILISES	QUALITES
Flacon de T.I inoculé avec le LCR	<i>Transporté dans une caisse isotherme à température ambiante, sans aiguille d'aération</i>
	<i>Etiqueté avec le nom du patient, nom de la formation sanitaire, date et heure de prélèvement</i>
	<i>Phase solide non rétractée</i>
	<i>Bouchon bien placé, couvercle en aluminium bien serti et opercule soulevé ou enlevé</i>
	<i>Transmis au laboratoire de l'INRSP dans un délai maximum de 7 jours</i>
Cryotube contenant le LCR	<i>Transporté dans un porte vaccin avec accumulateurs de froid congelés</i>
	<i>Etiqueté avec le nom du malade et de la formation sanitaire</i>
	<i>Bien fermé avec un volume de LCR d'environ 0,5 à 1 ml</i>
	<i>Transmis au laboratoire de l'INRSP dans un délai maximum de 7 jours</i>
Tube sec contenant le LCR	<i>Transporté dans une caisse isotherme à la température ambiante</i>
	<i>Etiqueté avec le nom du patient, nom de la formation sanitaire, date et heure de prélèvement</i>
	<i>Bien fermé avec un volume de LCR d'environ 2 à 3 ml</i>
	<i>Transmis au laboratoire de l'INRSP dans un délai de moins 1 heure</i>

3.4.2. Méthodes de diagnostic

3.4.2.1. Méthodes de diagnostic de bactériologie classique

- Aspect macroscopique [40]

L'aspect macroscopique du LCR est apprécié à l'œil nu. Le LCR peut être :

- Normal : dans ce cas, il est limpide et incolore comme l'eau de roche ;

- Hématique : dans ce cas, il est rouge dû à la présence des globules rouges ;
- Hémorragique : dû à une hémorragie méningée ou à une ponction traumatique ;
- Xanthochromique : à la suite de compression médullaire ou d'hémorragie méningée ancienne ;
- Trouble : dû à une hyperleucocytose. Ici, il peut varier de l'aspect moins trouble, de l'aspect opalescent, à l'aspect franchement purulent.

- Cytologie [40]

Elle consiste dans un premier temps à dénombrer par millimètre cube (mm^3) le nombre de cellule dans LCR homogénéisé, les hématies et les leucocytes à l'aide de la cellule de Malassez. Nous avons utilisé le mode opératoire suivant :

- Humidifier la surface des deux plateaux de la cellule de Malassez ;
- Déposer, en exerçant une pression ferme avec les doigts, une lamelle spéciale optiquement plane ;
- Remuer le LCR non centrifugé pour mettre en suspension les éléments cellulaires ;
- Prélever 10 μl à la pipette Pasteur et remplir la cellule ;
- Laisser au repos quelques minutes, pour que les éléments se sédimentent ;
- La préparation est ensuite placée sur la platine du microscope et on examine à l'objectif x 40.

Lorsque les éléments cellulaires sont nombreux, le décompte se fait sur quelques bandes puis la moyenne est faite des leucocytes et des hématies. Cette moyenne est multipliée par 10 pour avoir le nombre de leucocytes et des hématies par mm^3 .

Lorsqu' il y a peu d'éléments, le décompte est fait sur toute la cellule et le chiffre obtenu est rendu comme tel en nombre par mm^3 .

- Coloration de Gram [40]

Elle consiste à réaliser des frottis du culot de centrifugation sur lame neuve dégraissée.

Nous avons observé au microscope à l'objectif x 100 à immersion les frottis colorés au Gram, afin d'apprécier la morphologie des germes. *Neisseria meningitidis* se présente sous forme de diplocoque à Gram négatif en grains de café intra ou extracellulaire. *Streptococcus*

pneumoniae se présente comme des diplocoques à Gram positif lancéolés parfois associés en courtes chaînettes. *Haemophilus influenzae* se présente sous forme de petits bacilles ou des coccobacilles à Gram négatif polymorphes.

- Recherche d'antigènes solubles [41]

Nous avons utilisé le PastorexTM Meningitis (BioRad) qui permet un diagnostic précoce des principaux germes responsables de la majorité des méningites purulentes. PastorexTM Meningitis (BioRad) permet de mettre en évidence NmA, NmB, NmC, NmY/W135, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* de type b, *Streptococcus B* et *E. coli* K1.

Principe de PastorexTM Meningitis (BioRad) : l'antigène présent dans l'échantillon testé est identifié à l'aide de particules de latex recouvertes d'anticorps spécifiques. Ces particules s'agglutinent fortement en présence de l'antigène homologue alors qu'elles restent en suspension homogène en l'absence de celui-ci.

Nous avons utilisé le mode opératoire suivant :

- Si un LCR est très trouble ou présente une contamination par des globules rouges, le centrifuger durant 5 minutes à 2000 tours/mn et recueillir le surnageant ;
- Chauffer les échantillons pendant 3 minutes à 100°C (incubateur sec ou bain-marie) puis centrifuger ;
- Déposer une goutte (40 à 50 µl) de surnageant de LCR et des témoins dans les cercles correspondant de la carte jetable ;
- Bien homogénéiser les réactifs du kit préalablement à la température ambiante ;
- Déposer une goutte de chaque réactif latex dans chaque cercle de la carte jetable (maintenir le flacon en position verticale) ;
- Mélanger les gouttes de latex et l'échantillon au moyen d'un bâtonnet en changeant de bâtonnet pour chaque cercle ;
- Laisser en mouvement de rotation sur agitateur de Klein à 120 rpm pendant 10 minutes ;
- Lire et interpréter dans les 10 minutes après agitation.

La lecture et l'interprétation ont été faites à l'œil nu et sous un bon éclairage comme suit :

- Réaction négative : la suspension reste homogène et légèrement opalescente (absence d'agrégats) ;
- Réaction positive : apparition d'une agglutination franche (ou d'une agrégation) des particules de latex ;
- NB : l'intensité d'agglutination et le temps d'apparition sont fonction de la concentration en antigènes de l'échantillon testé.

- **Culture**

La culture est réalisée systématiquement. Une gélose au sang cuit enrichi au polyVitex® et une gélose au sang frais sont ensemencées pour chaque échantillon de LCR. Les milieux ensemencés sont incubés à 37°C dans une étuve pendant 18-24 heures sous une atmosphère de CO₂ à 5%.

- **Étude de l'exigence en facteurs X et V des *Haemophilus***

C'est un test simple pour l'identification de l'espèce commune des *Haemophilus*. Il permet de déterminer leurs exigences pour les facteurs X (**Hémine**) et V (**NAD**). Pour la réalisation de ce test d'exigence, nous avons procédé comme suit :

- Prendre une colonie isolée sur la gélose chocolat et ensemencer toute la surface d'une gélose trypticase de soja (**TSA**) ;
- Placer immédiatement des disques de facteurs X, V et XV distants les uns des autres sur la gélose ;
- Incuber la boîte de gélose dans la jarre en atmosphère CO₂ pendant 18-24h voire 48h ;
- Observer la croissance ou l'absence de croissance autour de chaque disque ;
- *Haemophilus influenzae* de type b donne une croissance autour du disque des facteurs combinés X et V mais pas autour des disques X ou V.

- **L'oxydase [40]**

Le test d'oxydase est un test utilisé comme un indicateur « redox » qui passe d'une teinte incolore (quand il est réduit) à une couleur violet-foncée (quand il est oxydé). En pratique, il consiste à :

- Déposer une goutte de réactif d'oxydase (phénylène-diamine) sur un papier buvard ;

- Écraser sur la goutte une colonie bactérienne prélevée sur une gélose au sang ;
- Interpréter une réaction comme positive, le développement d'une couleur violette dans un intervalle de 10 à 30 secondes.
- Interpréter une réaction comme négative si aucune couleur ne se développe au bout de 30 secondes.

- La catalase [40]

La mise en évidence de la catalase a été faite en mélangeant les colonies bactériennes avec une goutte à 3% de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), sur une lame de verre propre.

Une réaction positive se traduit par la formation de bulles d'oxygène en 10 secondes ; et une réaction négative si aucune formation de bulles ne se produit en 10 secondes.

NB : les globules du sang contenus dans la gélose au sang contiennent de la catalase et peuvent donner une fausse réaction positive.

- Test à l'optochine

Le test à l'optochine est une procédure simple utilisée pour l'identification de *Streptococcus pneumoniae*. Il consiste à :

- Ensemencer en stries serrées une gélose au sang ;
- Placer le disque d'optochine au milieu de la gélose ;
- Après 18-24 heures d'incubation, examiner l'inhibition de la croissance bactérienne autour du disque d'optochine sur la gélose au sang ;
- Une réaction positive se traduit une zone d'inhibition autour du disque d'optochine supérieure ou égale à 14mm ;
- Une réaction négative se traduit une zone d'inhibition autour du disque d'optochine inférieure à 14mm.

- Identification

D'une manière générale, nous procédons à l'identification des germes en nous basant sur l'ensemble des tests réalisés, et variant d'un germe à un autre.

L'identification de *Neisseria meningitidis* tient compte de :

- Observation de l'aspect des colonies apparues ;

- Recherche de l'oxydase ;
- Coloration de Gram d'un frottis réalisé à partir des colonies ;
- Détermination du séro groupe avec les anti-sérums spécifiques.

L'identification de *Streptococcus pneumoniae* se fait selon :

- Observation de l'aspect des colonies apparues ;
- Recherche de la catalase ;
- Coloration de Gram d'un frottis réalisé à partir des colonies ;
- Test à l'optochine ;
- Confirmation au latex sensibilisé.

Les paramètres suivants interviennent pour l'identification d'*Haemophilus influenzae* type b :

- Observation de l'aspect des colonies apparues ;
- Recherche de l'oxydase ;
- Coloration de Gram d'un frottis réalisé à partir des colonies ;
- Exigence en facteurs X et V ;
- Confirmation au latex sensibilisé.

3.4.2.2. Les méthodes de diagnostic par la PCR

3.4.2.2.1. Technique de la PCR classique [42]

Les produits biologiques utilisés sont constitués de LCR frais ou des suspensions de colonies des cultures positives de LCR conservées.

- Préparation de solution de travail et reconstitution de réactifs

Préparation du dNTP (5mM)

La concentration initiale de chaque desoxynucléoside (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) est de 100mM. Pour avoir notre solution de travail à 5mM (pour chaque dNTP) procédons à une dilution au 1/20^{ème} avec les quatre dNTP.

Préparation du Tris Borate EDTA (TBE) 10 X

Pour la préparation d'un litre (1l) de TBE 10x on dissout 108g de tris borate, 55g d'acide borique et 9.3g d'EDTA dans 500ml d'eau distillée contenue dans un Becher de 2 litres. Nous procédons à une homogénéisation par agitation puis complétons à 1l avec de l'eau après avoir ajusté le pH à 7. Ainsi la concentration finale de chaque produit dans le mélange devient 0,9M de Tris, 0,9M d'acide borique, 27,3M d'EDTA.

Technique de préparation de la solution de travail TBE

Le TBE 1X est utilisé pour la préparation du gel d'électrophorèse et comme tampon de migration. La quantité à préparer dépendra du volume de la cuve d'électrophorèse et du nombre d'échantillon à tester par rapport à la préparation du gel. Ainsi pour la préparation d'un volume final d'un litre de TBE 1X, nous mesurons 100 ml de TBE 10X qu'on transvase dans un Becher gradué, et complétons ensuite à 1000 ml avec de l'eau distillée.

Préparation du tampon de charge

Le tampon de charge, appelé aussi bleu de charge, permet de maintenir les amplicons au fond des puits du gel de migration afin d'éviter leur dissolution dans la solution de migration. Il se prépare par mélange des produits suivants : EDTA (0.5M, pH=8), sodium dodecyl sulfate (10%), glycérol bi-distillé 99,5% pur, bleu de bromophénol, NaOH 30% et de l'eau distillée.

Préparation des témoins positifs

L'ADN témoin est préparé à partir de souche de référence cultivé sur boîte de pétri pendant 24h sur gélose chocolat pour *Nisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae* et sur gélose au sang frais pour *Streptococcus pneumoniae*. Les souches de référence peuvent provenir du laboratoire de bactériologie en place ou d'autres laboratoires du réseau avec confirmation par un laboratoire de référence internationale. Il s'agit de prélever avec une anse stérile le maximum de colonies isolées de manière à constituer une suspension dense d'environ 10^6 bactéries d'une culture témoin ; ajouter 0,5ml d'eau congeler à -20°C et décongeler. Porter la suspension à ébullition pendant 5 minutes à 100°C ; ensuite centrifuger à 12000 tours/mn, prendre le surnageant et le diluer 100 fois dans de l'eau pur stérile. Pour chaque réaction on peut utiliser environ 1 μl .

NB : après extraction de l'ADN il est nécessaire de faire plusieurs aliquotes de 40 μl et les conserver à -20°C pour les utiliser au fur et à mesure. Pour toute série de réaction PCR, prévoir un tube témoin négatif (sans ADN) et un tube témoin positif (Mix travail +1 μl ADN positif).

- **Extraction de l'ADN bactérien à ponction du LCR**

Le processus que nous avons utilisé pour l'extraction est celui du choc thermique suivi d'une centrifugation à grande vitesse.

- Transférer 1,5ml de LCR dans un tube Eppendorf de 2ml ;
- Congeler les échantillons de LCR à -20°C ;
- Les classer sur un portoir flottant et porter à ébullition (100°C) pendant 5mn ;
- Centrifuger à 12000 tours/mn pendant 10mn ;
- Recueillir aussitôt le surnageant dans de nouveaux tubes Eppendorf de 2ml avec une numérotation correspondante ;
- Les échantillons ainsi obtenus peuvent être testés immédiatement ou conservés à -20°C dans un congélateur pendant un mois.

- **Amplification**

Préparation du Mix

Il est préparé à chaque lancement de PCR et utilisé aussitôt. Le volume à préparer est fonction du nombre d'échantillons à tester, les témoins positifs et négatifs inclus. Le volume à préparer étant trop juste, il faut rajouter un volume supplémentaire pour 2 à 3 tubes afin de compenser les éventuelles pertes de pipetage. Les réactifs nécessaires pour la préparation du Mix d'une PCR multiplex espèce sont décrits en **3.3.6.3.1.** et les volumes en **Tableau IV.**

Après préparation du Mix, il est bien agité au vortex et utilisé immédiatement ou conservé à -20°C au congélateur pendant une durée d'un mois.

NB : il est conseillé de mettre toujours la Taq polymérase en dernière position et dans la solution à utiliser dans l'immédiat.

Addition d'extrait de LCR, des témoins positifs et négatifs au Mix

Pour chaque tube, nous ajoutons 10µl de chaque échantillon à 40µl du Mix soit un volume total de 50µl.

Par série et par type de réaction PCR, nous ajoutons 10µl d'eau distillée pour le témoin négatif et 10µl d'ADN pour le témoin positif à 40µl du Mix. L'ADN témoin positif selon la

réaction est composé de :

- Pour la PCR multiplex espèce et dans le même tube, d'ADN de méningocoque, d'ADN de pneumocoque et d'ADN d'*Haemophilus* ;
- Pour la PCR séro groupe de *Neisseria meningitidis*, et dans le même tube d'ADN Nm (A, X, W135) ou l'ADN Nm (B, C, Y) ;
- pour la PCR sérotype Hib, d'ADN Hib seulement au Mix.

Tableau IV : Réactifs et leurs volumes nécessaires pour une PCR multiplex espèce

Mix 1x µl			
Réactifs		Volume en µl /échantillon	Volume en µl pour n échantillons
H ₂ O pour la PCR		23,80	23,80 x n
Buffer10X		5	5 x n
Mgcl ₂ 50Mm		5	5 x n
dNTP 5Mm		4	4 x n
DMSO		1	1x n
Nm	<i>crgA</i> 98-6	0,15	0,15 x n
	<i>crgA</i> 98-10	0,15	0,15 x n
Sp	<i>lytA</i> 99-10	0,15	0,15 x n
	<i>lytA</i> 99-11	0,15	0,15 x n
Hi	<i>bexA</i> H11	0,15	0,15 x n
	<i>bexA</i> H12	0,15	0,15 x n
Taq 5u/ul	-	0,30	0,3 x n

Amplification

Il s'agit d'amplifier l'ADN bactérien extrait du LCR et de la souche bactérienne (témoin) dans un thermocycleur (**voir figure 9 sections 3.3.6.2.**) suivant un programme bien défini dans la salle d'amplification. Il est très important de vérifier que les micro-tubes PCR sont bien fermés pour éviter une contamination du thermocycleur par risque d'évaporation des

amplicons. Il faut vortexer et centrifuger à vitesse modérée avant de placer les micro-tubes dans l'appareil. L'amplification se fait grâce aux variations de température programmées dans

le thermocycleur. Ces variations correspondent à une phase de dénaturation, une phase d'hybridation et une phase d'élongation (**voir cycle aux tableaux VI et VII** et température d'hybridation au **tableau V**). Ces trois phases constituent un cycle et pour nos séries, 35 cycles sont nécessaires pour la réalisation de la PCR pendant 2 heures à l'issue desquelles suit l'étape de révélation.

NB :

Sortir les microtubes du thermocycleur, laisser refroidir et centrifuger pendant dix (10) secondes pour faire tomber les microgouttelettes de condensation (aérosols). Ceci évite la diffusion dans l'air des amplicons, responsables de contaminations.

Les amplicons ne doivent en aucun cas retournés dans les autres salles PCR. [48]

Tableau V : Température d'hybridation des amorces de la PCR classique

Agent pathogène	Gène cible	Température d'hybridation
<i>Neisseria meningitidis</i> (espèce)	<i>crgA</i>	58°C
<i>Neisseria meningitidis</i> (séro groupe)	<i>mynB</i> <i>siaD</i> <i>Xcba</i>	58°C
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>lytA</i>	58°C
<i>Haemophilus influenzae</i> (espèce)	<i>bexA</i>	58°C
<i>Haemophilus influenzae</i> sérotype b	<i>cap</i>	51°C

Tableau VI: cycle thermique PCR multiplex ou simplex de confirmation de l'espèce

Phase de dénaturation initiale	Cycle d'amplification	Phase d'extension finale
94°C, 3mn, 1 cycle	40s à 92°C (dénaturation) 30s à 58°C (hybridation) 30s à 72°C (élongation) } 35cycles	72°C, 10mn, 1 cycle

Tableau VII : cycle thermique PCR multiplex ou simplex de sérotype de *Neisseria meningitidis* ou sérotype de *Haemophilus influenzae* de type *b*

Phase de dénaturation initiale	Cycle d'amplification	Phase d'extension finale
94°C, 3mn, 1 cycle	40s à 92°C (dénaturation) 30s à 51°C (hybridation) 30s à 72°C (élongation) } 35cycles	72°C, 10mn, 1 cycle

- **Révélation**

Préparation du gel d'agarose 2%

Le gel d'agarose sert au dépôt d'amplicon pour sa migration. Nous l'avons préparé dans un flacon de 250 ml en ajoutant 2g d'agarose poudre dans 100ml du tampon TBE préparé comme décrit précédemment. Le mélange est chauffé au four micro-onde jusqu'à dissolution complète de l'agarose après quoi, on le rafraîchit au bain marie 5mn à 65°C. Nous ajoutons ensuite 2-3ul de bromure d'éthidium pour faciliter la visualisation par le polaroïd. Dans une cuve, les peignes séparateurs (10 ou 15 dents) sont alignés, le gel est coulé et laissé à température ambiante pour son refroidissement. Les peignes sont ensuite retirés après refroidissement (voir **figure 14**). Le gel peut être utilisé immédiatement ou conservé dans une cuve contenant du tampon TBE accompagnés d'une fiche sur laquelle est notée sa date de fabrication.

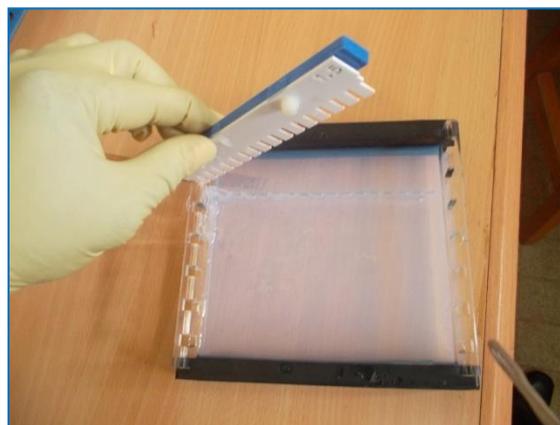


Figure 14 : Mise en place des peignes et des joints de coulage du gel

Migration électrophorétique

La migration électrophorétique est effectuée comme suit :

- Ajouter 10µl du tampon de charge dans chaque tube à échantillon contenant des ampliquons qui a pour rôle d'augmenter la charge pour maintenir l'échantillon au fonds du puits et de visualiser l'ADN ;
- Les placer sur un portoir flottant pour les chauffer 5mn au bain marie à 65°C en vue de séparer les brins d'ADN ;
- Ouvrir la cuve à migration contenant du tampon TBE 1X et placer le gel ;
- Le dépôt des échantillons s'effectue dans l'ordre suivant : 2,5µl du marqueur de poids moléculaire dans le puits N°1, 10µl des témoins négatif et positif dans respectivement les puits 2 et 3, et 10µl de chaque échantillon dans les puits suivant et dans l'ordre de numérotation ;
- En fin de distribution des échantillons fermer la cuve branchée au générateur réglé sur 120 volts et laisser migrer pendant une durée d'une heure ;
- Observer la migration du colorant de charge de la cathode vers l'anode.

Visualisation et interprétation

Les visualisations ont été faites en fin de migration à l'aide du trans-luminateur.

- Retire le gel de la cuve et le déposer sur le plateau du trans-luminateur ;
- La lecture s'effectue sous rayonnement ultraviolet de 70% ;

Il faut rincer si nécessaire le gel avec de l'eau distillée afin d'éliminer le surplus de bleu du tampon de charge ;

- Après la prise de la photo du gel par le trans-illuminateur sur 100% de rayonnement ultraviolet, vérifier la présence de la bande de témoin négatif et positif et celle du marqueur de poids moléculaire.

L'interprétation se fait en comparant la taille des bandes de différents échantillons à celle des bandes du marqueur de poids moléculaire et des témoins positif et négatif. Le contrôle positif est dit positif, si la bande migre à la bonne taille. Le contrôle négatif est dit négatif si aucune bande ne migre. Un échantillon est considéré positif si la bande apparait à la bonne taille.

Un échantillon est considéré négatif si aucune bande n'apparait et si seulement des bandes parasites apparaissent (voir **figure 15**).



Figure 15 : Image du gel après PCR multiplex sérogroupage NmW135

M : marquer de poids moleculaire (Q174) ; Nm :temoin positif de *Neisseiria meningitidis* W135 ; Hi :temoin positif de *Haemophilus influenzae* ; Sp :temoin positif de *S pneumoniae* .C,D,F et H =Echantillons positif à *Neisseriae méningitidis* de groupe W135 et A,B,E,G,I,J,K,L,S= échantillons négatifs

3.4.2.2.2. Technique de la PCR en temps réel

La PCR en temps réel de détection de *N. meningitidis*, *H. influenzae* et *S. pneumoniae* a été mise au point et validée sur les machines Stratagene MX 3005P. Elle comporte une étape d'extraction et d'une étape simultanée d'amplification et de détection.

- Lyse de la parai bactérienne

Reconstitution de la mutanolysine et du lysozyme

La mutanolysine est un lyophilisat qui doit être reconstituée et aliquotée comme suit :

- Ajouter 2,5ml d'eau stérile au flacon de mutanolysine (flacon de 10000 unités (U)) ;
- Distribuer 500ul dans 5 tubes, chacun contiendra 4000 U/ml (ou 4 U/ul) ;
- Conserver le tube à utiliser à 4°C et les autres tubes à -20°C ;

Le lysozyme existe sous forme de poudre à dissoudre dans la solution de lyse.

Préparation de la solution de lyse

La solution de lyse constituée de TE buffer (10Mm Tris-HCl, 1Mm EDTA, pH=8), de 0,04g/ml lysozyme et de 75U/ml de mutanolysine.

Pour avoir une concentration de 0,04g/ml de lysozyme et de 75 U/ml de mutanolysine, ajoutez 4mg lysozyme poudre et 1,9µl 4000 U/ml mutanolysine à chaque 100ul TE buffer. Lysozyme et mutanolysine doivent être ajoutés à TE buffer juste avant utilisation.

Lyse

- Dans un tube Eppendorf de 1.5ml, introduire 100ul de la solution de lyse ;
- Ensuite ajouter 200ul d'échantillon ;
- Incuber à 37 °C dans un bain marie pendant au moins une heure.

- Extraction et la purification de l'ADN bactérien

L'extraction a été réalisée dans la salle sale, chaque salle dispose d'une hotte et des équipements. Le Kit Qiagen est utilisé pour l'extraction et la purification de l'ADN bactérien [1]. Elles consistent à ajouter de la protéinase K DNA free au lysat précédent pour l'inactivation des autres protéines, à précipiter avec l'éthanol, et adsorber l'ADN à l'aide d'une colonne QIAamp ; le reste du procédé consiste à laver à l'aide de tampons spécifiques (Buffer AW₁ et AW₂) et éluer avec un autre tampon, le buffer AE.

La procédure d'extraction avec le kit Qiagen

- a) Ajouter 20ul de protéinase K (600Mau/ml) vortexer les tubes brièvement.
- b) Incuber à 56°C au bain-marie pendant 30minutes.
- c) Centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes qui sont à la face interne du couvercle 6000rpm pendant 30s
- d) Ajouter 200ul de Buffer AL. Vortexer les tubes brièvement.
- e) Incuber les tubes à la température ambiante pendant 10 minutes.
- f) Ajouter 260 µl d'éthanol (96-100%) dans chaque tube contenant l'échantillon, homogénéiser en vortexant pendant 15seconde. Après homogénéisation, centrifuger brièvement les tubes pour faire tomber les gouttelettes qui sont à la face interne du couvercle 6000 à 8000 rpm pendant 30 secondes.
- g) Transférer le mélange dans un tube à colonne QIAamp de 2ml sans mouiller le bord et fermer le couvercle du tube.

- h) Centrifuger à 6000g ou 8000 rpm pendant 1 minute. Eliminer le filtrat et le tube de collection
- i) Placer la colonne dans un nouveau tube de collection. Ajouter **500µl** de **Buffer AW1** sans mouiller le bord, fermer le couvercle et centrifuger à 6000g ou à 8000 rpm pendant **1 minute**. Eliminer le filtrat et le tube de collection.
- j) Placer la colonne dans un nouveau tube de collection. Ajouter **500µl du Buffer AW2** et centrifuger pendant 3 minutes à vitesse maximale (20000g ou 14000 rpm) pour éliminer toutes les traces d'éthanol de la colonne. Eliminer le filtrat et le tube de collection.
- k) Placer la colonne dans un tube eppendorf stérile de 1,5ml. Ajouter **100 µl du Buffer AE** dans la colonne. Incuber à la température du laboratoire pendant **5 minutes**. Centrifuger à 6000g ou 8000rpm pour éluer l'ADN pendant 1mn.
- l) Garder à **-20°C** jusqu'à l'utilisation.

- **Amplification et détection**

Préparation du Mix et de la plaque

Dans la salle propre, un mix est préparé pour chaque paire d'amorces dans un tube à part (voir réactifs en **section 3.3.6.3.2.**). Dans chaque tube le mix est composé, pour une réaction, de :

- Master Mix : 12.5µl
- Eau stérile qualité PCR : 4.5µl
- Amorce sens (Forward F) : 2.0 µl
- Amorce anti-sens (Reverse R) : 2.0µl
- Sonde : 2.0µl

Le mix est distribué à raison de 23µl par puits de microplaque correspondant, auquel est rajouté 2,0µl de DNA pour un volume total de 25µl par puits.

Le Mix est distribué dans les puits de la plaque en respectant un schéma comme indiqué à la **figure 16**. Les échantillons, les contrôles et les réactifs sont distribués sur une plaque de 96 puits avec pour chaque espèce un contrôle négatif de la salle sale (ntc-dirty) par ligne, un contrôle négatif de la salle propre (ntc-clean) par ligne, un contrôle de la série d'extraction

d'ADN (extracted H₂O) et un contrôle positif espèce (*SodC*, *Hpd* ou *LytA*). Une ligne est laissée entre chaque espèce de manière à minimiser les risques de contamination lors de la distribution.

TaqMan Template																		
Date:	18-06-2009			PCR #:				File name:										
Note:	Training plate 18-06-2009																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				ctrA	lytA	bexA
A	249	254	ext H ₂ O		249	254	ext H ₂ O		249	254	ext H ₂ O			Rxn x 1	Rxn	22	22	22
B	246	255	ntc		246	255	ntc		246	255	ntc		Mmix	12.5 ul		275	275	275
C	247	256	ntc		247	256	ntc		247	256	ntc		H ₂ O	4.5 ul		99	99	99
D	250	258			250	258			250	258	ntc		Primer F	2 ul		44	44	44
E	251	259			251	259			251	259	ntc		Primer R	2 ul		44	44	44
F	252	260			252	260			252	260			Probe	2 ul		44	44	44
G	253	262			253	262			253	262				23 ul		506	506	506
H	CTRA	263			bexA	263			lytA	263			DNA/H ₂ O	2 ul				
Controls:		Men A	2726		x		Men W	7034										
		Men B	5178				Men X	9664										
		Men C	1532				Men Y	2578										
		H. flu b			x		S. pneumo			x								

Figure 16 : Schéma de plaque utilisé lors de la PCR en temps réel [13]

Amplification et détection

L'amplification comporte une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C, une étape d'hybridation des sondes et des amorces à l'ADN dénaturé, et une étape d'élongation à 60°C due à la propriété de polymérisation de la Taq polymérase (**figure 17**). Les cycles thermiques décrits ci-dessous (**tableau VIII**), sont les mêmes pour chacun des trois germes quel que soit le type des recherches (identification d'espèces ou détermination de types/groupes). Si le gène cible existe dans le milieu, les amorces et les sondes s'y fixent ; la polymérase, par ses activités polymérasique et 5'-exonucléasique, permet l'élongation du néo-brin et l'hydrolyse de la sonde (**figure 17**). La sonde hydrolysée, du fait de l'éloignement du fluorophore et du quencher, émet une fluorescence captée et traduite en signal électrique par les photomultiplicateurs. La quantité de fluorescence est proportionnelle à la quantité des produits de PCR dans le milieu.

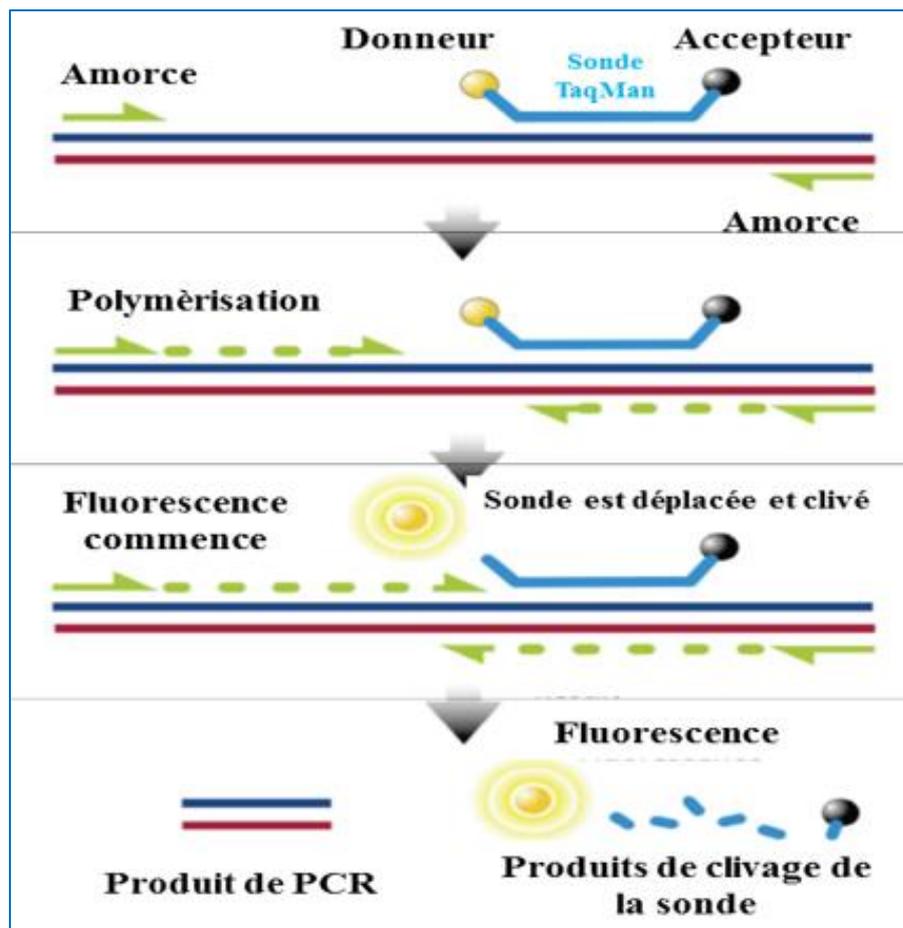


Figure 17 : Amplification/détection

Tableau VIII : Cycles thermiques

	Segment1	Segment2	Segment3
Température et temps	50°C pendant 1mn	95°C pendant 10mn	95°C pendant 15s 60°C pendant 1mn
Nombre de cycle	1	1	50
Activités	Mise à niveau thermique	Dénaturation initiale	Amplification : dénaturation, hybridation, élongation

Expression des résultats

C_t est le cycle seuil en abscisse : c'est le nombre de cycle PCR pour lequel la fluorescence mesurée par l'instrument est significativement au-dessus du zéro. La valeur de C_t est inversement proportionnelle au nombre des copies du gène cible au début de la PCR. L'ordonnée est la quantité de fluorescence émise (**figure 18**). La grille d'interprétation est donnée dans les **tableaux IX et X**.

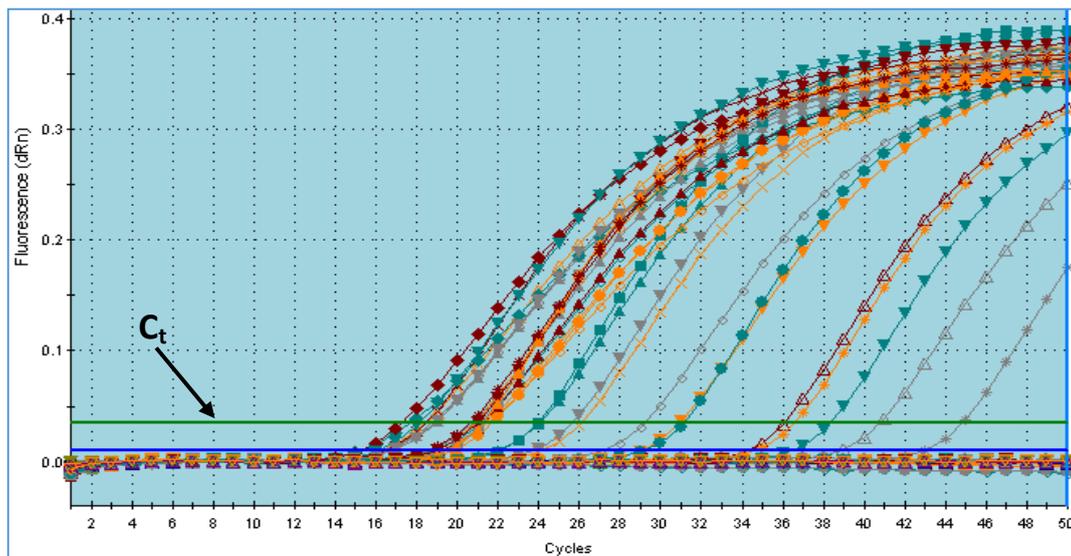


Figure 18 : Courbe d'amplification [13]

Tableau IX : Interprétation des valeurs du C_t

C_t	Résultat
≤ 35	Positif
Entre 36-40	Equivoque
> 40 ou absent	Négatif

Tableau X : Algorithme d'interprétation des résultats en fonction des amorces

Espèces (<i>sodC</i> , <i>hpd</i> , ou <i>lytA</i>)	Sérogroupe/ Sérotype	Interprétation
$C_t \leq 35$ cycles		Positifs pour les espèces
	$C_t \leq 35$ cycles	Positif pour le sérogroupe/sérotype et pour les espèces
C_t 36-40 cycles	$C_t \leq 35$ cycles	Accepter le sérogroupe/sérotype comme positive pour l'espèce *
$C_t \leq 35$ cycles	C_t 36-40 cycles	Positif espèce, diluer et refaire sérogroupe/sérotype *
C_t 36-40 cycles	C_t 36-40 cycles	Diluer et refaire le test pour les espèces et sérogroupe/sérotype
$C_t > 40$ ou absent	$C_t > 40$ ou absent	Négatif pour toutes les espèces

*Non applicable au *lytA*

3.4.3. Phase de collecte des données

Les données ont été collectées sur une fiche de collecte standardisée en cour dans la surveillance de la méningite (voir **annexe 3**). Les informations suivantes ont été recueillies sur chaque patient : âge, sexe, date de prélèvement, mois de prélèvement, l'aspect macroscopique du LCR, le résultat du Gram, de la culture, du latex et de la PCR classique et PCR temps réel.

3.4.4. Saisie et analyse des données

Les données ont été saisies sur Epi-Info 3.5.4 et analysées sur SPSS 20 pour Windows. Le test de Khi-deux a été utilisé pour la recherche de lien entre les variables avec un seuil de signification statistique fixé à $p=0,05$. Le test de kappa a été utilisé pour mesurer le degré d'accord entre les deux techniques de PCR et interprété comme suit :

- Inférieur à 0 : désaccord ;
- 0,0 - 0,20 : degré d'accord très faible ;
- 0,21 – 0,40 à : degré d'accord faible ;
- 0,41 – 0,60 : degré d'accord modéré ;
- 0,61 – 0,80 : degré d'accord fort ;
- 0,81 – 1,00 : accord presque parfait ;

3.4.5. Considérations éthiques

Anonymat : Cette étude est basée sur la surveillance épidémiologique de la méningite. L'anonymat était de règle. Un numéro unique est attribué à travers une fiche de notification à tous les patients de la surveillance. En aucun cas l'identité des patients ne sera diffusée.

Intérêt : Cette étude dénote d'un intérêt capital. A travers le diagnostic des différents agents pathogènes en cause, l'étude donne une bonne orientation non seulement sur l'efficacité et la couverture vaccinale des vaccins en cours d'utilisation, mais aussi sur la nécessité d'introduire d'éventuelle nouveau vaccin. La population bénéficiera donc de vaccin adapté selon le profil des agents pathogènes isolés.

L'étude présente de risque lieu à la ponction lombaire varient d'un simple traumatisme au décès du patient ; cependant, le prélèvement est effectué par des médecins expérimentés formés et recyclés à cet effet.

3.4.6. Chronogramme des activités

Activités	2012				2013				2014			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
Bibliographie	■				■					■		
Protocole	■											
Formation de l'INRSP	■	■										
Renforcement des capacités sur la PCR en temps réel à Ouagadougou						■						
Prélèvement et envoi des échantillons	■	■										
Manipulations de laboratoire	■	■	■	■	■	■						
Traitement et analyse des données						■						
Rapport préliminaire						■	■					
Rédaction thèse						■	■	■				
Corrections								■	■	■	■	■
Soutenance												■

Figure 19 : diagrammes de Gantt

4. RESULTATS

4.1. Description de la population étudiée

Tableau XI: Répartition des patients selon le sexe

Sexe	Fréquence	Pourcentage (%)
F	90	41,50
M	127	58,50
Total	217	100,00

Les patients étaient en majorité de sexe masculin (58,50%) avec un sex-ratio H/F de 1,41 en faveur du sexe masculin.

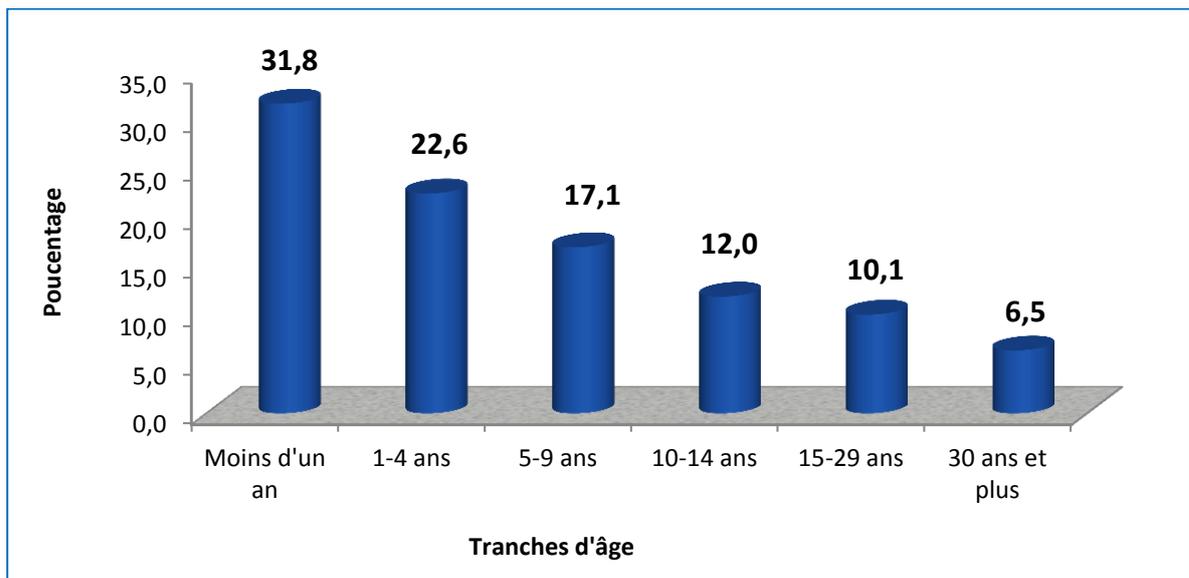


Figure 20: Répartition de la population par tranche d'âge

Le prélèvement de LCR a été plus effectué chez les enfants de moins d'un an (31,8%), suivi de la tranche d'âge 1-4 ans avec 22,6%. On constate une diminution du nombre de prélèvement au fur et à mesure que l'âge augmente.

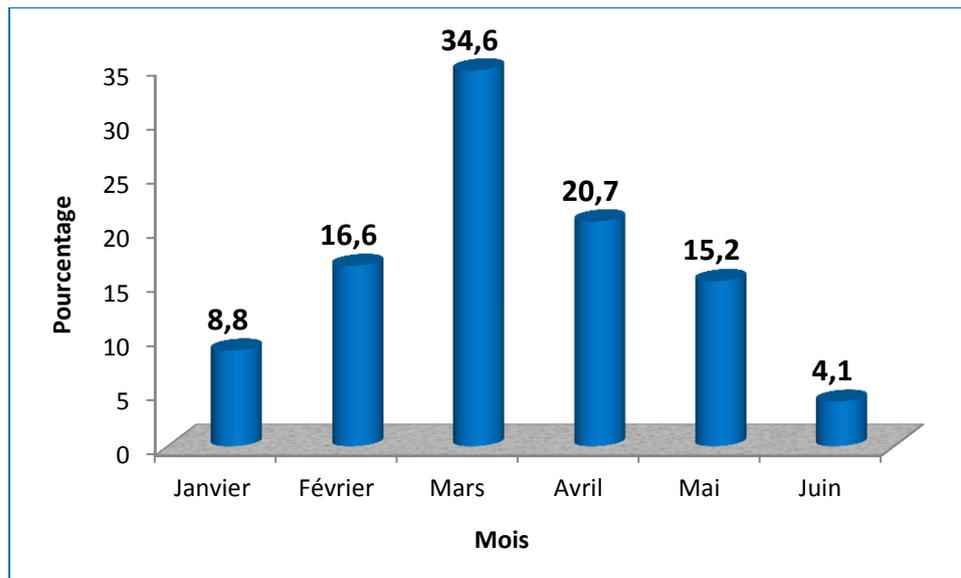


Figure 21: Répartition des LCR par mois de réception

Le nombre de prélèvements était plus élevé aux mois de février, mars, avril et mai avec un pic en mars (34,60%).

4.2. Répartition des LCR analysées à l'INRSP en 2012 par Région et par district sanitaire

Tableau XII: Répartition des LCR par région et par district sanitaire

Régions	Districts sanitaires	Total
Kayes (n=6)	Kéniéba	2
	Niono	1
	Nioro	3
Koulikoro (n=31)	Banamba	3
	Dioïla	4
	Fana	2
	Kangaba	1
	Kati	18
	Nara	3
	Sikasso (n=38)	Bougouni
Kadiolo		2
Kignan		4
Kolondiéba		16
Koutiala		2
Selingué		8
Sikasso		4
Ségou (n=1)	Ségou	1
Mopti (n=3)	Mopti	2
	Ténenkou	1
Gao (n=4)	Bourem	3
	Gao	1
Tombouctou (n=2)	Dire	1
	Goudam	1
Bamako (n=132)	Commune 1	30
	Commune 2	7
	Commune 3	2
	Commune 4	6
	Commune 5	11
	Commune 6	76
Total		217

La majorité de nos LCR provenaient de la commune 6 et de la commune 1 du district de Bamako avec respectivement 35% (76/217) et 13,80% (30/217). Les districts sanitaires de Kati et de Kolondièba suivaient avec respectivement 8,30% (18/217) et 7,40% (16/217).

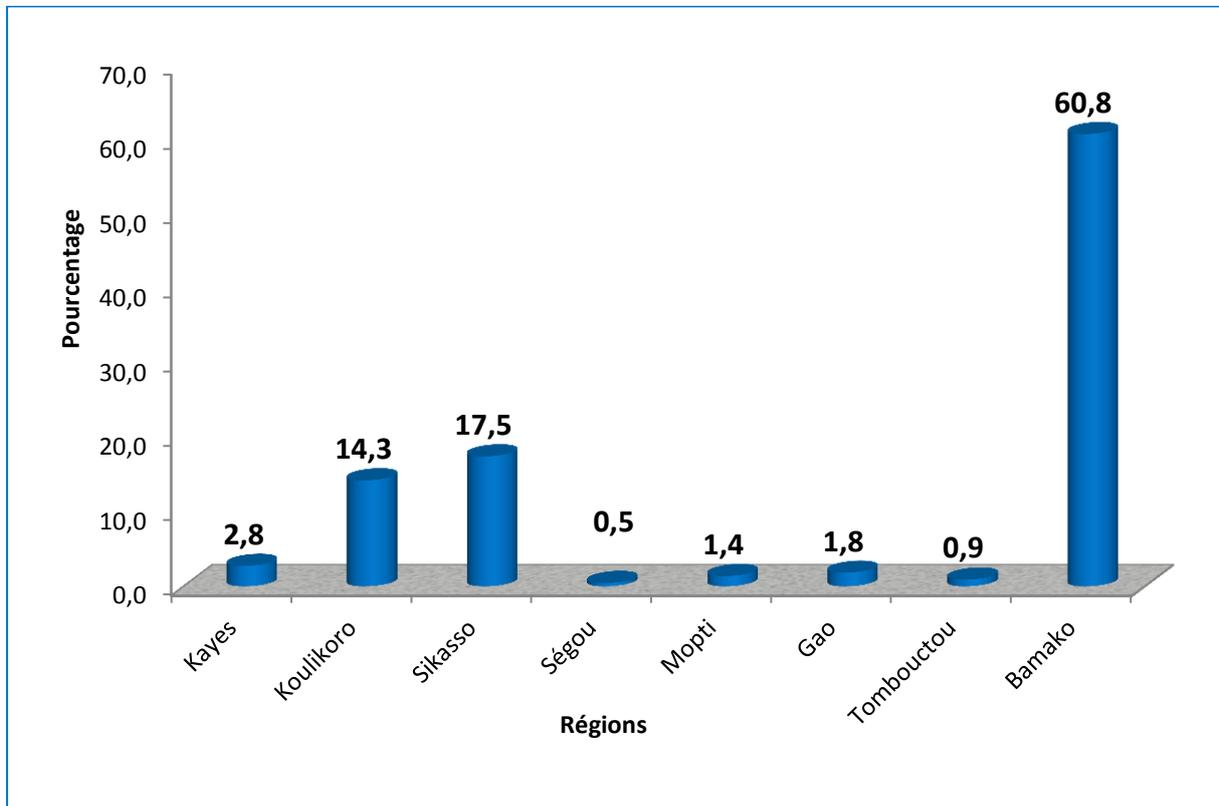


Figure 22 : Répartition des LCR par région

Considérant les régions sanitaires, les LCR provenaient majoritairement de Bamako avec 60,80% (132/217), de la région de Sikasso avec 17,50% et de la région de Koulikoro avec 14,30%.

4.3. Répartition des LCR selon l'aspect, le conditionnement et la qualité du prélèvement

Tableau XIII : Répartition des LCR selon l'aspect macroscopique, le milieu de transport et la qualité

Caractéristiques	Effectifs	Pourcentage %
<i>Aspect macroscopique</i>		
Clair	81	37,3
Trouble	67	30,9
Hématique	12	5,5
Xanthochromique	7	3,2
Non applicable	50	23,0
Total	217	100,0
<i>Milieu de transport</i>		
Trans-Isolate	50	23,0
Tube sec	167	77,0
Total	217	100,0
<i>Qualité</i>		
Adéquat	154	71,0
Non adéquat	63	29,0
Total	217	100,0

Non applicable= Echantillon parvenu dans le T-I

A la macroscopie, le LCR clair était le plus fréquent (37,3%) suivi du LCR trouble (30,90%). Le conditionnement sur tube sec a représenté 77,0% (167/217) et les LCR étaient adéquats dans 71% des cas.

4.4. Résultat de la bactériologie classique et de la PCR

Tableau XIV : Résultat des LCR selon le résultat de la coloration du Gram, l'agglutination au latex et la culture

Caractéristiques	Effectifs	Pourcentage%
Coloration Gram		
DGP	14	6,5
DGN	52	24,0
BGN	4	1,8
CGP	4	1,8
Négatif	143	65,9
Total	217	100
Agglutination au Latex		
<i>N. meningitidis</i> Y/W135	42	19,4
<i>S. pneumoniae</i>	13	6,0
<i>H. influenzae</i> de type b	2	0,9
Négatif	110	50,7
Non applicable	50	23,0
Total	217	100,0
Culture		
<i>N. meningitidis</i> W135	30	13,8
<i>S. pneumoniae</i>	4	1,8
<i>H. influenzae</i> de type b	1	0,5
Autre germes*	6	2,8
Négatif	169	77,9
Contaminée	7	3,2
Total	217	100,0

DGP=diplocoque Gram positif, DGN=diplocoque Gram négatif,

BGN=bacille Gram négatif, CGP=cocci Gram positif

*2 *Enterobacter cloacae* et 4 *Staphylococcus aureus*

Non applicable= échantillon parvenu dans le T-I

Par la coloration de Gram, les types morphologiques le plus fréquemment observée était les DGN avec 52 cas, suivi des DGP avec 14 cas (6,5%). Le test d'agglutination au Latex a permis de mettre en évidence majoritairement *N. meningitidis* Y/W135 avec 42 cas soit 19,4% et *S. pneumoniae* avec 13 cas soit 6,0%.

A la culture, 30 *N. meningitidis* W135, 4 *S. pneumoniae* et 1 *H. influenzae* de type b ont été identifiés.

Tableau XV : Répartition des germes selon le résultat de la PCR en temps réel et de la PCR classique

Caractéristiques	Effectifs	Pourcentage%
<i>PCR en temps réel</i>		
<i>N. meningitidis</i> W135	54	24,9
<i>S. pneumoniae</i>	17	7,8
<i>H. influenzae</i> de type b	6	2,8
Négative	140	64,5
Total	217	100,0
<i>PCR classique</i>		
<i>N. meningitidis</i> W135	38	17,5
<i>S. pneumoniae</i>	14	6,5
<i>H. influenzae</i> de type b	4	1,8
Négative	161	74,2
Total	217	100,0

La PCR en temps réel, a détecté *N. meningitidis* W135 dans 54 LCR, *S. pneumoniae* dans 17 LCR et *H. influenzae* de type b dans 6 LCR.

Quant à la PCR classique, elle a détecté le génome de *N. meningitidis* W135 dans 38 LCR, de *S. pneumoniae* dans 14 LCR et de *H. influenzae* de type b dans 4 LCR.

4.5. Analyse comparée des résultats de la bactériologie classique et des deux PCR

Tableau XVI: Comparaison des résultats de la PCR en temps réel et de la PCR classique

	PCR en temps réel				Total
	<i>N. meningitidis</i> W135	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i> de type b	Négative	
PCR classique					
<i>N. meningitidis</i> W135	35	0	0	3	38
<i>S. pneumoniae</i>	0	14	0	0	14
<i>H. influenzae</i> type b	0	0	4	0	4
Négative	19	3	2	137	161
Total	54	17	6	140	217

La PCR en temps réel a détecté plus de germes que la PCR classique :

- *N.meningitidis* W135 :54 cas contre 38
- *S.pneumoniae* :17 cas contre 14
- *H. influenzae* de type b : 6 cas contre 4

La différence était statistiquement significative (p=0,000).

Cependant il existe un degré d'accord fort entre les deux PCR avec Kappa=0,736.

Tableau XVII: Comparaison des résultats de la PCR classique avec ceux de la coloration de Gram, de l'agglutination au latex et de la culture

	PCR classique			Négative	Total
	<i>N. meningitidis</i> W135	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i> de type b		
Coloration de Gram (P = 0,000)					
DGP	0	9	0	5	14
DGN	27	0	0	25	52
BGN	0	0	1	3	4
CGP	0	0	0	4	4
Négatif	11	5	3	124	143
Total	38	14	4	161	217
Agglutination au Latex (P = 0,000)					
<i>N. meningitidis</i> Y/W135	25	0	0	17	42
<i>S. pneumoniae</i>	0	8	0	5	13
<i>H. influenzae</i> de type b	0	0	1	1	2
Négatif	8	5	3	94	110
Non applicable	5	1	0	44	50
Total	38	14	4	161	217
Culture (P=0,000)					
<i>N. meningitidis</i> W135	16	0	0	14	30
<i>S. pneumoniae</i>	0	3	0	1	4
<i>H. influenzae</i> de type b	0	0	0	1	1
Autres germes*	0	0	0	6	6
Négative	21	11	4	133	169
Contaminée	1	0	0	6	7
Total	38	14	4	161	217

DGP=Diplocoque Gram positif

DGN=Diplocoque Gram Négatif

BGN=Bacille Gram Négatif

CGP=Cocci Gram Positif

*2 *Enterobacter Serraceae* et 4 *Staphylococcus aureus*

Non applicable= échantillon parvenu dans le T-I

Qu'il s'agisse de la coloration de Gram, de l'agglutination aux particules Latex et de la culture, la PCR classique a significativement détecté plus de germes. Elle a détecté *N. meningitidis* W135 dans 11 LCR, *S. pneumoniae* dans 5 LCR et *H. influenzae* de type b dans 3 LCR pour lesquels aucune forme morphologique des germes n'a été vue à la coloration de Gram.

De même, 8 cas de NmY/W135, 5 cas de *S. pneumoniae*, 3 cas de *H. influenzae* de type b ont été détectés par la PCR classique dans les LCR négatif au test d'agglutination au latex d'une part, 21 cas de NmW135, 11 cas de *S. pneumoniae* et 4 cas de *H. influenzae* de type b ont été détectés par la PCR classique dans des LCR négatifs à la culture.

Tableau XVIII : Comparaison de la PCR en temps réel au Gram, au test d'agglutination au latex et à la culture

	PCR en temps réel				Total
	<i>N. meningitidis</i> W135	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i> b	Négative	
Coloration de Gram (p=0,000)					
DGP	0	12	0	2	14
DGN	43	0	0	9	52
BGN	0	0	2	2	4
CGP	0	0	0	4	4
Négatif	11	5	4	123	143
Total	54	17	6	140	217
Agglutination au Latex (P=0,000)					
<i>N. meningitidis</i> Y/W135	35	0	0	7	42
<i>S. pneumoniae</i>	0	11	0	2	13
<i>H. influenzae</i> de type b	0	0	2	0	2
Négatif	8	5	4	93	110
Non applicable	11	1	0	38	50
Total	54	17	6	140	217
Culture (P=0,000)					
<i>N. meningitidis</i> W135	27	0	0	3	30
<i>S. pneumoniae</i>	0	4	0	0	4
<i>H. influenzae</i> de type b	0	0	1	0	1
Autres germes*	0	0	0	6	6
Négative	26	13	5	125	169
Contaminée	1	0	0	6	7
Total	54	17	6	140	217

DGP=Diplocoque Gram Positif,
BGN=Bacille Gram Négatif

DGN=Diplocoque Gram Négatif,
CGP=Cocci Gram Positif

*2 *Enterobacter cloacae* et 4 *Staphylococcus aureus*
 Non applicable = Echantillon parvenu dans le T-I

Qu'il s'agisse de la coloration de Gram, de l'agglutination au Latex et de la culture, la PCR en temps réel a aussi détecté significativement plus de germes. Elle a détecté 11 cas de *N.meningitidis* W135, 5 cas de *S. pneumoniae* et 4 cas de *H. influenzae* de type b dans les LCR négatifs par la coloration de Gram. De même 8 cas de *N. meningitidis* W135, 5 cas de *S.pneumoniae*, 4 cas de *H. influenzae* type b ont été détectés par la PCR en temps réel dans les LCR négatif par le test d'agglutination de particules de latex. Elle a détecté également 26 cas de *N.meningitidis* W135, 13 cas de *S.pneumoniae* et 5 cas de *H.influenzae* type b qui ont été négatif à la culture.

Tableau XIX : Répartition des résultats de la culture en fonction de l'aspect, du matériel de transport et de la qualité du prélèvement

	CULTURE						Total
	Nm W135	Sp	Hib	Autres germes*	Négative	Contaminée	
Aspect macroscopique (p = 0,000)							
Clair	2	0	0	1	77	1	81
Trouble	17	4	1	0	43	2	67
Hématique	0	0	0	1	11	0	12
Xanthochromique	1	0	0	0	5	1	7
Non applicable	10	0	0	4	33	3	50
Total	30	4	1	6	169	7	217
Matériel de transport (p = 0,029)							
Trans-Isolate	10	0	0	4	33	3	50
Tube sec	20	4	1	2	136	4	167
Total	30	4	1	6	169	7	217
Qualité du prélèvement (p = 0,062)							
Adéquat	16	3	1	2	127	5	154
Non adéquat	14	1	0	4	42	2	63
Total	30	4	1	6	169	7	217

*2 *Enterobacter cloacae* et 4 *Staphylococcus aureus* Non applicable= échantillon parvenu dans le T-I

Dans 15 LCR non adéquats *N. meningitidis* W135 a été isolé à la culture dans 14 cas et *S. pneumoniae* dans le dernier cas. En plus, *N. meningitidis* W135 a été isolés dans 2 LCR d'aspect clair. La majorité des germes identifiés proviennent des LCR trouble : 17 *N. meningitidis* W135, 4 *S.pneumoniae* et 1 *H.influenzae* type b.

Le taux de détection des germes à la culture pour les prélèvements sur T-I (14/50 soit 28,0%) était supérieur aux prélèvements réalisés sur tube sec (27/167 soit 16,17%) ($p=0,122$).

Tableau XX : répartition des résultats de la PCR classique en fonction de l'aspect macroscopique, du matériel de transport et de la qualité

	PCR classique			Négative	Total
	<i>N. meningitidis</i> W135	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i> type b		
Aspect macroscopique (P=0,000)					
Clair	7	0	3	71	81
Trouble	22	11	1	33	67
Hématique	1	2	0	9	12
Xanthochromique	3	0	0	4	7
Non applicable	5	1	0	44	50
Total	38	14	4	161	217
Matériel de transport (P=0,073)					
Trans-Isolate	5	1	0	44	50
Tube sec	33	13	4	117	167
Total	38	14	4	161	217
Qualité du prélèvement (P=0,020)					
Adéquat	20	8	3	123	154
Non adéquat	18	6	1	38	63
Total	38	14	4	161	217

Non applicable= échantillon parvenu dans le T-I

La PCR classique a détecté *N. meningitidis* W135 dans 7 LCR clairs, et *H. influenzae* de type b dans 3 LCR clairs. Le taux de détection est plus élevé dans les LCR troubles : (34/67) soit 50,7%. Elle a détecté 6 germes dans les prélèvements sur le T-I (12,5% de détection) et 50 germes dans les prélèvements acheminés dans le tube (29,6% de détection) sans différence significative ($p = 0,073$). Le taux de détection était plus élevé pour les prélèvements non

adéquats que les prélèvements adéquats avec respectivement 39,6% soit (25/63) contre 20,1% soit (31/154) ; la différence était statistiquement significative avec $p=0,004$.

Tableau XXI : Répartition des résultats de la PCR en temps réel selon l'aspect, le matériel de transport et la qualité du LCR

	PCR en temps réel				Total
	<i>N. meningitidis</i> W135	<i>S.</i> <i>pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i> de type b	Négative	
Aspect macroscopique ($p=0,000$)					
Clair	8	0	3	70	81
Trouble	32	14	3	18	67
Hématique	0	2	0	10	12
Xanthochromique	3	0	0	4	7
Non applicable	11	1	0	38	50
Total	54	17	6	140	217
Matériel de transport ($p= 0,104$)					
Trans-Isolate	11	1	0	38	50
Tube sec	43	16	6	102	167
Total	54	17	6	140	217
Qualité du prélèvement ($p= 0,220$)					
Adéquat	33	11	5	105	154
Non adéquat	21	6	1	35	63
Total	54	17	6	140	217

Non applicable = Echantillon parvenu dans le T-I

La PCR en temps réel a détecté *N. meningitidis* W135 dans 8 LCR clairs et *H. influenzae* de type b dans 3 LCR clairs. Le taux de détection est plus élevé parmi les LCR trouble : 73,1% soit (49/67) par rapport aux LCR clair, hématique et xanthochromique avec une différence statistiquement significative $p=0,000$. Elle a détecté 12 germes dans les LCR acheminés par le T-I et 65 germes dans les LCR transportés dans le tube sec. Cependant le taux de détection était plus élevé pour les prélèvements non adéquats que les prélèvements adéquats : avec respectivement 44,4% (28/63) contre 31,8% (49/154) ; la différence était non significative avec $p=0,107$.

Tableau XXII : Taux de détection de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* type b par l'agglutination de latex, la culture et les deux PCR

Tests (N=217)	Positifs (n)	Taux de détection
Latex	57	26,2%
Culture	35	16,1%
PCR temps réel	77	35,4%
PCR classique	56	25,8%

La PCR en temps réel a le taux de détection le plus élevé avec 35,4%. Le latex et la PCR classique avait des taux proches. Les différences entre les taux étaient statistiquement significatives ($p=0,000$).

5. COMMENTAIRE ET DISCUSSION

Notre étude a été menée pendant la saison épidémiologique de 2012 sur 217 échantillons de LCR prélevés de janvier à juin, traités d'une part par la bactériologie conventionnelle, et d'autre part par deux techniques de PCR (PCR classique et PCR en temps réel). Le but est de comparer les résultats afin de renforcer non seulement les capacités de diagnostic des étiologies bactériennes aiguës, mais aussi d'améliorer le système de surveillance et de riposte face à ces méningites bactériennes aiguës.

Provenance, matériel de transport, et période de prélèvement des LCR

Les prélèvements de LCR provenaient de toutes les localités du Mali. Sur les 217 LCR recensés, la majorité provenait du district de Bamako soit 60,80%, de Sikasso (17,50%) suivi de la région de Koulikoro (14,30%). Cela peut s'expliquer par le fait que le laboratoire de référence de bactériologie est situé à Bamako ; cette proximité des districts sanitaires de Bamako rend l'accès au LNR plus facile ; et la taille de la population élevée de Bamako avec 1.926.748 habitants en 2012 suivi Sikasso 213977 habitants. D'autres études réalisées au Mali ont montré les mêmes tendances. C'est le cas de celle réalisée par **Coulibaly et coll.** durant les douze mois de l'année 2012 avec 68% de LCR provenant de Bamako [44]. **Guindo** en 2012 avaient une provenance des LCR moins élevée que la nôtre à Bamako avec 45%, mais nettement plus élevée à Gao avec 28% [45].

Un faible taux de provenance des échantillons des districts éloignés seraient sans doute dû aux difficultés liés au circuit d'acheminement ; il faut cependant noter que tous les cas notifiés ne sont pas accompagnés de prélèvements de LCR.

La proportion des LCR acheminée dans les tubes secs a été supérieure à celle des T-I soit respectivement 77,0% et 23,0%. Vu le pourcentage élevé de cas de Bamako et la possibilité d'acheminer rapidement le LCR sans besoins de T-I, le service reçoit beaucoup de LCR acheminés en tube. Le non disponibilité des T-I dans la plupart des centres périphériques pourrait également être un facteur augmentant la fréquence d'utilisation des tubes secs.

Nos résultats sont proches de ceux de Cissouma qui a trouvé que sur 125 échantillons de LCR traités en 2008, 102 (81,6%) ont été acheminés en tube sec et 23 en T-I (18,4%) [46].

Nous avons constaté que les méningites sévissent pendant toute la période de notre étude. Une proportion élevée a été enregistrée pendant quatre mois (Février, Mars, Avril et Mai) avec un pic en Mars soit 34,60% (voir **figure 20**). Cela peut s'expliquer par le fait que

les conditions climatiques pendant ces périodes marquées par la poussière, la chaleur et la sécheresse de l'air, facilitent l'infection par les germes de la méningite bactérienne comme rapporté dans la littérature [7]. C'est le cas de l'étude faite par **Seydi et coll. [47]** au Sénégal en 2002 qui ont montré que les méningites purulentes sévissent en toute saison mais culminent un pic pendant le mois le plus chaud de l'année.

Fréquence selon l'âge et le sexe

Le sex-ratio était 1,41 en faveur du sexe masculin dans notre étude et la tranche d'âge des moins d'un an était la plus fréquente avec 37,30% des cas suivi de la tranche d'âge 1-4 ans avec 20,30%, d'où une majorité de population infantile. Ce pourcentage élevé des moins de 5 ans pourrait s'expliquer par la fragilité de cette couche, vu les aléas climatiques liés à la période d'étude. De surcroît, l'immaturation de leur système immunologique serait un facteur, ne les protégeant pas assez contre les infections.

Le même constat de fréquence plus élevée chez les nouveau-nés et enfants a été fait en 1999 au Niger par **Campagne et coll.** qui trouvent que 76,2% des méningites bactériennes aiguës se manifestent avant l'âge d'un an [48]; **Eliso et coll.** en Antananarivo à Madagascar en 2004 trouvent aussi que les germes responsables des méningites bactériennes aiguës touchent 96% des enfants de moins de deux ans avec une fréquence maximale avant l'âge de un an [49].

Aspect macroscopique

Pendant longtemps, les LCR d'aspect clair ont été considérés comme exempt de germes certainement du fait du « dogme » d'appellation des méningites bactériennes aiguës sous le nom de méningites purulentes. À l'examen macroscopique de notre étude, 37,30% des LCR étaient clairs et 30,90% des LCR étaient troubles. De nos jours, il a été démontré que les germes bactériens sont identifiés dans les LCR clairs [1] ; c'est aussi le cas de notre étude où la PCR en temps réel a détecté des agents pathogènes dans 11/81 LCR (13,58%) d'aspect clair (voir **tableau XXI**), renforçant le choix de réaliser la PCR pour tous les LCR dans le passage à la surveillance cas par cas.

Diagnostic

Notre étude vise à comparer les deux plateformes de PCR disponibles à l'INRSP. D'une part nous avons évalué le degré d'accord entre les deux PCR et justifié la différence entre leurs résultats, d'autre part nous avons comparé les résultats de la bactériologie classique à ceux des deux PCR.

La comparaison des deux PCR entre elles

Un degré d'accord fort a été obtenu entre la PCR classique et la PCR en temps réel (Kappa = 0,797). Cependant la PCR en temps réel a détecté *N. meningitidis* W135 dans 12 LCR, *S. pneumoniae* dans 3 LCR et *H. influenzae* de type b dans 2 LCR, qui ont été négatifs à la PCR classique. Elle détecterait donc significativement plus de germes par rapport à la PCR classique ($p=0,000$). Plusieurs raisons peuvent expliquer cette différence.

L'extraction, réalisée par choc thermique à la PCR classique, est faite par un kit commercial Qiagen à la PCR en temps réel ; ce kit commercial donnerait un rendement d'extraction beaucoup plus élevé.

Les amorces utilisées à la PCR en temps réel seraient plus spécifiques avec des conditions d'hybridation différentes. En effet elles sont identiques pour *S. pneumoniae* avec une température d'hybridation différente d'une part, et différentes pour *N. meningitidis* et *H. influenzae* avec une température de d'hybridation également différente d'autre part.

Le système de détection constitue également une différence. Il est automatisé à la PCR temps réel avec des sondes spécifiques s'hybridant en même temps que les amorces et détectées en temps réel. A la PCR classique la détection est visuelle après migration électrophorétique ; une faible concentration d'amplicon sera peu ou pas visible ; une amplification pourrait donc ne pas être détectée.

De surcroît, la PCR en temps réel présente des avantages. Le BET, utilisé dans la détection de la PCR classique est un produit cancérigène posant un problème de biosécurité ; à la PCR en temps réel ce sont des sondes, produits non cancérigènes, qui sont utilisées pour la détection dans un système fermé et automatisé sans risque d'exposition, détectant 10 à 25 fois mieux [11]. Aussi, l'absence d'étape post-PCR à la PCR en temps réel réduit le temps opératoire et accélère considérablement le rendu des résultats tout en limitant le risque de contamination car une étape post-PCR existe à la PCR classique et nécessite une réouverture des tubes favorisant une contamination et une exposition.

Comparaison et des deux PCR à travers la culture

La culture est la méthode de référence (« gold standard ») de la bactériologie classique [1]. Nos résultats montrent que les deux PCR détectent significativement plus de germent des méningites bactériennes aiguës que la culture. La condition *sine qua non* pour qu'un germe pousse à la culture est sa vitalité ; ceci représente quelque part un inconvénient pour le

diagnostic des méningites bactériennes dans la surveillance. Cependant, la culture présente plusieurs avantages. Elle permet de détecter d'autres germes non spécifiques aux germes cibles de la PCR ; ainsi, 6 germes, non détectables par la technique de PCR, ont été identifiés par la culture (voir **tableaux XVII et XVIII**). Elle permet de réaliser un antibiogramme connu pour rôle dans la surveillance des résistances bactériennes et l'optimisation du traitement. Elle permet également la conservation des souches repicables pour d'autres investigations sur le germe vivant.

Par la culture, 41 germes ont été identifiés dont 30 *N. meningitidis* de groupe W135 (soit 13, 80 %), 4 *S. pneumoniae* (soit 1,80%), 1 *H.influenzae* type b (soit 0,50%) et 6 autres germes (soit 2,80%). Le nombre de LCR négatif était 169 soit 77, 90%. Parmi ces 169 LCR négatifs par la culture, la PCR classique et la PCR en temps réel ont significativement détectés des germes avec un effectif plus élevé dans le cas de la PCR en temps réel. La PCR classique a détecté *N. meningitidis* W135 dans 21 cas, *S.pneumoniae* dans 11 cas et *H.influenzae* de type b dans 4 cas ($p = 0,000$) ; la PCR en temps réel a détecté *N.meningitidis* W135 dans 26 cas, *S.pneumoniae* dans 13 cas et *H. influenzae* de type b dans 5 cas ($p = 0,000$).

Cette différence de détection serait due à plusieurs raisons : le problème de vitalité des germes ou leurs pertes pendant le transport et la faible charge bactérienne des LCR. Il faut noter aussi des cas d'antibiothérapies avant la ponction lombaire qui peuvent réduire la sensibilité de la culture.

L'influence de l'aspect macroscopique, de la qualité du LCR et le matériel de transport dans le diagnostic

Aspects macroscopique

Qu'il s'agisse de la culture, de la PCR classique ou de la PCR temps réel, il existe une différence significative dans la détection des germes selon l'aspect macroscopique. Les agents pathogènes ont été plus détectés dans les LCR troubles faisant de cet aspect une bonne orientation. Cependant des germes ont été identifiés dans des LCR clairs ; la comparaison de leur taux n'a pas révélé de différence significative entre la culture et la PCR classique d'une part, et entre la culture et la PCR temps réel d'autre part mais avec des p-values proches du seuil de signification (0,08 et 0,05).

Qualité du LCR et matériel de transport

Considérant les résultats pris globalement en dichotomie (positifs et négatifs), la culture et la

PCR classique ont montré une différence significative dans la détection des germes selon que le LCR soit adéquat ou non adéquat ($p=0,011$ et $0,004$) ; Par contre, il n'y avait pas de différence significative avec la PCR en temps réel avec $p=0,107$, montrant que la qualité du LCR n'a pas d'impact sur l'identification des germes par cette dernière technique.

La PCR classique et la PCR en temps réel ont détecté significativement des germes à partir du T-I que du tube sec avec un taux de détection plus élevé de la PCR en temps. En plus de ses propriétés de milieu de transport et de culture primaire, le T-I serait aussi un milieu permettant de mieux conserver l'ADN.

Germes détectés

Notre étude a détecté 47 *N.meningitidis* W135 (soit 21%), 17 *S. pneumoniae* (soit 7,80%) et 6 *H.influenzae* de type b (soit 2,80%). Les mêmes germes ont été retrouvés par **Sidibé** en 1990 avec *Neisseria meningitidis* (39,66%), *Streptococcus pneumoniae* (30,17%) et *H.influenzae* de type b (26,73%) [51], et **Samaké** en 2004 au CVD de Gabriel Touré avec Hib occupant la première place (38,8%) suivi de *Streptococcus pneumoniae* (25,9%) et *Neisseria meningitidis* (2,5%) [52]. Notre faible pourcentage des *H. influenzae* de type b est dû à l'introduction du vaccin Hib dans le PEV en 2007. L'émergence du sérotype *N. meningitidis* W135 dans notre étude s'expliquerait donc par la conséquence de l'introduction du vaccin A en 2010 au Mali ; une surveillance plus renforcée de NmW135 voire une introduction de vaccin contre ce sérotype mérite d'être envisagée.

6. RECOMMANDATIONS

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

Au Ministère de la santé :

- Promouvoir la formation continue des agents de la surveillance des méningites ;
- Équiper les districts Sanitaires des systèmes de transport pour l'acheminement des LCR ;

Aux hôpitaux et aux centres de santé de référence

- Envoyer au laboratoire le plus rapidement possible les LCR ponctionnés ;
- Mieux appliquer les recommandations d'utilisation des tubes de prélèvement ou des T-I pour le transport des LCR vers le laboratoire ;

A l'INRSP :

- Promouvoir l'utilisation du T-I dans la surveillance ;

À l'OMS et au CDC :

- appuyer l'INRSP :
 - o dans la formation sur les techniques de PCR en temps réel dans le diagnostic des méningites bactériennes ;
 - o dans l'acquisition des réactifs et consommables pour le typage d'*Haemophilis.influenzae* et de *Streptococcus pneumoniae*.

7. CONCLUSION

Le but de notre étude était de comparer les résultats de la PCR classique et ceux de la PCR en temps réel. Les résultats ont montré que la PCR en temps réel détecte significativement plus de germes que la PCR classique et que la qualité du LCR n'a pas d'impact significatif sur l'identification des germes par la PCR en temps réel. La technologie de la PCR en temps réel répondrait mieux aux exigences et aux conditions réelles de la surveillance avec une large utilisation du Trans-Isolate.

Afin de réduire le temps opératoire et accélérer significativement le rendu des résultats de manière plus fiable tout en limitant les risques de contamination et d'exposition, une vulgarisation ou une accessibilité de la technologie en temps réel s'avère nécessaire.

La comparaison des résultats des deux PCR à la culture, nous montre que la PCR peut être une indication à côté de la culture pour augmenter la capacité diagnostique de la méningite bactérienne aiguës vu le rôle de la culture dans la réalisation de l'antibiogramme.

8. REFERENCES

1. **Haidara A.** Méningite purulente du nourrisson : Aspect clinique, bactériologique et évolutif des méningites purulentes du nourrisson et de l'enfant dans le service de pédiatrie IV de l'hôpital Gabriel Touré. Thèse de médecine. FMPOS de Bamako. 2000. N°52.
2. **OMS/CDC.** 2011. "Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*". 2nd edition. Genève, 311p. WHO/IBV.11.09
3. **Harrison L.H, Trouter C.L and Ramsay M.E.** Global epidemiology of meningococcal disease. Vaccine. 2009; 27: B51-B63.
4. **Rosenstein N.E, Perkins B.A, Stephan D.S, Popovic T and Hughos J.M.** Meningococcal Disease. New England journal of Medicine 2001; 344:1378-1388.
5. **Mariani E et Kurkdjan P.** Infection à *Haemophilus* en Pédiatrie. Encyclopedie Médico-chirurgicale, Pédiatrie, 4-260-0-10, Maladie infectieuse, 8-017-F-15. 1998; Elsevier, Paris; 60p
6. **Lapeysonnie L.** Cerebro-Spinal Meningitis in Africa. Bulletin of the world Health organization. 1963; 28; Supp 1:1-114.
7. **Bulletin de l'OMS** 2011 ; 85 :550-551.doi :10.2471/BLT.11.020811
8. **World Health Organization.** Vaccine Preventable Diseases Monitoring System: Immunization Schedules by antigen selection center.2012; Génève; WHO. 230p.
9. **OMS:** La méningite méningocoque. Tout le communiqué de presse. Aide-mémoire N°141 révisé Novembre 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factcheets/2012/fas141/fr>. (20-12-2012)
10. **Denis F.** Apport des données microbiologiques dans le diagnostic étiologique bactérien des méningites purulentes. Med. Mal. Infect. 1996; 26:1060-7.
11. **Carless C.E, Guiver R, Barrow V, Edwards-Jones A, Fox J and Kaczmariski E.B.** Simultaneous Detection of *Neisseria meningitidis* *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in suspected case of Meningitis and Septicemia Using Real Time PCR. Journal of clinical Microbiologiy. 2011; 39:1553-1558.

- 12. Holland PM, Adramson RD, Watson R, Gelfand DH.** Detection of specific polymerase chain product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *thermos aquaticus* DNA polymerase. ProcNatlAcadSci USA-1991; 88:7276-80.
- 13. Lee L.G, Connell C.R and Bloch W.** Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. Nucleic Acids Research. 1993; 21(16):3761-3766.
- 14. Edward U, Muller A , Hammerschmidts S, Gerardy Schahn R and Frosch M.** Molecular analysis of the biosynthesis pathway of the alpha-2,8 polysialic acid capsule by *Neisseria meningitidis* serogroup B. Molecular Microbiology. 1994; 14:141-149.
- 15. Elyse P et Aain H.** « La PCR en temps réel: principe et application » Review in Biology and Biotechnology (Canada). 2002 ; 2 :2-11.
- 16. David F et Urlotte T** « An Isothermal Amplification Methodes ». comptes-rendu de l'Académie des Sciences.2002 ; 321 :909-914.
- 17. Rasmata O.** Disease out Breaks Reported 17 May 2002. Meningococcal Disease in Burkina Faso; 2002. <http://www.who-int/eme-documents/meningitis> (15-10-2012).
- 18. Goita L.** Les méningites purulentes de l'enfant. Fréquence, Aspect clinique, Etiologie, Thérapeutique et Evolutif à la pédiatrie du CHU Gabriel Touré en 2002. Thèse Médecine. FMPOS de Bamako 2003; N°77.
- 19. Barrow R, Claus H, Guiver M, Smart L, Jones D.M, Kaezmarski E.B et al.** Non-culture diagnosis and serogroup determination of meningococcal B and C infection by a sialy transferase (SiaD) PCR ELISA. Epidemiology and infection. 1997 ; 118:111-117.
- 20. Boisier P, Nicolas P, Djibo S, Taho .M.K, Jeanne I, Mainassara .H.B, Tonebray B et al.** Meningococcal meningitis: Unprecedented incidence of serogroup X-related case in 2006 in Niger. Clinical Infectious Diseases 2007; 44: 657-663.
- 21. Watt .J.P, Wolfson .L.J, O'Brien. K.L, Henkle E, Deloria-Knoll M, Mc Call N and al.** Burden of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b in children younger than 5 year:global estimates. Lancet. 2009 ; 374:903-911 ;
- 22. Bouvet A.** Cours de Bactériologie Général. Centre National de Référence des Streptocoques, Hôtel Dieu, Université Paris VI.720p.

<http://www.microb.edu.org/étudiant/étudiants.html> (15-09-12).

23. **Dia A.** Attitude des agents de la Santé face à la gestion des épidémies : Cas de l'épidémie de méningites Cérébraux Spinale au Mali en 1996. Thèse de Médecine, FMPOS Bamako, 2000 ; N°20.
24. **Fattorusso V.** Ritter vadémécum clinique : du diagnostic au traitement.2000. Masson. 15 Paris ; p1785.
25. **OMS:** Technique de laboratoire pour le diagnostic des Méningites à *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* type b. 2000 ; GENEVE WHO/CDC/CSR/EDC/2000. 7. 780p.
26. **PNUD.** Rapport sur la situation sociale et économique du Mali, PNUD mars 2003.420p.
27. **Ajello G.W, Feeley J.C, Hayes P.S, Reingold A.L, Bolan G, Broome C.V and Phillip C.J.** Trans-Isolate Medium: a new Medium for Primary Culturing and Transport of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. Journal of Clinical Microbiology. 1984; 20: 55-58.
28. **Rose A.M, Mueller J.E, Gerstl S, Njampop-Lafourcode B M, Page A.L, Nicolas P et al.** Meningitis dipstick rapid test: evaluating diagnostic performance during an urban *Neisseria meningitidis* Serogroup A outbreak, Burkina Faso, 2007. PLoS ONE 2010; 5:e11086.
29. **OMS:** Emergence de la méningococcie W135. Rapport d'une consultation de l'OMS Genève, 17-18 Septembre 2001. Organisation Mondiale de la Santé, département Maladie Transmissible, surveillance et action WHO / CDC / GAR /2012.1.
30. **Koné O.** Approche épidémiologique des méningites purulentes observées en Pédiatrie de l'HGT de 1994 à 1999. Thèse médecine. FMPOS de Bamako 1999. 89p. N°26
31. **Borel T, Rose AM, Guillerm M, Sidikou F, Gerstl S, Djibo A, et al.** High sensitivity and specificity of the Pastorex latex agglutination test for *Neisseria meningitidis* serogroup A during a clinical trial in Niger. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006;100(10):964-9.
32. **Carlip L ; Riou B.** Urgences médicochirurgicales de l'adulte.1992. Arnette. Paris. p1338

- 33. Alcalá B, Salcedo C, L.de la Fuente, Arreaza L, Uria M.J, Abad R, al.** *Neisseria meningitidis* Showing decreased susceptibility to Ciprofloxacin : first report in Spain. Journal of Antimicrobial chemotherapy. 2004 ; 53:409.
- 34. Manchanda V and Bhalla P.** Emergence of non-ceftriaxone Susceptible *Neisseria meningitidis* in India. Journal of clinical Microbiology. 2006; 44:4290-4291.
- 35. Claude J, Bennett M.D, Fred Plum M.D.** Traité de médecine interne. 1997. Médecine Flammarion. 20:1610-16-2013.
- 36. Kane A. M.** Aspect épidémiologiques et bactériologique des méningites purulentes au Mali de 1979 à 1999. Thèse de pharmacie. FMPOS de Bamako. 2003. N°59.
- 37. Bernard I.** Les méningites bactériennes. Progrès dans le développement de vaccin Global. Programme for vaccine and immunization. 2012; Genève. WHO.GPN.VRD. 90p.
- 38. Aubry P.** Les Méningites cérébrospinales à méningocoque. Ann Pédiatr. 2003 ; 10 : P-1-6.
- 39. OMS.** Gestion des épidémies de méningite en Afrique : Guide de référence rapide à l'intervention des autorités Sanitaires et les soignants. Organisation Mondiale de la Santé, 2010 WHO /HSE /GAR /E. Ri /2010.4.
- 40. Carbonelle B, Denis F, Mamonier A, Voguessinex R.** Bactériologie médicale. Techniques usuelles SA. 1987 ; Paris. France ,330 :10-13.
- 41. Denis F, Fleurette J, Laurans G, Moulin A, Mounier M, Orfila J, et al.** A latex agglutination technique for rapid, direct identification of pneumococci in blood cultures. Eur J Clin Microbiol. 1984;3(4):321-2.
- 42. Claus H, Vogel U, Muhlenhoff M, Gerardy-Schahn R and Frosch M.** Genetics of capsule O-acetylation in serogroup C,W135 and Y meningococci. Molecular Microbiology. 2004; 51:227-239.
- 43. OCHA** Bureau de coordination des humanitaires, Unité de gestion de l'information-Division nutrition du Mali, 2012(Updated juillet 2013) : Available from :www.unocha.un.org

- 44. Coulibaly S; Keita A; Mahamadou A; Diarra S; Dao K; Coulibaly O ; Maiga M ; Bougoudogo F.** Surveillance des méningites bactérienne chez les Enfants moins de 5 ans au Mali en 2012. Présentation poster SAPI 2013. Brazzaville.
- 45. Guindo I.** Apport de la PCR multiplex en temps réel dans le diagnostic des méningites bactériennes aiguës au Mali en 2012. Mémoire Diplôme d'Etude Spécialisées de Biologie clinique. FMPOS, Dakar (Sénégal) 2013. N°810.
- 46. Cissouma Zanga N.** Mise en place d'une technique PCR pour le diagnostic de la méningite cérébro-spinale à l'Institut Nationale de Recherche en Santé Publique de Bamako en 2009. Mémoire DEA en Science Biologie Appliquée. FAST, Bamako. 2009. 75p.N°97
- 47. Seydi M ; Soumare M ; Sow A.T ; Ndour. C.T ; al.** Aspect clinique, bactériologique et thérapeutiques des méningites cérébrospinales à Dakar. Med Trop 2002 ; 2 :137-140
- 48. Campagne G, Chippaux JP, Djibo S, Issa O, Garba A.** Epidémiologie et contrôle des méningites bactériennes chez les enfants de moins d'un an à Niamey (Niger). Bull Soc Pathol Exot. 1999;92(2):118-22.
- 49. Eliso A ; Pfister ; Rasamo J ; Raobijoana H ; Clouzeau J ; Migliani R ;Harisa M ; Randria A ; Rosamoelisa F et Razafindralambo.** *Haemophilus influenzae* de type b, 2eme cause des méningites bactériennes de l'enfant à Madagascar. Bull Soc pathol Exot 2014 ; 2592: 100-103.
- 50. Aurèle M.** Place de *Haemophilus influenzae* de type b dans les méningites bactériennes pédiatriques : bilan des années 2002-2004 au service de bactériologie de l'INRSP. Thèse de pharmacie. FMPOS de Bamako. 2005. N°64.
- 51. Sidibé A:** Epidémiologie des méningites à méningocoque au Mali (partie III). Thèse de pharmacie. FMPOS de Bamako. 1996. N°15.
- 52. Samaké T :** Pratique de l'examen cyto-bactériologique de LCR au Laboratoire d'analyse médicales de l'Hôpital Gabriel Touré ; aspect méthodologie. Thèse de Pharmacie. FMPOS de Bamako. 2004 .109p.N°64.

9. ANNEXES

Annexe 1 : Organisation Optimale

- Salle séparées avec des hottes de biosécurité pour l'assemblage de réaction (« salle propre ») et l'addition d'ADN (« salle sale ») au minimum, utiliser surfaces du travail séparées pour chaque procédure.



Figure 23 : Hotte de la salle sale pendant l'extraction de l'ADN bactérien



Figure 24: Hotte de la salle propre pendant la préparation des mix

- Utiliser les blouses différentes pour chaque salle ;
- Changez souvent de gants ;
- Utiliser micropipettes séparées dans chaque salle ;
- Toujours utiliser des cônes à filtre ;
- Ne déplacez pas les mains au-dessus des plaques ouvertes ;
- Couvrez les plaques ouvertes lors du transport entre salle propre et sale ;
- Vérifiez que les bouchons sont fermés.
- Désinfectez les surfaces avec 10% d'eau de javel et puis 70% éthanol et allumer la UV pour une heure, si disponible.

Annexe 2: Fiche individuelle de Notification des cas de maladies à potentiel épidémique

Région : _____ District: _____ Formation Sanitaire : _____

Choléra Diarrhée avec Draconculose Fièvre Hém. Fièvre J. Diphtérie Méningite PFA Rougeole TNN Sang/Shigella
Autres: _____

Assigné par le District :

N° EPID : _____ / _____ / _____ / _____ / _____ / _____

Région District Année Cas n° Date d'arrivée à la DRS Date d'arrivée Niveau national

Nom (s) du _____ Date _____ / _____ / _____ Age : _____

Patient : _____ naissance* : _____ / _____ / _____ (si DN **Ans** **Mois**

(Nom pas nécessaire en cas de SIDA) inconnu (Jours si TNN) (Si < 12mois)

Résidence du patient : Village /voisinage _____ Sexe : F = Féminin / M= Masculin

Ville / Canton : _____	District de résidence : _____	<input type="checkbox"/> U = Urbain / R= Rural Urbain/Rural
Information sur la localisation : _____		
Si possible Nom de la mère et du père si nouveau-né ou enfant		
Pour les cas de Fièvre Jaune, Méningite, Rougeole et TNN (TT chez la mère)		
Date de consultation à la formation sanitaire : ____/____/____	Vacciné : Oui /____/ Non /____/	
Si oui NmA <input type="checkbox"/> NmC <input type="checkbox"/> Nm W135 <input type="checkbox"/> Hib <input type="checkbox"/> Pneumo <input type="checkbox"/>		
Nombre de doses de vaccin reçues N° <input type="checkbox"/> Inconnu <input type="checkbox"/>		
Pour Hb, pneumo, Fièvre Jaune, Rougeole et TT- vérifier sur la carte de vaccination. Pour Méningite Nm par histoire		
Date de notification au DS par la formation sanitaire : ____/____/____	Date de la dernière vaccination ____/____/____	
Seulement pour Fièvre Jaune, Méningite, Rougeole et TT (chez la mère)		
Date du début de la maladie : ____/____/____		
Patient Interne <input type="checkbox"/> ou Externe <input type="checkbox"/> 1= Interne 2= Externe Résultats: <input type="checkbox"/> 1= Vivant 2= Décédé 3=Inconnu Classification Finale: <input type="checkbox"/> 1= Confirmé 2= Probable 3=Ecarté 4= Suspect		

Agent ayant rempli le bulletin : _____ Date d'envoi du bulletin au DS : ____/____/____

(email et tel)

Si échantillon est prélevé

Pour unité sanitaire : si échantillon de laboratoire prélevé, compléter l'information suivante. Envoyer une copie de ce bulletin au laboratoire avec l'échantillon

Date de prélèvement : ____/____/____

Heure du prélèvement : ____/____/____

Date d'envoi du prélèvement au laboratoire : ____/____/____

Type de prélèvement : Selles /____/____ Sang /____/____ LCR /____/____ Autres préciser

Pour Laboratoire périphérique

Date d'envoi du prélèvement au laboratoire du district: /____/____/____/

Compléter cette section et retourner le bulletin à l'équipe du district et au médecin A= Attente

Date de réception du prélèvement au laboratoire du district : /____/____/____/ Condition du prélèvement : Adéquat /____/____ Non Adéquat /____/____

Maladie	Type de Test	Résultats
---------	--------------	-----------

Choléra	Gram
	Culture
	Méthode Examen	
Méningite	Direct Utilisé	
Liquide céphalo-rachidien (LCR) : Trouble /__/ Clair /__/ Hémorragique /__/ Xanthochromique /__/		
Gram : DGN /__/ DGP /__/ BGN polymorphe /__/ Autres à préciser : -		
Latex : Positif /__/ Négatif /__/		
Si positif : NmA /__/ Nm C /__/ Nm B /__/ Nm Y / W135 /__/ NmX /__/ NmY /__/ Pneumo /__/ Hib /__/		
Autres à préciser :		
Laboratoire envoyant les résultats :		Autres tests en attente :
Date de réception des résultats au district : __/__/__ Date d'envoi des résultats de laboratoire au médecin par le DS: __/__/__		
NOTE : LE DISTRICT EST RESPONSABLE DE L'ENVOI DES RESULTATS DE LABORATOIRE AU MEDECIN. LA DEFALLANCE DE CE SYSTEME POURRAIT BRISER LA COOPERATION DE MEDECINS DANS LA NOTIFICATION DE CAS DANS L'AVENIR		

Pour Laboratoire Nationale de référence

Date de réception du prélèvement au laboratoire de référence :

Compléter cette section et retourner le bulletin à l'équipe du district et au médecin A= Attente

Date de réception du prélèvement : ____/____/____ Condition du prélèvement : Adéquat /__/ Non Adéquat /__/

Maladie	Type de Test	Résultats		Maladie	Type de Test	Résultats
Choléra	Examen Direct	+ -	-----	Fièvre Jaune	IgM	+ -
	Culture	+ -	Méthode Examen	Rougeole	IgM	+ -
Méningite	Gram		Direct Utilisé	Rubéole	IgM	+ - Détection du Virus
<i>N. meningitidis</i>	Culture	+ -		RVF	IgM	+ - + -
<i>S. pneumoniae</i>	Culture	+ -		Ebola	IgM	+ - + -
<i>H. influenza</i>	Culture	+ -		CCHF	IgM	+ - + -
<i>N. meningitis</i>	Latex	+ -		Lassa	IgM	+ - + -
<i>S. pneumoniae</i>	Latex	+ -		Marburg	IgM	+ - + -

<i>H. influenzae</i>	Latex	+	-	
	PCR	+	-	
Si culture, latex ou PCR positif pour <i>N.meningitidis</i> préciser le sérotype : NmA /___/ Nm C /___/ Nm B /___/ Nm W135 /___/ NmX /___/ NmY /___/				
Si typage du <i>S. pneumoniae</i> est fait, préciser le sérotype : _____				
Autres germes identifiés à préciser: _____				
<i>Shigella Dysenteriae</i> Culture SD type 1 /___/ Autres <i>Shigella</i> . _____ Pas <i>Shigella</i> /___/ Autres résultats de labo : _____				
Peste	Culture	+	-	_____
	IFA >1,64	+	-	
	PCR	+	-	_____

Date d'envoi des résultats du laboratoire de référence au district : ___/___/___				
Autres tests en attente :				
Date de réception des résultats du laboratoire de référence au district : ___/___/___ Date d'envoi des résultats du labo de référence au médecin : ___/___/___				
NOTE : Le district est responsable de l'envoi des résultats de laboratoire au médecin. La défaillance de ce système pourrait briser la coopération de médecins dans la notification de cas dans l'avenir				

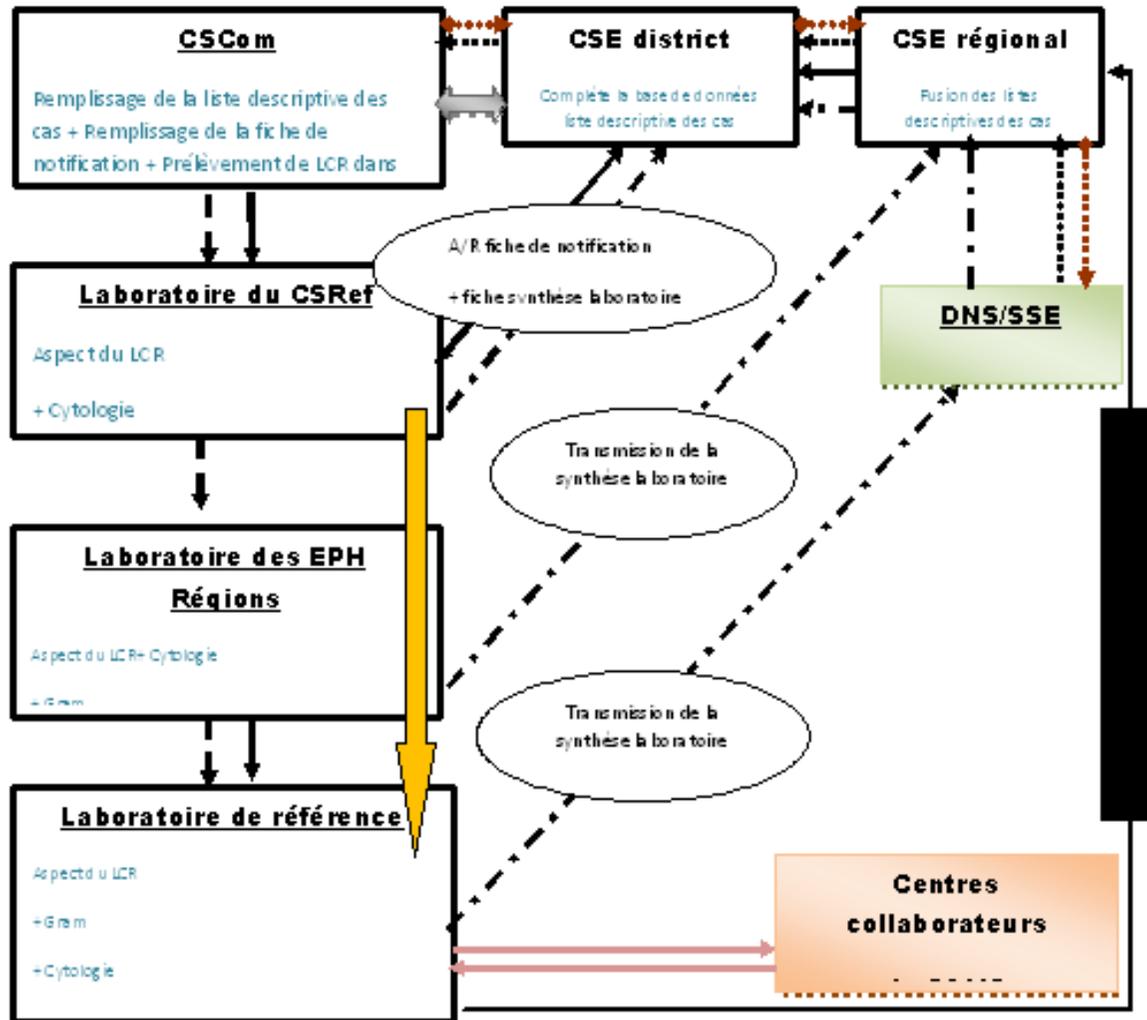
Annexe 3 : Fiche récapitulative hebdomadaire des résultats des examens de LCR

Région : Formation sanitaire :

Message RAC N° : _____ Du _____ | _____ | _____ | Au _____ | _____ | _____ |

N° Identifiant	Nom / Prénom	District	Formation sanitaire	Age		Sexe F/M	Echantillon			Résultats				Observations/ Antibiogramme
				en année	en mois si < 1 an		Date de collecte	Date de réception	Aspect*	Leucocytes (mm3)	Gram / Etat frais	Latex	Culture	

Annexe 4 : Circuit de la transmission du LCR des CSRef



Légende

-  Transmission des listes descriptives des cas
-  Retro information sur les listes descriptives des cas
-  Aller retour de la fiche de notification pour N° Epid
-  Transmission des échantillons au centre collaborateur
-  Retro information des résultats des centres collaborateurs
-  : Transmission directe des LCR + fiche de notification LNR
-  : **Communication verbale sur les résultats de laboratoire**
-  Transmission de la fiche synthèse laboratoire
-  Acheminement du LCR
-  Acheminement de la fiche de notification

LE SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;**
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;**
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine;**

En aucun cas, je ne consentirais à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Je le jure !