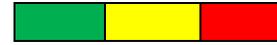


MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT  
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE DU MALI  
UN PEUPLE-UN BUT-UNE FOI



# ***FACULTE DE PHARMACIE***

ANNEE UNIVERSITAIRE 2014-2015

N°

**Caractérisation des Souches de Pneumocoque et  
d'*Haemophilus influenzae* responsables de  
méningites chez les enfants de 0 à 5 ans après  
l'introduction du Pentavalent et du Prevnar 13® au  
Mali.**

## **THESE :**

Présentée et soutenue publiquement le ../../.... devant la Faculté de Pharmacie de  
Bamako pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR EN PHARMACIE**  
(Diplôme d'état) par  
**Mlle. Hawa SANOGO**  
Née le 10 JUIN 1990 à Bamako

## **JURY**

---

<b>Président</b>	:	<b>Professeur Sounkalo DAO</b>
<b>Directeur</b>	:	<b>Professeur Flabou BOUGOUDOGO</b>
<b>Co-directeur</b>	:	<b>Mr Seydou DIARRA</b>
<b>Membre</b>	:	<b>Professeur Souleymane DIALLO II</b>
	:	<b>Docteur Mahamadou Farka MAIGA</b>

---

## ADMINISTRATION

DOYEN : **M. BOUBACAR TRAORE** - Professeur

VICE-DOYEN : **M. ABABACAR I MAIGA** - Professeur

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

AGENT COMPTABLE : **M. FEMALE DIONSAN** - CONTROLEUR DES FINANCES

## LES PROFESSEURS A LA RETRAITE

M. Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
M. Boukassoum	H AidARA	Législation
M. Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
M. Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
M. Moussa	HARAMA	Chimie Organique
M. Abdourahamane S.	MAIGA	Parasitologie

## DER DE SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

### 1. PROFESSEURS

M. Amagana		DOLO	Parasitologie-Mycologie
M. Alassane		DICKO	Santé Publique
M. Bakary	M.	CISSE	Biochimie
M. Abdoulaye		DABO	Biologie/Parasitologie <b>Chef DER</b>
M. Boubacar		TRAORE	Parasitologie-Mycologie
M. Mounirou		BABY	Hématologie

### 2. MAITRES DE CONFERENCES

M. Akory	AG	IKNANE	Santé publique/Nutrition
M. Bourèma		KOURIBA	Immunologie
Mr Souleymane		DIALLO	Bactériologie-Virologie
Flabou		BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
M. Abdoulaye		TOURE	Entomologie Médicale
M. Ousmane		KOITA	Parasitologie moléculaire
M. Abdoulaye		DJIMDE	Microbiologie-Immunologie
M. Mahamadou		DIAKITE	Immunologie-Génétique

### 3. MAITRES ASSISTANTS

Mme Fanta		SANGHO	Santé Publique
Mr Aldjouma		GUINDO	Hématologie



**Caractérisation des souches de Pneumocoque et d'*Haemophilus influenzae* responsables de méningites  
chez les enfants de 0 à 5 ans après l'introduction du Pentavalent et du Prevnar 13® au Mali**

---

**3. MAITRES ASSISTANTS**

M. Loséni	BENGALY	Pharmacie Hospitalière
M. Yaya	COULIBALY	Législation
M. Charle	ARAMA	Immunologie

**4. ASSISTANTS**

M. Bakary Moussa	CISSE	Galénique
M. Bourama	TRAORE	Législation
M. Issa	COULIBALY	Gestion
M. Hamma Boubacar	MAIGA	Galénique
M. Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie Hospitalière
M. Adama	DENOU	Pharmacognosie
M. Mahamane	HAIDARA	Pharmacognosie
M. Karim	TRAORE	Science Pharmaceutique
M. Antoine	DARA	Science Pharmaceutique
M. Souleymane	DAMA	Science Pharmaceutique

**DER DE SCIENCE FONDAMENTALES**

**1. PROFESSEURS**

M. Mamadou	KONE	Physiologie
M. Mahamadou	TRAORE	Génétique

**2. MAITRES DE CONERENCES**

M. Mouctar	DIALLO	Biologie/Parasitologie <b>Chef DER</b>
M. Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
M. Mamadou	CISSE	Biologie

**3. ASSISTANTS**

M. Moussa	KONE	Chimie Organique
M. Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie

**CHARGES DE COURS ET ENSEIGNANTS VACATAIRES**

M. Mohamed	Lamine	DIARRA	Botanique
Mr Bouba		DIARRA	Bactériologie
Mr Boubacar		KANTE	Galénique
M. Yaya		KANE	Galénique
M. Amidou		DOUCOURE	Chimie Organique
M. Atimé		DJIMDE	Bromatologie
M. Boubacar		ZIBEIROU	Physique
M. Fana		TANGARA	Mathématique
M. Abdel Kader		TRAORE	Sémio-méd
M. Seydou		DOUMBIA	Secourisme

**Caractérisation des souches de Pneumocoque et d'*Haemophilus influenzae* responsables de méningites  
chez les enfants de 0 à 5 ans après l'introduction du Pentavalent et du Prevnar 13® au Mali**

---

Ibrahim	ALWATA	Secourisme+
Moussa .I	DIARRA	Biophysique

**ENSEIGNANTS EN MISSION**

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

## DEDICACES

*En cet instant mémorable, je rends grâce à Allah Le Miséricordieux qui m'a accordé la santé, guidé mes pas, inspiré et insufflé l'inspiration, donné le courage, la force et la sérénité de mener à terme l'exaltant exercice que le destin a bien voulu m'assigné à travers le présent travail.*

*Puisse le Tout Puissant me gratifier de sa protection ; Paix et Salut sur son prophète MOHAMED !*

*Mes pensées toutes particulières vont à mes grands parents :*

*A ceux-ci qui ne sont plus pour découvrir leur petite fille à l'œuvre, feu Lamissa sanogo et feu Moussa TRAORE : mes grands pères ;*

*A celles-là qui sous le poids de l'âge malgré elles-mêmes ne sont plus à même de quitter leur Kéné Dougou natal pour m'admirer : Diarah SANOGO, N'niogo dite Hawa SANOGO mes grandes mères.*

*A mon adorable père, toi qui a su m'inculquer le sens de la rigueur au travail, celui des valeurs sociales, toi qui par ton intransigeance sur les principes moraux, de dignité humaine, par tes conseils, ta tendresse m'a donné confiance, merci d'avoir cru en moi et trouves en cette thèse mon hommage filial ;*

*A ma très chère et brave mère Diarata Traoré*

*Fervente adepte de l'effort, toi que j'ai toujours vu à la tâche, toi qui n'a rien concédé s'agissant de tes enfants que tu as mis avant tout, toi qui a toujours cru aux vertus du travail qui paye toujours, n'as-tu cessé de nous répéter; merci d'avoir été à nos côtés mes frères, ma sœur et moi-même.*

*A mes frères et sœurs Hassim Sanogo, Mohamed Sanogo, Diarha Sanogo, Moussa Sanogo, Mohamed Ouattara*

*Composantes de cette fratrie ayant rythmé la vie familiale jusqu'à ce qu'intervienne la séparation, les appels de la vie obligeant.*

*A chacun et à tous s'adresse cette dédicace, traduction de mon sentiment filial et de mon attachement fraternel.*

*A ma fille Aminata Karabinta que j'ai portée tout au long de ce travail. Tes coups de pieds m'ont donné la force de continuer, d'avancer même quand j'avais envie de baisser les bras. Te tenir dans mes bras fut un véritable don de dieu. Ma chère fille ta venue au monde a changé tout le sens de ce travail. Que dieu te donne longue vie et apporter encore plus de joie dans cette vie.*

*A mes oncles et tantes paternels et maternels*

*Merci pour tous les sacrifices consentis à mon égard.*

*A mes meilleures amies, les Docteurs Coulibaly Rokiatou Sidibé et Haidara Marie  
Madeleine Traoré*

*Pour tous ces moments difficiles mais aussi de bonheur que nous avons passé ensemble tant  
sur la colline du POINT G que dans la vie courante et pour la sincère amitié que vous m'avez  
témoignée. Vous continuerez sans doute à trouver en moi la sœur que vous avez su être pour  
moi durant ces années de compagnonnage partagées. Merci d'avoir été là pour moi à chaque  
fois que j'en avais besoin. Puisse cette belle amitié se consolider et résister à l'épreuve du  
temps.*

## REMERCIEMENTS

J'adresse ma reconnaissance :

**A l'état du Mali** et particulièrement au peuple du Mali à qui je rends hommage, peuple dont je suis à n'en pas douter le fruit de l'effort combien immense, effort qui m'a permis de me hisser à ce niveau privilégié.

**A tous les enseignants** qui ont contribué à ma formation depuis le cycle fondamental jusqu'à la faculté.

Au corps professoral de la **Faculté de Pharmacie de Bamako** pour l'enseignement de qualité dispensé et la grande disponibilité réservée aux étudiants.

**A mon oncle Professeur Boubacar Traoré**, Parasitologue, Doyen de la Faculté de Pharmacie dont les conseils m'ont été d'un apport inestimable tout au long de mon cursus.

**A ma belle sœur Aissata VILLEMUR**

Merci pour ton soutien inconditionnel

**A mes camarades de promotion**

Recevez ici toute ma reconnaissance et ma gratitude pour votre soutien et l'esprit de camaraderie qui a toujours caractérisé nos rapports. Je me souviendrai de chacun et chacune de vous. Plaise à Dieu que nos carrières soient couronnés d'autant de succès.

**A tout le personnel du laboratoire de Bactériologie de l'INRSP du Mali**

J'adresse mes vifs remerciements pour la disponibilité et la patience dont vous avez fait à mon égard.

Au CDC (Center for Diseases Control and prevention) d'ATLANTA branche méningite particulièrement au Docteur Jennifer Thomas qui n'a ménagé aucun effort pour que le typage des souches de *Streptococcus pneumoniae* soit une réalité à l'INRSP. Trouvez ici ma profonde gratitude. Puisse cette belle collaboration perdurer.

## 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 de CHU-Point G;  
Chef de DER de médecine à la FMOS;  
Président de la SOMAPIT;

#### **Cher maitre,**

C'est un grand honneur pour nous que vous ayez accepté de présider le jury de cette thèse malgré votre programme chargé. Nous avons été fascinés par votre contact facile.

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.

Trouvez ici toute notre reconnaissance.

### **A notre Maitre et juge : Professeur Souleymane DIALLO II**

Maitre de conférences en Bactériologie-virologie à la Faculté de Pharmacie,  
Colonel Major des services de Santé des Armées,  
Directeur Général du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux de Bamako.

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

Vos qualités scientifiques et humaines nous ont toujours émerveillés.

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

**A notre Maître et juge : Docteur Mahamadou F MAIGA**

Médecin, Chef de la section surveillance épidémiologique de la DNS ;

**Honorable Maître,**

Votre serviabilité, votre générosité, votre patience et votre grande disponibilité n'ont de cesse arrêté de nous impressionner. Vos conseils ont sans doute permis de mener à bien ce travail. Merci pour tout ce que vous avez fait pour nous. Trouvez ici l'expression de notre profonde reconnaissance et de notre profond respect.

**A notre Maître et co-directeur de thèse: Monsieur Seydou DIARRA**

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

**Cher Maître,**

Vous êtes un homme de grande simplicité. Nous vous remercions 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 Maître, l'expression de notre profonde reconnaissance et notre gratitude.

**A notre Maître et Directeur de thèse Professeur Flabou BOUGOUDOGO**

Maître de Conférences agrégé en bactériologie et virologie à la Faculté de Pharmacie ;

Responsable des cours de bactériologie et virologie à la Faculté de Pharmacie ;

Directeur de l'INRSP de 2002 à 2012 ;

Chevalier de l'Ordre du Mérite de la Santé.

**Cher Maître,**

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de me diriger dans l'exercice que fut ce travail. Très vite je me suis rendue compte que le scientifique, le chercheur avéré que vous êtes est doublé d'un être aux immenses qualités humaines que je n'ai eu de cesse d'apprécier. Soyez assuré que vos remarques et suggestions de haut niveau ont toutes grandement contribués à améliorer la qualité de ce travail.

Votre simplicité, votre disponibilité finalement votre humilité font de vous, cher Maître un exemple forçant le respect et l'admiration pour nous autres à l'orée de notre carrière.

Soyez assuré de notre sincère et profonde gratitude.

## « SOMMAIRE »

INTRODUCTION.....	1
PREMIÈRE PARTIE .....	3
GENERALITES.....	3
1. GENERALITES SUR LA MENINGITE BACTERIENNE A PNEUMOCOQUE ET A HAEMOPHILUS.....	4
1.1. Définition.....	4
1.2. Historique.....	4
1.2.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	4
1.2.2. <i>Haemophilus influenzae</i> .....	5
1.3. Habitat.....	5
1.3.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	5
1.3.2. <i>Haemophilus influenzae</i> .....	6
1.4. Mode de contamination.....	6
1.4.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	6
1.4.2. <i>Haemophilus influenzae</i> .....	6
1.5. Taxinomie et nomenclature.....	6
1.5.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	6
1.5.2. <i>Haemophilus influenzae</i> .....	7
2. Données bactériologiques, biochimiques, immunologiques .....	8
2.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	8
2.1.1. Caractères bactériologiques.....	8
2.1.1.1. Morphologie .....	8
2.1.1.2. Les souches de pneumocoque.....	9
2.1.1.3. Caractères cultureux .....	10
2.1.1.4. Antibiotiques .....	11
2.1.1.4.1. Les antibiotiques sensibles.....	11
2.1.1.4.2. Les antibiotiques résistants .....	12
2.1.2. Caractères biochimiques .....	13
2.1.3. Caractères antigéniques.....	13
2.1.3.1. Structure antigénique.....	13
2.1.3.2. Facteurs de virulence .....	14
2.1.3.2.2. La pneumolysine .....	15

2.1.3.2.3. Autres substances biologiquement actives Les antigènes somatiques...	15
2.2. <i>Haemophilus influenzae</i> .....	17
2.2.1. Caractères bactériologiques.....	17
2.2.1.1. Morphologie .....	17
2.2.1.2. Caractères cultureux .....	17
2.2.1.2.1. Les facteurs de croissances .....	18
2.2.1.2.2. Milieux de culture .....	18
2.2.1.3. Antibiotiques .....	21
2.2.2. Les caractères biochimiques.....	21
2.2.3. Les caractères antigéniques .....	23
2.2.3.1. La capsule .....	23
2.2.3.2. La Membrane externe .....	23
2.2.3.3. Le Pili ou fimbriae .....	24
2.2.3.4. Les caractères liés au gène.....	24
2.2.3.5. La transformation .....	25
2.2.3.6. La bactériophagie .....	25
2.2.3.7. Les plasmides .....	25
3. Physiopathologie .....	26
3.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	26
3.1.1. Les pathologies pulmonaires .....	26
3.1.1.1. La pneumonie franche lobaire aiguë .....	26
3.1.1.2. Les infections broncho-pulmonaires .....	26
3.1.2. Les méningites purulentes .....	26
3.1.3. Les otites moyennes aiguës .....	27
3.2. <i>Haemophilus influenzae</i> .....	27
3.2.1. Pouvoir pathogène expérimental .....	27
3.2.2. Pouvoir pathogène naturel.....	27
3.2.2.1. Chez le nourrisson et l'enfant .....	27
3.2.2.1.1. Les souches capsulées.....	27
3.2.2.2. Chez l'adulte.....	28
4. DIAGNOSTIC.....	29
4.1. Diagnostic clinique .....	29
4.1.1. Définition de cas.....	29

4.1.1.1. Cas présumé.....	29
4.1.1.2. Cas probable .....	29
4.1.1.3. Cas confirmé.....	29
4.1.2. Diagnostic chez le grand enfant .....	29
4.1.3. Diagnostic chez le nourrisson .....	30
4.2. Diagnostic biologique.....	30
4.2.1. Modalités de recueil du LCR .....	30
4.2.2. Outils de collecte et de transport des échantillons .....	32
4.2.2.1. Tube sec.....	32
4.2.2.2. Trans-Isolate .....	32
4.2.2.3. Cryotube .....	32
4.2.3. Démarche diagnostique .....	32
4.2.3.1. En routine .....	32
4.2.3.1.1. Examen macroscopique .....	32
4.2.3.1.2. Culture.....	33
4.2.3.1.3. Examen microscopique .....	33
4.2.3.1.4. Biochimie .....	34
4.2.3.1.5. Diagnostic immunologique .....	34
4.2.3.2. Biologie moléculaire.....	34
4.2.3.2.1. La PCR classique et la PCR en temps réel .....	34
4.2.3.2.2. Les MLST .....	34
5. TRAITEMENT.....	35
5.1. Prophylaxie .....	35
5.1.1. Prévention de la transmission.....	35
5.1.1.1. Préventions de base en cas d'épidémie de méningite.....	35
5.1.2. Prévention par la vaccination .....	35
5.1.2.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	35
5.1.2.1.1. Prevnar 13® .....	35
5.1.2.1.2. Pneumo 23 .....	36
5.1.2.2. <i>Haemophilus influenzae</i> .....	37
5.1.2.2.1. Penta.....	37
5.2. Prise en charge .....	38
DEUXIEME PARTIE.....	39

ETUDE.....	39
1. CONTEXTES ET JUSTIFICATIONS.....	40
2. OBJECTIFS.....	42
2.1. Objectif général.....	42
2.2. Objectifs spécifiques.....	42
3. MÉTHODOLOGIE.....	43
3.1. CADRE THEORIQUE.....	43
3.1.1. Présentation de l'INRSP.....	43
3.1.1.1. Description du service de bactériologie.....	44
3.1.2. Type de l'étude.....	45
3.2. MATERIELS.....	45
3.2.1. Échantillons.....	45
3.2.2. Patients.....	45
3.2.2.1 Critères.....	45
3.2.2.1.1. Critères d'inclusion.....	45
3.2.2.1.2. Critères de non inclusion.....	46
3.2.2.2. Echantillonnage.....	46
3.2.2.3. Variables à étudier.....	46
3.2.3. Equipements, réactifs et consommables.....	46
3.2.3.1. Ponction.....	46
3.2.3.2. Bactériologie classique.....	46
3.2.3.2.1. Etat frais.....	46
3.2.3.2.2. Coloration de Gram.....	47
3.2.3.3. Immunologie.....	48
3.2.3.3.1. Recherche d'antigènes solubles.....	48
3.2.3.4. Biologie moléculaire.....	49
3.2.3.4.1. Identification de l'espèce par la PCR en temps réel.....	49
3.2.3.4.2. Sérotypage de <i>Streptococcus pneumoniae</i> par la PCR en temps réel.....	54
3.3. METHODES.....	55
3.3.1. Au niveau des sites.....	55
3.3.1.1. Prélèvement.....	56
3.3.1.2. Condition de conservation et de transport.....	56
3.3.2. Au niveau de l'INRSP.....	56

3.3.2.1. Méthode de laboratoire .....	56
3.3.2.1.1. Examen macroscopique .....	56
3.3.2.1.2. La culture .....	58
3.3.2.1.3. Examen microscopique .....	58
3.3.2.1.3.1. Tube sec .....	58
3.3.2.1.3.2. Trans-Isolate .....	59
3.3.2.1.4. Identification .....	59
3.3.2.1.5. Biologie moléculaire .....	63
3.3.2.1.5.1. Identification par PCR en temps réel et sérotypage .....	63
3.4. Collecte des données .....	71
3.5. Saisie et analyse des données .....	71
3.6. Chronogramme .....	72
4. RESULTATS .....	73
4.1. Résultat généraux .....	73
4.1.1. Description de la population des patients .....	73
4.1.2. Caractéristiques des échantillons .....	74
4.1.3. Résultats de la bactériologie classique et de la biologie moléculaire .....	76
4.2. Cas confirmés de <i>Streptococcus pneumoniae</i> et <i>Haemophilus influenzae</i> .....	79
5. COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS .....	90
5.1. Résultats généraux .....	90
5.1.1. Répartition des patients en fonction de l'âge, le sexe et le statut vaccinal .....	90
5.1.2. Aspect macroscopique .....	91
5.1.3. Germes détectés .....	91
5.2. Résultats <i>Streptococcus pneumocoque</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> .....	92
6. RECOMMANDATIONS .....	96
7. CONCLUSION .....	97
8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	98
9. ANNEXES .....	102
9.1. Instructions d'utilisation des milieux de transport TI .....	102
2. Fiche de notification révisée .....	104
3. Fiche signalétique .....	108

## SIGLES ET ACRONYMES

<b>Ag</b>	: Antigène
<b>BNR</b>	: Bas niveau de résistance
<b>CA-SFM</b>	: Comité d'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Dioxyde de carbone
<b>CRMT</b>	: Centre Régional de Médecine traditionnelle de Bandiagara
<b>CSRéf</b>	: Centre de Santé de Référence
<b>DAP</b>	: Département d'Administration et du Personnel
<b>DDRb</b>	: Département de Diagnostic et de Recherche Biomédicale
<b>DF</b>	: Département de Formation
<b>DMT</b>	: Département de Médecine Traditionnelle,
<b>DPN</b>	: Diphosphonucleotide
<b>DSC</b>	: Département de Santé Communautaire
<b>Eno</b>	: enolase
<b>Facteur V</b>	: Facteur 5
<b>Facteur X</b>	: Facteur 10
<b>GBS</b>	: Streptocoque du groupe B
<b><i>H. influenzae</i></b>	: <i>Haemophilus influenzae</i>
<b>Hib</b>	: <i>Haemophilus influenzae</i> type <i>b</i>
<b>HITC</b>	: Hypertension Intracrânienne
<b>HNR</b>	: Haut Niveau de Résistance
<b>Hyl</b>	: Hyluronate lyase
<b>IgA</b>	: Immunoglobuline A
<b>INRSP</b>	: Institut National de Recherche en Santé Publique
<b>L4</b>	: 4 <sup>ème</sup> vertèbre lombaire
<b>L5</b>	: 5 <sup>ème</sup> vertèbre lombaire
<b>LCR</b>	: Liquide Céphalo- Rachidien
<b>LOS</b>	: Lipo-oligosaccharide
<b>LPS</b>	: Lipopolysaccharide
<b>LTA</b>	: Lipoteichoic Acid
<b>LytA</b>	: Autolysine
<b>MCS</b>	: Méningite Cérébro- Spinale
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Chlorure de magnésium

<b>ml</b>	: millilitre
<b>mm</b>	: millimètre
<b>NA</b>	: Non applicable
<b>NAD</b>	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide ou facteur 5
<b>NADP</b>	: NAD-phosphate
<b>NanA</b>	: Neuraminidase
<b>Nm</b>	: <i>Neisseria meningitidis</i>
<b>Nm A</b>	: <i>Neisseria meningitidis</i> groupe A
<b>Nm W135</b>	: <i>Neisseria meningitidis</i> groupe W135
<b>Nm W135/Y</b>	: <i>Neisseria meningitidis</i> groupe W135/Y
<b>Nm X</b>	: <i>Neisseria meningitidis</i> groupe X
<b>Nm Y</b>	: <i>Neisseria meningitidis</i> groupe Y
<b>OMA</b>	: Otites Moyennes Aigues
<b>OMD</b>	: Objectifs du Millénaire pour le Développement
<b>OMS</b>	: Organisation mondiale de la Santé
<b>ORL</b>	: Oto-rhino Laryngologie
<b>PEV</b>	: Programme Elargi de Vaccination
<b>PavA</b>	: Pneumococcal adhesion and virulence A
<b>PCR</b>	: « Polymerase Chain Reaction »
<b>pH</b>	: potentiel d'hydrogene
<b>PiaA/PiuA</b>	: Pneumococcal Iron Acquisition and Uptake
<b>PL</b>	: Ponction Lombaire
<b>PME</b>	: Protéine de Membrane Externe
<b>PRP</b>	: Polyribosyl Ribitol Phosphate
<b>PRP-OMP</b>	: Polyribosyl ribitol phosphate couplé à la protéine de membrane externe
<b>PsaA</b>	: Pneumococcal Surface Antigen A.
<b>PspA</b>	: Pneumococcal surface protein A
<b>PspC</b>	: Pneumococcal surface protein C
<b>PsrP</b>	: Pneumococcal serine-rich repeat Protein
<b>QSP</b>	: Quantité Suffisante Pour
<b>Rpm</b>	: Rotation par minute
<b><i>S. pneumoniae</i></b>	: <i>Streptococcus pneumoniae</i>

<b>Spn</b>	: <i>Streptococcus pneumoniae</i>
<b>StrA</b>	: Sortase A
<b>T-I</b>	: Trans Isolate
<b>TNP</b>	: Triphosphonucleotide
<b>µg</b>	: Microgramme
<b>MLST</b>	: Multi-locus Séquence type

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Exigence en fonction des différentes espèces de <i>Haemophilus</i> .....	7
Tableau II : Interprétation des CMI de bêta-lactamines selon le CA-SFM.....	12
Tableau III: Classification danoise de Lund des 92 sérotypes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	14
Tableau IV: Activités biochimiques de <i>Haemophilus influenzae</i> .....	22
Tableau V: listes des amorces et sondes spécifiques des gènes à amplifier de la PCR en temps réel ..	52
Tableau VI : Amorces, sondes et colorants des sondes utilisées pour le typage de <i>Streptococcus pneumoniae</i> dans une mPCR en temps-réel .....	53
Tableau VII : Critères d'appréciation de la qualité des LCR .....	57
Tableau VIII : Volumes des éléments composant le milieu réactionnel de la PCR .....	65
Tableau IX: Cycles thermiques pour l'identification de l'espèce et typage de <i>Haemophilus influenzae</i> .....	67
Tableau X : Cycles thermiques pour le typage de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	68
Tableau XI: Interprétation des valeurs du Ct .....	69
Tableau XII: Algorithme d'interprétation des résultats en fonction des amorces .....	70
Tableau XIII: Répartition des patients selon le sexe, l'âge .....	73
Tableau XIV : Répartition des échantillons en fonction du statut vaccinal et du type de vaccin administré .....	74
Tableau XV: Répartition des LCR selon l'aspect macroscopique, le milieu de transport et la qualité. 76	
Tableau XVI: Répartition des LCR selon les résultats de la coloration du Gram, latex, la culture et la PCR .....	77
Tableau XVII : Répartition des germes identifiés selon la fréquence .....	78
Tableau XVIII: Répartition des cas confirmés de méningite à <i>Streptococcus pneumoniae</i> et à <i>Haemophilus influenzae</i> en fonction du sexe l'âge, le statut vaccinal et le type de vaccin.....	80
Tableau XIX : Répartition des cas confirmés à <i>Haemophilus influenzae</i> en fonction du statut vaccinal et le type de vaccin .....	81
Tableau XX : Répartition des cas des cas confirmés de <i>Streptococcus pneumoniae</i> et <i>Haemophilus influenzae</i> en fonction du milieu de transport utilisé, qualité et l'aspect macroscopique du LCR.....	82
Tableau XXI : Répartition des sérogroupes/sérotypes de pneumocoque en fonction de leur appartenance au Prevnar 13®.....	83
Tableau XXII : Répartition des sérotypes/serogroupes de pneumocoque en fonction de la tranche d'âge .....	85
Tableau XXIII : Répartition des sérotypes/ sérogroupes de pneumocoque en fonction du statut vaccinal des patients.....	86
Tableau XXIV : Répartition des sérotypes/serogroupes de pneumocoque en fonction du type de vaccin administré .....	88

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Morphologie de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	8
Figure 2: Culture de <i>Streptococcus pneumoniae</i> sur gélose au sang.....	10
Figure 3 : Structure antigénique de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	16
Figure 4: Coloration de Gram d' <i>Haemophilus influenzae</i> type b .....	17
Figure 5: Exemple d'aspect des colonies de <i>Haemophilus influenzae</i> sur gélose au sang frais. ....	19
Figure 6 : Exemple d'aspect d' <i>Haemophilus influenzae</i> ensemencé sur la gélose au sang cuit .....	20
Figure 7: Exemple d'aspect de <i>Haemophilus influenzae</i> sur une gélose chocolat au PVX après 24h d'incubation à 37°C. ....	20
Figure 8: Position de patient et site de la ponction lombaire.....	31
Figure 9: Présentation de PASTOREX™ MENINGITIS BIO-RAD.....	48
Figure 10: Stratagene MX3005P.....	54
Figure 11 : schéma de plaque utilisé pour la PCR à temps réel .....	66
Figure 12:Amplification /Détection .....	67
Figure 13: Courbe d'amplification .....	69
Figure 14 : Algorithme de typage de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	71
Figure 15: Répartition des LCR en fonction du mois de notification en 2014.....	75
Figure 16 : Répartition mensuelle des cas confirmés de méningite à <i>Streptococcus pneumoniae</i> et à <i>Haemophilus influenzae</i> par mois .....	79
Figure 17 : Répartition des sérotypes/serogroupes de pneumocoque selon la fréquence.....	84
Figure 18 : Répartition des sérotypes/serogroupes de pneumocoque en fonction du statut vaccinal .....	87
Figure 19 : Répartition des sérotypes/serogroupes de pneumocoque en fonction du type de vaccin....	89
Figure 20 : Fiche de notification révisée .....	107

**Caractérisation des souches de Pneumocoque et d'*Haemophilus influenzae* responsables de méningites  
chez les enfants de 0 à 5 ans après l'introduction du Pentavalent et du Prevnar 13® au Mali**

---

## INTRODUCTION

La méningite est une inflammation des méninges et des espaces sous arachnoïdiens due à une bactérie, un virus ou un parasite. Les méningites bactériennes sont les plus fréquentes. Ce sont des maladies graves de par leurs complications (méningo-encéphalites, septicémies et choc hémodynamique) qui peuvent conduire éventuellement à la mort, surtout chez les enfants de moins de 5 ans lorsque la prise en charge n'est pas précoce et n'est pas adaptée ou laissant des séquelles graves définitives (pertes de l'audition, arriération mentale et paralysie entre autres). La méningite est cosmopolite, toutefois il existe une zone géographique bien précise appelée la « ceinture méningitique de Lapeyssonnie » en Afrique subsaharienne qui s'étend à l'ouest par le Sénégal et à l'est par l'Éthiopie où l'on a une prévalence élevée de la maladie. La méningite y apparaît sous forme épidémique tous les 10 ans (1).

Selon l'OMS, on estime que dans le monde, il survient 650 millions de cas d'infections à *Haemophilus influenzae type b* chez les enfants de 0 à 4 ans et 250.000 à 400.000 décès par an sont dus à *Streptococcus pneumoniae*. Environ 70% des cas de décès d'enfants par an par suite de pneumonie se trouvent en Afrique et au Sud-est asiatique (2). L'incidence annuelle est de 250 pour 100 000 chez les enfants de moins de 5 ans (3).

*Streptococcus pneumoniae* est l'agent de la pneumonie franche lobaire. Il est encore responsable des cas de méningite et de septicémie. *Haemophilus influenzae type b* est responsable de méningite tandis que les types non b sont généralement responsables d'infections respiratoires chez les enfants de moins de 5 ans.

Au Mali *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae type b* occupent une place importante dans les méningites bactériennes et sont actuellement les plus incriminés dans les méningites pédiatriques. Il existe un système de surveillance épidémiologique à travers tout le pays. Il existe 92 sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* qui ont été élucidés selon la classification danoise de Lund. Au Mali, il y a peu d'informations disponibles sur les sérotypes qui circulent dans le pays car peu d'études y ont été consacrées.

Le Mali, face au poids de la maladie et à la disponibilité des vaccins à l'instar d'autres pays de la ceinture méningitique, s'est engagé dans la dynamique de renforcer son Programme Elargi de Vaccination (PEV) de routine. Il s'agit d'offrir à chaque enfant malien une protection adéquate contre les maladies évitables par la vaccination notamment la méningite. Cette vaccination demeure le meilleur moyen de lutter contre la méningite. C'est ainsi que le vaccin anti-*haemophilus influenzae type b* a été introduit progressivement de 2005 à 2007, dans la

capitale Bamako, les chefs-lieux de régions ainsi que les districts sanitaires sur la base des recommandations issues d'une étude réalisée par le Centre pour le Développement des Vaccins (CVD – Mali) En 2011, le vaccin anti-pneumococcique a été introduit compte tenu de l'évidence du poids de la maladie d'une part et d'autre part l'efficacité démontrée du vaccin anti-pneumococcique à réduire de façon significative l'incidence des maladies invasives liées au *Streptococcus pneumoniae*. Le vaccin anti-haemophilus *type b* est administré chez l'enfant à partir de deux mois sous forme combinée avec le vaccin du tétanos, de la diphtérie, de la coqueluche et de l'hépatite virale B. Le vaccin anti-pneumococcique dénommé Prevnar 13® actuellement inclus dans le PEV contient 13 sérotypes de pneumocoque les plus fréquemment rencontrés ; il est lui aussi administré à partir de deux mois. En effet l'introduction de ces deux vaccins devrait contribuer à la réduction significative, voire une annulation du nombre de cas de méningite bactérienne due au pneumocoque et à *Haemophilus influenzae type b*, et ainsi donc contribuer à l'atteinte de l'un des Objectifs du Millénaire pour le Développement (OMD) notamment l'OMD 4 qui consiste à réduire de deux tiers le taux de mortalité des enfants de moins de cinq ans.

Vu cependant le nombre grandissant de nouveaux cas rapportés de *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae type b* par la surveillance épidémiologique, le sujet mérite de nouvelles attentions et des investigations poussées. La présente étude vise donc à s'assurer de l'aptitude des vaccins actuellement disponibles, à couvrir les sérotypes au Mali.

# PREMIÈRE PARTIE

## GENERALITES

## 1. GENERALITES SUR LA MENINGITE BACTERIENNE A PNEUMOCOQUE ET A HAEMOPHILUS

### 1.1. Définition

La méningite bactérienne est une inflammation des méninges et des espaces sous-arachnoïdiennes due à plusieurs agents bactériens.

### 1.2. Historique

Avant la mise au point des moyens diagnostiques, la méningite était vue comme une fièvre cérébrale, c'est à dire toutes les maladies entraînant une hyperthermie et une perturbation des fonctions cérébrales.

C'est en 1836 que la méningite cérébro-spinale a été décrite pour la première fois avec précision, à l'occasion de l'épidémie qui avait frappé une garnison des basses Pyrénées, et qui avait gagné, lors des déplacements de cette garnison, toutes les villes traversées.(4)

Il existe 3 agents bactériens fréquemment incriminés dans les méningites en général parmi lesquels nous nous intéresserons à deux : *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* qui touchent généralement beaucoup plus les enfants de 0 à 5 ans.

#### 1.2.1. *Streptococcus pneumoniae*

En 1880, Pasteur isole à partir de la salive *Streptococcus pneumoniae*. (5)

En 1886 Fraenkel et Weichselbaum effectuent une identification complète du pneumocoque et notamment une différenciation d'avec le pneumo-bacille de Friedlander (*klebsiella pneumoniae*).

En 1890, Quinke introduit la ponction lombaire comme moyen diagnostique et thérapeutique.

En 1893, le bactériologiste Wandremer décrivait le pneumocoque, le bacille d'EBERTH, et le staphylocoque comme étant les agents pathogènes des méningites purulentes.

En 1928 Griffith a montré qu'une souche R (rough) non capsulée et non pathogène pouvait être transformée en une souche S (smooth) capsulée et pathogène. (5)

En 1935, les sulfamides découverts par Domack ont été les premiers médicaments antibactériens qui ont transformé le pronostic vital et réduit le pourcentage de séquelles très fréquentes.

En 1938, Fleming découvre la pénicilline et son introduction thérapeutique est faite en 1941 (après les travaux de Florey et Chain).

En 1944 l'ADN est identifié comme le facteur transformant des pneumocoques par Avery, MacLeod et McCarty.

Dès 1948- 1949, le chloramphénicol s'est révélé comme un des antibiotiques les plus actifs, remarquable par son excellent pouvoir de diffusion dans les espaces sous-arachnoïdiens.

Quant à la vaccination, après de nombreux échecs et tâtonnements, elle a connu, durant les dernières années, des progrès décisifs avec la production de vaccins conjugués antipneumococciques contenant 23 et 13 sérotypes les plus fréquents.

En 2011, le vaccin conjugué PREVNAR13 a été introduit dans le PEV de routine au MALI.

### **1.2.2. *Haemophilus influenzae***

Au cours de la pandémie de grippe de 1889-1892, Pfeiffer a observé et cultivé à partir de crachat de patients grippés, un petit bacille, *Bacillus influenzae* et en a fait l'agent étiologique de la « grippe » ou « influenza ». Il a montré le rôle indispensable du sang pour la culture de cette bactérie et inventé la gélose au sang.

Quelques années plus tôt, en 1883 en Égypte par Koch, en 1886 par Weeks aux USA, a été observée puis cultivée dans l'exsudat de conjonctivites purulentes, une bactérie, le bacille de Koch-Weeks, signalé dans un traité de 1889 sous le nom de *Bacillus aegyptius*.

Le nom du genre *Haemophilus* a été proposé en 1917.

En 1930 Miss M. Pittman met en évidence l'existence de souches capsulées, propose des types sérologiques et montre la prédominance du type b dans les méningites et autres infections aiguës suppurées. (5)

Jusqu'en 1993, date de découverte de l'agent étiologique de la grippe, des doutes subsistaient à propos de *Haemophilus influenzae*, la bactérie suspectée d'être responsable de la grippe.

En 2005, le vaccin anti *Haemophilus b* a été introduit dans le PEV au Mali.

## **1.3. Habitat**

### **1.3.1. *Streptococcus pneumoniae***

Le pneumocoque est un hôte naturel des muqueuses de l'homme et de quelques mammifères. Il colonise dès les premiers jours de la vie, le rhino-pharynx à partir duquel, sous l'influence de différents facteurs (virulence du germe, diminution des défenses locales et humorales de l'hôte, dessèchement des voies respiratoires) il entraîne du fait de sa localisation, des infections avant tout respiratoires et ORL. Le taux de colonisation est très élevé à l'école

maternelle (40 à 60%) puis diminue avec un taux de 6% chez les adultes sans enfants et de 20 à 30% chez les adultes avec enfants(5).

Le germe réputé fragile survit peu de temps dans le milieu extérieur.

### **1.3.2. *Haemophilus influenzae***

Les *Haemophilus* sont des parasites obligatoires ; ils font partie de la flore normale des voies respiratoires supérieures et de la cavité buccale de l'Homme. Ils peuvent aussi être isolés dans le tube digestif et au niveau de la muqueuse vaginale.

La présence de souches capsulées y est habituelle. Seulement une faible proportion des individus sont porteurs asymptomatiques de *Haemophilus influenzae* type b au niveau du nasopharynx. (6)

## **1.4. Mode de contamination**

### **1.4.1. *Streptococcus pneumoniae***

C'est un germe transmis par voie aérienne : la transmission est presque toujours directe par l'intermédiaire des aérosols (gouttelettes de pflugge).

Il faut noter également la transmission par voies cutanéomuqueuse; il existe un pic en saison fraîche et sèche.

### **1.4.2. *Haemophilus influenzae***

La transmission se fait essentiellement par contact direct (sécrétion, salive). Lors d'épidémies dues à *Haemophilus influenzae* porteur d'une capsule, le taux de portage peut atteindre 50% chez les enfants d'une même collectivité (5).

## **1.5. Taxinomie et nomenclature**

### **1.5.1. *Streptococcus pneumoniae***

*Streptococcus pneumoniae* appartient au genre *Streptococcus*, à la famille des *Streptococcaceae*, ordre des lactobacillales, classe des bacilli. Ce genre comprend en l'état actuel des connaissances 44 espèces et sous-espèces, regroupées en trois ensembles : pyogènes, oraux et du groupe D. *S. pneumoniae* est inclus dans l'ensemble des streptocoques oraux qui constituent les streptocoques commensaux de la flore oro-pharyngée (alpha hémolytiques). Sur des critères de pathogénicité et d'identification pratique, les streptocoques oraux sont regroupés en 6 sous-ensembles (or1, or2, or3, or4, or5, or6). *S. pneumoniae* constitue à lui seul le sous-ensemble or3. (7, 8) Cependant, l'analyse génomique, notamment celle des séquences des acides ribonucléiques (ARN) ribosomiaux, montre une étroite

similitude entre *Streptococcus pneumoniae* et les espèces *Streptococcus mitis* et *Streptococcus oralis*. Ces trois espèces sembleraient capables d'échanger entre elles des fragments d'acide désoxyribonucléique (ADN) formant ainsi une mosaïque complexe, plutôt que trois espèces séparées (9).

### 1.5.2. *Haemophilus influenzae*

Le genre *Haemophilus* est placé dans la famille des *Pasteurelaceae* avec les genres *Pasteurella* et *Acinetobacillus* (10), ordre des *Pasteurelales*, classe des *Deltaproteobacteria*. *Haemophilus influenzae* est l'espèce-type du genre qui contient 15 espèces d'origine animale et humaine.

Parmi les 15 espèces décrites, 3 exigent les facteurs X et V, 2 n'exigent que le facteur X et 10 n'exigent que le facteur V.

**Tableau I** : Exigence en fonction des différentes espèces de *Haemophilus*

(11)

Souches d' <i>Haemophilus</i>	Facteur X	Facteur V
<i>H. influenzae</i>	+	+
<i>H. haemolyticus</i>	+	+
<i>H. aegyptius</i>	+	+
<i>H. ducreyi</i>	+	-
<i>H. heamoglobino-Philus</i>	+	-
<i>H. aphrophilus</i>	-	+
<i>H. segnis</i>	-	+
<i>H. paraphrophilus</i>	-	+
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+
<i>H. paraphrohaemolyticus</i>	-	+
<i>H. pleuropneumoniae</i>	-	+
<i>H. paracuniculus</i>	-	+
<i>H. parasuis</i>	-	+
<i>H. paragallinarum</i>	-	+
<i>H. avium</i>	-	+

*Haemophilus influenzae* type b est l'espèce qui a une grande importance dans les pathologies les plus fréquentes chez l'homme. Il existe 6 types d'*Haemophilus influenzae* de a à f dit typables; et d'autres non typables.

## 2. Données bactériologiques, biochimiques, immunologiques

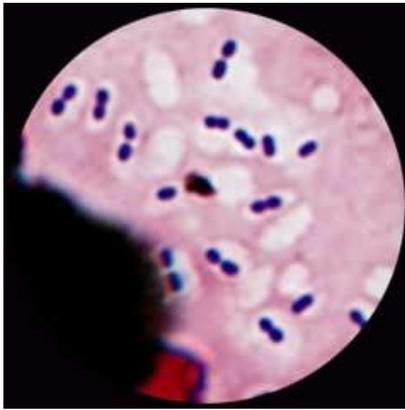
### 2.1. *Streptococcus pneumoniae*

#### 2.1.1. Caractères bactériologiques

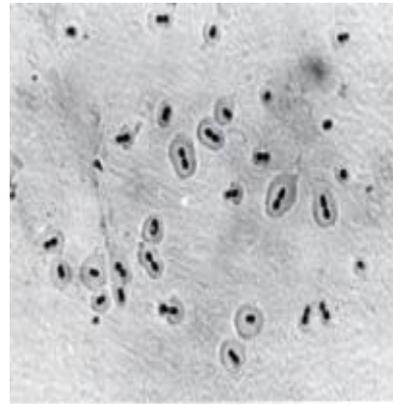
##### 2.1.1.1. Morphologie

Le pneumocoque est un coccus Gram positif (0.5 à 1µm) immobile qui peut :

- se regrouper en diplocoques ovoïdes capsulés.

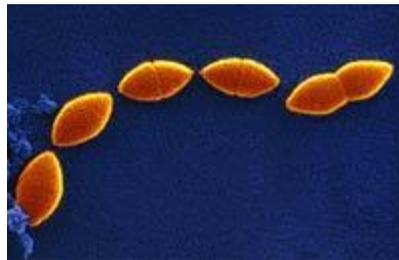


(a)



(b)

- se regrouper en diplocoques lancéolés, en flamme de bougie



(c)

(a) : Aspect en diplocoque *Streptococcus pneumoniae* après coloration au Gram

(b) : Aspect de la capsule de *Streptococcus pneumoniae*

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

**Figure 1: Morphologie de *Streptococcus pneumoniae* (12)**

### 2.1.1.2. Les souches de pneumocoque

Il existe 3 types de souches de pneumocoque:

- **Les souches non invasives**

Elles sont responsables d'un portage au long court sans aucune pathologie.

- **Les souches de virulence moyenne**

Elles sont responsables d'un portage court avec le déclenchement de la maladie associé à une pathologie déclenchant, le plus souvent viral.

- **Les souches sans portage ou souches virulentes invasives**

Elles sont responsables d'emblée d'infections. La diminution des moyens de défense de l'hôte est aussi un facteur essentiel. Il peut s'agir de :

- Déficit immunitaire (hypogammaglobulémie, déficit en IgA sécrétoire, immunodéprimés) ;
- Déficit en facteur du complément ;
- Déficit dans la phagocytose (sujets splénectomisés, neuroplégiques, maladies de Hodgkin, etc.) ;
- Les sujets fragilisés par suite d'anesthésie, par la vieillesse, les infections virales, l'alcool, les drogues etc. ... sont également des cibles privilégiées.

Les infections respiratoires sont habituellement suite à l'inhalation des bactéries virulentes colonisant les voies aériennes supérieures et à la multiplication tissulaire du pneumocoque au sein des alvéoles pulmonaires.

Les bactériémies vont apparaître soit secondairement à une atteinte pulmonaire, après destruction des cellules endothéliales capillaires ou par passage dans la circulation lymphatique de macrophages alvéolaires infectés, soit à partir du nasopharynx.

La rate joue un rôle très important dans l'élimination des pneumocoques présents dans le sang avec comme conséquence les septicémies foudroyantes observées chez les sujets splénectomisés.

Quant aux méningites elles pourraient être d'origine hématogène, mais c'est le passage direct à partir du nasopharynx qui semble le plus habituel, spontanément au cours d'une infection ORL, ou après une lésion post traumatique.

### 2.1.1.3. Caractères cultureux

*Streptococcus pneumoniae* est une bactérie présentant plusieurs caractères. Il est :

- Aéro-anaérobie facultatif.
- Exigeant, sa culture nécessite des facteurs de croissance.
- Il se multiplie à un pH optimum de 7.8 ; et une température de 25°C à 42°C permet la culture mais en routine la culture se fait entre 35-37°C. Les pneumocoques en routine sont sujets à une autolyse spontanée, il conviendra donc de chercher à limiter ce phénomène.

Les milieux de culture utilisés sont enrichis par exemple la gélose enrichie au sang de mouton à 5%. La culture est favorisée en atmosphère CO<sub>2</sub> à 5-10% ; dans ces conditions *Streptococcus pneumoniae* pousse facilement après 18 heures.

Dans ce milieu le germe développe une hémolyse de type alpha avec des colonies d'1 mm de diamètre à bord régulier et surface bombée. Les bactéries capsulées donnent un aspect S (*smooth*), les non-capsulées un aspect R (*rough*) et certains sérotypes un aspect muqueux. Les colonies s'aplatissent rapidement et prennent un aspect ombiliqué sous l'action d'autolysine. Ce phénomène d'autolyse impose en pratique des repiquages fréquents pour conserver la vitalité des souches(13).



Figure 2: Culture de *Streptococcus pneumoniae* sur gélose au sang(4).

## 2.1.1.4. Antibiotiques

### 2.1.1.4.1. Les antibiotiques sensibles

Les pneumocoques étaient initialement très sensibles à la pénicilline G. Les concentrations minimales inhibitrices de la pénicilline G sur les souches "sauvages" sont de l'ordre de 0,01 µg/ml (CMI ≤ 0,06 µg/ml), mais actuellement plus de 50% des souches de pneumocoque dites non invasives (isolées d'otites ou sinusites), et plus de 30% des souches invasives (isolées de sites habituellement stériles : sang, plèvre, LCR) ont une sensibilité diminuée à la pénicilline. Les souches de pneumocoque de sensibilité diminuée à la pénicilline sont dites de sensibilité intermédiaire lorsque les CMI de la pénicilline sont supérieures à 0,1 et inférieure à ou égales à 1 µg/ml ; et elles sont dites "résistantes à la pénicilline G" lorsque les CMI sont supérieures à 1 µg/ml.

La diminution de sensibilité des pneumocoques à la pénicilline G est liée à des modifications des protéines de liaison aux pénicillines (PLP). Selon que ces modifications touchent l'une ou l'autre des PLP, ou plusieurs PLP, la diminution de sensibilité concerne non seulement la pénicilline G, mais aussi d'autre bêta-lactamines : des pénicillines (comme l'amoxicilline), ou des céphalosporines (comme la ceftriaxone), et le niveau des CMI est d'autant plus élevé que le nombre de PLP modifiée est important. Il est donc obligatoire de tester la sensibilité des souches responsables d'infections sévères, telles que septicémie, pleuro-pneumopathie et méningites, pour ajuster le traitement antibiotique. En effet, les posologies de pénicilline G habituellement prescrites (10 à 20 Millions d' UI/24h) permettent de guérir une pneumonie et de juguler une septicémie en inhibant la multiplication des pneumocoques qui ensuite sont détruits ; mais, la quantité de pénicilline qui traverse la barrière pleurale ou méningée est insuffisante pour traiter efficacement une pleurésie ou une méningite due à une souche de pneumocoque résistante à la pénicilline G

Le pneumocoque est une espèce naturellement sensible à la plupart des antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram positif : bêta-lactamines, macrolides, tétracyclines, chloramphénicol, rifampicine, cotrimoxazole, glycopeptides.

Les antibiotiques de référence restent les bêta-lactamines.

La sensibilité des pneumocoques à la pénicilline G est mieux définie à l'aide d'un disque d'oxacilline 5 µg (OXA-5) selon les critères suivants :

- Diamètre OXA- 5 > 26 mm : souche sensible à la pénicilline G

Cette interprétation est prédictive de l'activité des autres β-lactamines

- Diamètre OXA-5 < 26 mm : souche Intermédiaire ou Résistante à pénicilline G

Ce test ne permet pas de distinguer les souches I (BNR, bas niveau de résistance) des souches R (HNR, haut niveau de résistance) à la pénicilline G, ni le niveau de résistance acquise, de façon croisée mais variable, aux autres β-lactamines.

La méthode des disques ne peut être utilisée pour déterminer valablement l'activité *in vitro* des β-lactamines sur les souches OXA-5 < 26 mm.

En cas d'infection sévère, d'échec clinique ou devant toute souche de sensibilité diminuée (OXA-5 < 26 mm), il y a lieu de déterminer la CMI de la pénicilline G et celle des β-lactamines dont les propriétés pharmacologiques sont compatibles avec une efficacité thérapeutique : amoxicilline, imipénème, céfuroxime, céfotaxime, ceftriaxone, céfépime, cefpirome.

Les concentrations critiques définies dans le tableau ci-dessous sont valables pour une administration par voie parentérale et, à titre provisoire, pour les formes orales d'amoxicilline et de céfuroxime.

L'interprétation des CMI (mg/l) se fait ainsi selon la société française de microbiologie, interprétation valable pour bacampicilline, métampicilline, pivampicilline

**Tableau II** : Interprétation des CMI de bêta-lactamines selon le CA-SFM

<i>Recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CASFM) β-lactamines : interprétation des concentrations minimales inhibitrices (CMI) (mg/l)</i>			
CMI	Sensible (S)	Intermédiaire (RI)	Résistante
<b>Peni G</b>	≤ 0,06 mg/l	0,12 mg/l ≤ CMI ≤ 1 mg/l	CMI > 1 mg/l
<b>Autres molécules</b>	≤ 0,5 mg/l	1 mg/l ≤ CMI ≤ 2 mg/l	CMI > 2mg/l

#### **2.1.1.4.2. Les antibiotiques résistants**

Comme tous les streptocoques, les pneumocoques sont résistants aux Aminosides, Acide fusidique, polymyxine, quinolone.

Un antibiogramme est donc indispensable devant tout échec thérapeutique lors d'une infection à pneumocoque avec étude des CMI aux différents bêta-lactamines en cas de sensibilité diminuée à la pénicilline (en particulier céfotaxime et ceftriaxone).

## 2.1.2. Caractères biochimiques

Le pneumocoque ne possède ni catalase, ni oxydase, ce qui induit l'accumulation de peroxyde d'hydrogène responsable en partie de son autolyse. Les autres caractères sont :

- Nitrate : négatif
- Gélatine : négatif
- Fermentation des sucres : acidification du glucose, lactose, du raffinose, du saccharose
- Esculine : négative
- Inuline : négative

Ces caractères ne sont guère recherchés pour l'identification du germe. L'inuline par contre, a servi à différencier le pneumocoque des autres streptocoques.

L'identification formelle du pneumocoque repose en routine sur quatre critères :

- La sensibilité à l'optochine, et en cas de doute
- La lyse par la bile ;
- La mise en évidence d'une capsule.
- Résistance à la bacitracine

## 2.1.3. Caractères antigéniques

### 2.1.3.1. Structure antigénique

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

Ce polysaccharide antigénique est à la base de la classification sérotypique des pneumocoques. Les sérotypes sont classés selon deux nomenclatures, une américaine et une danoise qui reste la plus couramment usitée. Dans la classification danoise, les sérotypes antigéniquement proches sont réunis en 46 sérogroupes numérotés de 1 à 48. Elle classe 90 sérotypes de pneumocoques. Ils sont tous potentiellement pathogènes pour l'homme.(14).Actuellement la classification danoise de Lund comprend 92 sérotypes capsulaires différents regroupés en 45 sérogroupes (**Tableau III**). En 2007, l'équipe de Park *et al.* décrit le sérotype 6C, un variant du sérotype 6A, par échange au niveau du polysaccharide capsulaire d'un résidu galactose par un résidu glucose (15).

En 2009, cette même équipe décrit un sérotype expérimental, le 6D, en modifiant génétiquement le sérotype 6B (transfert expérimental du locus du gène codant pour la glucosyltransferase du sérotype 6C sur un sérotype 6B) (16).

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

*Classification danoise des 92 sérotypes de Streptococcus pneumoniae*

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

Il existe 21 sérogroupes /sérotypes qui sont les plus fréquents

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

### **2.1.3.2. Facteurs de virulence**

Les facteurs majeurs de virulence de *Streptococcus pneumoniae* sont la capsule bactérienne et la pneumolysine. (17)

#### **2.1.3.2.1. La capsule bactérienne**

Le rôle de la capsule est fondamental. Seules les souches capsulées possèdent un pouvoir pathogène expérimental. Ce complexe polysaccharidique forme un gel hydrophile à la surface de la bactérie. La capsule permet à la bactérie d'échapper au système immunitaire de l'hôte en résistant à la phagocytose en l'absence d'anticorps spécifiques, en diminuant l'opsonisation et l'activation de la voie alterne du complément. Le degré de virulence dépend de la quantité de capsule produite et de sa composition.

##### **- Les antigènes capsulaires**

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

### **2.1.3.2.2. La pneumolysine**

Elle appartient à la famille des toxines thiol activables. Intra cytoplasmique, elle ne devient active qu'après libération dans le milieu extérieur par l'action d'une autolysine. Elle possède une activité cytotoxique directe vis-à-vis des cellules respiratoires et endothéliales. Sa capacité de liaison au fragment Fc des immunoglobulines et de fixation au fragment C1q du complément est responsable d'un effet pro-inflammatoire. C'est une cytolysine liée au corps bactérien et entraîne la lyse des globules blancs, globules rouges et plaquettes. Par ailleurs cette toxine réduit l'activité bactéricide des polynucléaires neutrophiles.

### **2.1.3.2.3. Autres substances biologiquement actives Les antigènes somatiques**

#### **- La substance C**

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

#### **- L'antigène R**

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

#### **- L'antigène M**

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

#### **- Les protéines PspA et PspC (pneucoccal surface protein)**

Ce sont des protéines de surface qui jouent un rôle dans la virulence par leur activité anti phagocytaire par inhibition de la voie alterne du complément.

Les autres facteurs n'agissent qu'après la lyse bactérienne. Parmi eux, les éléments de la paroi bactérienne induisent des réactions inflammatoires puissantes. Le peptidoglycane active la voie alterne du complément, les acides téichoïques permettent l'attachement aux cellules activées. Certaines protéines hydrolytiques cytoplasmiques (neuraminidase, hyaluronidase, immunoglobuline A1 protéase) contribuent aux phénomènes de colonisation et d'invasion systémique.

#### **- Acides teichoïques**

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

#### **- Neuraminidase**

Elle agit sur les acides sialiques (rôle dans les atteintes neuroméningées).

- **Autolysine**

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

- **IgA protéase**

C'est une enzyme protéolytique qui, spécialement, clive la région charnière de l'IgA humain qui domine le plus les surfaces muqueuses. Cette protéase est exprimée chez toutes les souches de streptocoques et joue un rôle majeur dans les résistances des pathogènes aux réponses immunes (18).

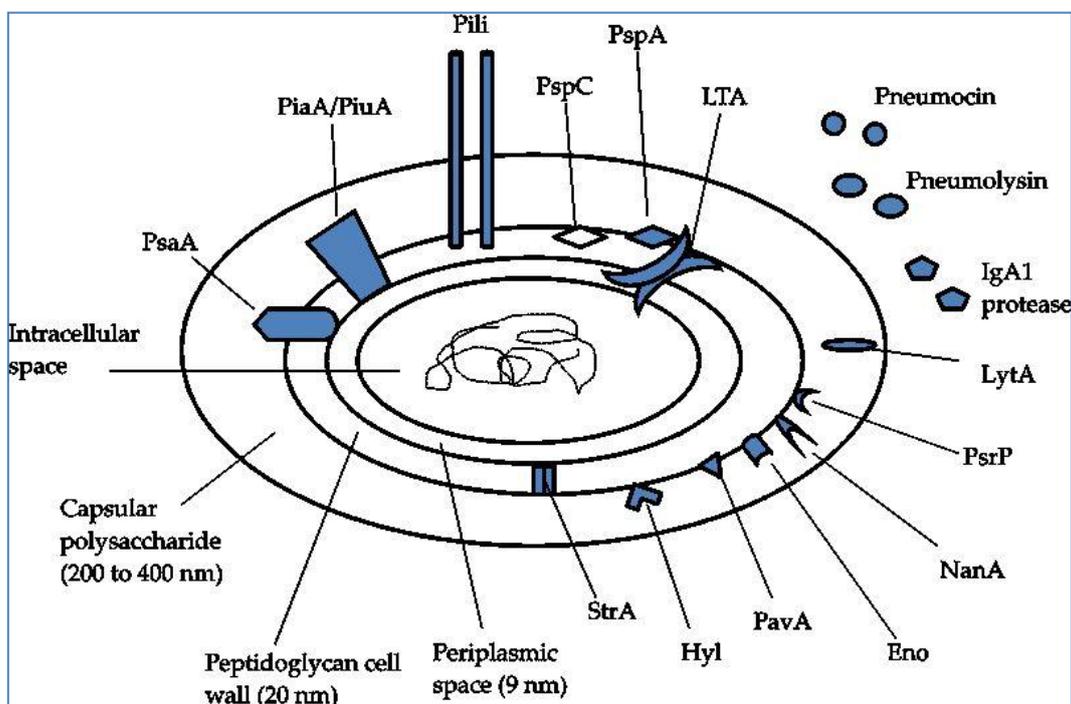


Figure 3 : Structure antigénique de *Streptococcus pneumoniae* (19) (20)

## 2.2. *Haemophilus influenzae*

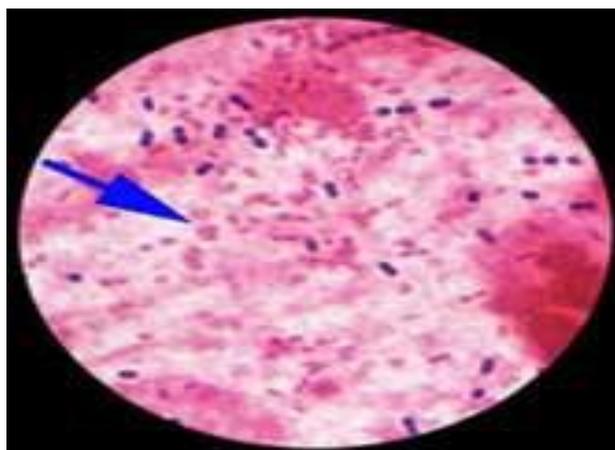
### 2.2.1. Caractères bactériologiques

#### 2.2.1.1. Morphologie

*Haemophilus influenzae* est un petit bacille (0,3 à 0,4 µm de diamètre et 1,5 µm de long), très polymorphe, souvent coccobacillaire, immobile non sporulé et parfois capsulé.

C'est un bacille à Gram négatif. Il se présente sous forme de bâtonnet le plus souvent groupés de manière assez caractéristique en petits amas, comparables à des bancs de poissons suivant le fil de l'eau(21).

Il peut prendre un aspect plus long, filamenteux, et certaines souches présentent des pili ou fimbriae qui confèrent à la bactérie les propriétés d'adhérence aux cellules épithéliales et l'agglutination des hématies humaines(22).



**Figure 4:** Coloration de Gram d'*Haemophilus influenzae* type b

En microscopie électronique, sa paroi est formée de trois couches et présente la structure typique des bacilles à Gram négatif (5).

#### 2.2.1.2. Caractères cultureux

Le genre *Haemophilus* est aéro-anaérobie facultatif et pousse entre 27°C et 43°C, l'optimum étant observé à 37°C. Il exige pour sa croissance la présence de sang, d'hémoglobine, d'extraits globulaires, de gélose au chocolat et de vitamines. Le sang frais n'est pas propice à sa culture du fait de la présence d'inhibiteur du NAD. Sa culture est faite sur gélose au sang cuit. C'est un germe fragile, dont la croissance est favorisée également par une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>. Les colonies qui apparaissent après 24h de culture sont grisâtres, translucides de 0,5-1mm de diamètre, lisses et légèrement convexes.

Les souches capsulées produisent des colonies tendant à confluer dans les zones où la croissance est dense, contrairement aux souches non capsulées.

#### **2.2.1.2.1. Les facteurs de croissances**

Le genre *Haemophilus* exige pour sa croissance deux facteurs présents dans le sang et dans les tissus :

##### **- Le facteur V**

Il est thermolabile, constitué par soit du NAD (nicotinamide adénine dinucleotide) ou DPN (diphosphonucléotide) ou coenzyme I, soit du NADP (NAD-phosphate) ou TPN (triphosphonucléotide) ou coenzyme II (23) .

Ce sont des coenzymes, des déshydrogénases qui sont présentes dans les globules rouges, dans les tissus d'animaux et végétaux, et chez la plupart des bactéries.

##### **- Le facteur X**

Il est thermostable, est constitué par l'hémine (ou hématine) qui est un composé tétrapyrrolique contenant du fer, dérivé de l'hémoglobine et des enzymes de la chaîne respiratoire (cytochrome, catalase, peroxydase). En présence de fer, l'hémine peut être remplacée par la protoporphyrine. (24)

#### **2.2.1.2.2. Milieux de culture**

##### **- Le milieu de levintal**

Il est préparé à partir de sang de cheval défibriné dont les globules rouges sont lysés par choc osmotique et congélation ou par chauffage. La solution stock de Levinthal est utilisée avec un bouillon nutritif ou incorporé à un milieu gélosé et permet d'obtenir un milieu transparent.

##### **- Le milieu de Fildes**

Il est également employé ; il sera ajouté à la gélose une digestion peptique de sang. Il s'agit d'une solution préparée à partir de globules rouges de mouton et contenant les facteurs V et X. Cette solution est incorporée aux milieux liquides et solides habituels à la concentration de 1 à 2% et permet de préparer un milieu transparent (21, 25, 26).

- **La gélose au sang**

L'addition de 5% de sang de cheval à un milieu nutritif permet une culture visible mais pauvre en *Haemophilus influenzae* en raison de la faible teneur en facteur V.

Le phénomène de satellitisme peut être mis en évidence sur la gélose au sang. Des résultats satisfaisants sont obtenus avec le sang de cheval, de lapin, de rat ; par contre le sang de mouton ne permet pas la culture de *Haemophilus influenzae*, en raison de l'absence de libération spontanée de NAD et de NADP par les globules rouges de mouton associée à une forte activité enzymatique hydrolytique de NAD et de NADP.



**Figure 5:** Exemple d'aspect des colonies de *Haemophilus influenzae* sur gélose au sang frais.  
(27)

Les colonies de *Haemophilus influenzae* sont presque invisibles sur gélose au sang frais par insuffisance en facteur de croissance V.

- **La gélose au sang cuit**

Le chauffage à 75°C transforme la gélose au sang frais en gélose au sang cuit de couleur chocolat (d'où le terme de «chocolate agar» des anglophones). Le chauffage libère le facteur V des globules rouges et inactive les enzymes hydrolysant le NAD présent dans le sang. Le chauffage ne doit pas être trop poussé pour éviter de dénaturer le facteur V. Les géloses au sang cuit préparées avec le sang du cheval, du lapin, ou du mouton, contiennent 33 à 53mg/l de NAD et NADP et conviennent parfaitement, de même que la gélose préparée avec du sang humain.



Avant ensemencement

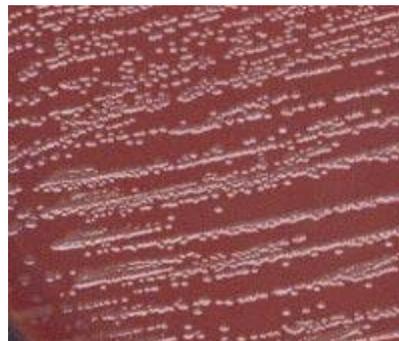
Après ensemencement

**Figure 6** : Exemple d'aspect d'*Haemophilus influenzae* ensemencé sur la gélose au sang cuit.(27)

- **La gélose chocolat poly vitex (PVX)**

Ce milieu correspond, dans la «cuisine » française et américaine, à un milieu nutritif complexe contenant de l'hémine mais pas de NAD.

Il doit être supplémenté en facteur V et X sous forme d'extrait de levure, de NAD ou d'un mélange d'enrichissement chimique défini(21).



**Figure 7**: Exemple d'aspect de *Haemophilus influenzae* sur une gélose chocolat au PVX après 24h d'incubation à 37°C. (27)

### **2.2.1.3. Antibiotiques**

#### **2.2.1.3.1. Les antibiotiques sensibles**

*Haemophilus influenzae* est une espèce naturellement sensible à de nombreux antibiotiques tels que les bêta-lactamines, les aminosides, les tétracyclines, le chloramphénicol, la rifampicine, les quinolones, les sulfamides, les synergistines. La sensibilité aux céphalosporines de première génération, aux macrolides est inconstante.

#### **2.2.1.3.2. Les antibiotiques résistants**

Il existe néanmoins une résistance notamment par production de bêta-lactamases. Cette production confère la résistance aux amino - carboxy et uréido-pénicillines. L'activité de ces bêta-lactamines est restaurée lors de l'association avec un inhibiteur de bêta-lactamase.

Ainsi en thérapeutique les antibiotiques standards utilisés sont : l'amoxicilline associé à l'acide clavulanique, la tétracycline, le cotrimoxazole.

D'autres molécules utilisables en thérapeutique non incluses dans cette liste en raison de l'absence actuelle de critères d'interprétation spécifiques et/ou de mécanisme de résistance responsable d'échec clinique sont les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération et les fluoroquinolones.

Le test des macrolides n'est pas justifié dans la mesure où *Haemophilus influenzae* apparaît généralement intermédiaire aux molécules avec un cycle à 14 et 15 atomes, et résistant aux molécules avec un cycle à 16 atomes et aux lincosamides.

Le chloramphénicol, la rifampicine, le kanamycine, la gentamicine peuvent également être testés.

### **2.2.2. Les caractères biochimiques**

L'étude des caractères biochimiques (Uréase, ornithine décarboxylase ou ODC et production d'indole) permet de connaître le biotype et des réactions d'agglutination sur lame en présence de sérums spécifiques servant à reconnaître le sérotype si la souche est capsulée (21, 28). Il existe 8 biotypes (I à VIII) qui ont été définis pour l'espèce *Haemophilus influenzae* à partir des caractères métaboliques suivants : production d'indole, activité enzymatique uréase et ornithine décarboxylase. Le biotype I est le plus fréquemment retrouvé dans les méningites, et le biotype II dans les infections broncho-pulmonaires et otites. Le biotype VI est plus retrouvé dans les infections génitales. Ces trois biotypes sont les plus fréquents dans les infections

humaines. *Haemophilus influenzae* possède une catalase et une oxydase. Il fermente le glucose, le maltose, le ribose et la xylose mais pas le lactose ni le saccharose.

**Tableau IV:** Activités biochimiques de *Haemophilus influenzae*

Activités biochimiques	<i>Haemophilus influenzae</i>
Synthèse des porphyrines	-
Exigence en facteurs	+
Hémolyse	-
Acidification	+
D-fructose	-
Saccharose	-
Lactose	-
D-xylose	+
D-ribose	+
D-Manose	-
D-Galactose	+
Maltose	+
Mélibiose	-
Tréhalose	-
Raffinose	-
H <sub>2</sub> S	-
Hémagglutination	-
Besoins en CO <sub>2</sub>	-
Phosphatase alcaline	+
Oxydase	+
Catalase	+
Uréase	+
Indole	+

### 2.2.3. Les caractères antigéniques

Le sérotypage de *Haemophilus influenzae* repose sur l'étude de structure antigénique de la capsule du même germe (29).

#### 2.2.3.1. La capsule

Les souches de *Haemophilus influenzae* dépourvues de capsules ne peuvent pas être serotypés.

Il existe six variétés antigéniques (a, b, c, d, e, f) qui ont été décrites par Pitt Man en fonction de la structure antigénique de la capsule du germe (11).

La spécificité de type dépend de la composition en polysaccharide de la capsule. Différents sucres ont été individualisés : glucose, ribitol, ribose, galactose, acide mannuronique.

Seul le type b, constitué de polyribosyl ribitol phosphate (PRP) à une structure composée de deux riboses. L'association fréquente entre sérotypes b et biotype I semble être la conséquence de la diversité génétique limitée (clonalité) des *Haemophilus influenzae* de type b. La grande majorité des pathologies invasives chez l'enfant (méningites, épiglottites, arthrites, septicémies) est due aux souches capsulées de type b en raison du rôle majeur du PRP comme facteur de virulence. Cette plus grande virulence du type b est attribuée à sa plus grande résistance à l'activité bactéricide du complément et permet une survie et une multiplication des germes dans le sang. Le PRP est antigénique, obtenu sous forme purifiée et couplé à une protéine le rendant lymphocyte-dépendant, il est utilisé dans le vaccin anti-*Haemophilus*.

#### 2.2.3.2. La Membrane externe

Comme tous les bacilles à Gram négatif *Haemophilus influenzae* possède une membrane externe constituée de protéines, de porines, de phospholipides, et de lipo-oligosaccharides (LOS). Les LOS sont constitués de lipide A. C'est la lyse des LOS avec libération des lipides A qui sont responsables du choc septique à *Haemophilus influenzae*.

Les protéines des membranes externes (PME), très immunogènes, représentent les facteurs de virulence chez les souches de *Haemophilus influenzae*, en particulier les souches non capsulées, avec une très grande hétérogénéité des protéines. L'analyse électrophorétique des protéines des membranes externes permet de distinguer 20 protéines avec 4 à 6 protéines principales de poids moléculaires compris entre 16 000 à 50 000 daltons. Ces protéines sont le constituant majeur des antigènes de surface. Il existe une très grande hétérogénéité des PME

de souches de *Haemophilus influenzae* non typables par rapport aux souches de *Haemophilus influenzae* de type b. Ceci suggère une grande diversité génétique des souches non typables par rapport aux souches de type b qui appartiennent à un nombre limité de clones. L'analyse des protéines de profil protéinique de membrane externe qui correspondent au sous-type OMP est plus précise que l'étude des biotypes. Ainsi à un même biotype, il correspond un seul sérotypes. A l'intérieur du sérotipe b, certains sous-types seraient plus virulents que d'autres. Ainsi les souches de *Haemophilus influenzae* type b sous-type I-C ont été plus fréquemment retrouvées dans les méningites du nourrisson (29) (30).

### **2.2.3.3. Le Pili ou fimbriae**

La présence de pili ou fimbriae, mise en évidence chez *Haemophilus influenzae*, confère à la bactérie des propriétés virulentes notamment l'adhésion à la muqueuse nasopharyngée, étape précédant l'invasion sanguine et méningée.

Leur rôle n'apparaît pas obligatoirement dans la colonisation de la muqueuse ni dans la phase d'invasion ultérieure s'accompagnant de la perte de pili. Les pili interviennent dans la phase polysaccharidique de type b. Cette adhésion est de faible affinité et la persistance de la colonisation serait liée à la présence de fibrilles, ayant une structure différente de celle des pili.

Chez *Haemophilus influenzae* type b, la présence de pili permet de définir 5 sérotypes sur la base de différence d'antigénicité de la molécule de piline.

Pour *Haemophilus influenzae* type b, les souches isolées du LCR et du sang sont le plus souvent dépourvues de pili contrairement à celle isolées dans le rhinopharynx.

### **2.2.3.4. Les caractères liés au gène**

L'étude de toutes les espèces d'*Haemophilus* montre une grande hétérogénéité avec des valeurs variant entre 37 à 44 Moles. Les études par hybridation confirment cette hétérogénéité et certains gènes apparaissent très éloignés du genre *Haemophilus*, comme *Haemophilus ducreyi* et certaines sont d'origine animale.

Ces résultats remettent en question les bases de la classification, en particulier l'exigence en facteur X et /ou V pour l'appartenance au genre *Haemophilus*.

### **2.2.3.5. La transformation**

Différents mécanismes de transfert ont été observés chez les espèces *Haemophilus*. La transformation utilisant la synthèse de la capsule comme marqueurs génétiques a été très tôt décrite. Des gènes de résistance aux antibiotiques (chromosomiques et plasmidiques) sont transférables par transformation.

La transformation a été utilisée pour la construction d'une carte génétique de *Haemophilus influenzae*. La possibilité de fabriquer des souches par chaque type capsulaire permet d'étudier le rôle de la capsule et des différents composants bactériens dans la virulence.

### **2.2.3.6. La bactériophagie**

Différents bactériophages actifs sur *Haemophilus influenzae* ont été décrits (HP1, HP3, SP et N3). Les souches capsulées sont sensibles aux phages HP1, les variantes non capsulés de ces souches deviennent sensibles comme le sont les souches non typables.

En raison de la présence d'un système de restriction- modification très complexe (plus d'une vingtaine d'enzymes isolées) et de l'existence des souches lysogènes, aucun système de lysotypie n'a été mis au point pour les différentes espèces de l'*Haemophilus*.

### **2.2.3.7. Les plasmides**

Des plasmides de résistance aux antibiotiques ont été décrits. Chez *Haemophilus influenzae*, les plasmides portant un ou plusieurs caractères de résistances aux antibiotiques (ampicilline, chloramphénicol, kanamycine, tétracycline) sont de différentes tailles : les plasmides de petite taille (3,5 méga daltons), non transférables, relativement rares, ayant des séquences d'homologie avec des plasmides de gonocoque et les plasmides transférables de 30 à 40 méga daltons.

Le transfert est possible par la transformation et la conjugaison entre des souches de *Haemophilus* de même genre et de genres différents. Certains plasmides de *Haemophilus* ont une parenté avec des plasmides de *Neisseria* et d'entérobactéries.

### **3. Physiopathologie**

#### **3.1. *Streptococcus pneumoniae***

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

##### **3.1.1. Les pathologies pulmonaires**

###### **3.1.1.1. La pneumonie franche lobaire aiguë**

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

###### **3.1.1.2. Les infections broncho-pulmonaires**

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

##### **3.1.2. Les méningites purulentes**

À partir d'un site infectieux ORL ou pulmonaire, le pneumocoque doit passer la barrière hémato-méningée et produire une inflammation pour entraîner une méningite purulente. De nombreux arguments sont en faveur d'une induction de bactériémies intenses et prolongées permises par la capacité du pneumocoque à survivre dans le sang. Ces bactériémies rendent possibles un ensemencement du liquide céphalorachidien (LCR) par voie hématogène(31). Dans le LCR, les moyens de défense sont limités et le pneumocoque va pouvoir entraîner une méningite, essentiellement par une réaction inflammatoire polynucléaire-dépendante. La présence de pneumocoques vivants ou d'éléments de sa paroi déclenche la production *in situ* de cytokines. L'action synergique du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF  $\alpha$ ) et de l'interleukine 1 entraîne un afflux de polynucléaires neutrophiles et un relâchement des jonctions serrées de l'endothélium des capillaires cérébraux avec baisse de l'étanchéité de la barrière hémato-encéphalique. L'altération de la barrière entraîne un œdème cérébral qui persiste même après stérilisation du LCR et l'afflux de polynucléaires neutrophiles. L'hypertension intracrânienne secondaire à l'œdème cérébral et une possible vascularité avec thrombose contribuent à l'anoxie cérébrale (32).

Les méningites purulentes à pneumocoque touchent surtout les enfants et les personnes de plus de 60 ans. Elles peuvent être primitives ou secondaires à un foyer ORL, une fracture du

rocher. Le début et l'évolution peuvent être parfois foudroyants avec 30% de décès. Il se produit une réaction leucocytaire franche à polynucléaires neutrophiles.

### **3.1.3. Les otites moyennes aiguës**

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

## **3.2. *Haemophilus influenzae***

*Haemophilus influenzae* est une bactérie pyogène responsable d'infections variées, plus sévères chez les enfants ou les sujets fragiles. Il convient de distinguer les infections aiguës avec bactériémies occasionnées par des souches invasives, capsulées, (du type b le plus souvent) et les infections aiguës ou chroniques, sans bactériémie, provoquées par des souches non capsulées.

### **3.2.1. Pouvoir pathogène expérimental**

La souris inoculée par voie intra péritonéale meurt rapidement d'une septicémie. Cette aptitude à tuer la souris peut être perdue par des souches qui sont dépourvues de capsule.

### **3.2.2. Pouvoir pathogène naturel**

Bien qu'il ne soit pas l'agent pathogène de la grippe, *Haemophilus influenzae type b* a reçu son nom *influenzae* et est souvent rencontré comme agent essentiel de surinfections, bronchites aiguës et chroniques, d'infections primaires de la sphère ORL comme les rhinopharyngites, les otites, les conjonctivites, et beaucoup plus rarement les épiglottites.

#### **3.2.2.1. Chez le nourrisson et l'enfant**

Les infections à *Haemophilus influenzae b* sont provoquées pendant la période néonatale par les souches non capsulées. Après l'âge de 2 mois les manifestations invasives sont presque toujours dues à des souches capsulées de sérotype b, biotype I.

##### **3.2.2.1.1. Les souches capsulées**

Sont responsables de :

- **Méningites**

Elles sont très souvent précédées d'infections des voies respiratoires supérieures ou oto-rhino-laryngologiques et accompagnées d'un état septicémique. Elles sont surtout observées chez le nourrisson âgé de 3 à 30 mois.

#### - Epiglottites

Elle frappe des enfants plus âgés entre 2 à 7 ans. Elle donne lieu à un tableau clinique dramatique, de survenue brutale associant les signes généraux de septicémies et de graves difficultés respiratoires. On observe aussi des états septicémiques fébriles accompagnés ou non de signes de localisations : arthrite, otite, ostéite, ostéomyélite, cellulite, péricardite, pneumonie, orchi-épididymite

#### 3.2.2.1.2. Les souches non capsulées

Elles sont réputées non invasives et sont isolées au cours d'infections diverses :

- Otites moyennes aiguës et autres infections de la sphère oto-rhino-laryngologie,
- Infections broncho-pulmonaires et conjonctivites.

Une contamination pendant l'accouchement peut être à l'origine d'une infection néonatale généralisée sévère.

Le terrain va jouer un rôle prédominant dans la survenue de l'infection à *Haemophilus influenzae* type b.

#### 3.2.2.2. Chez l'adulte

Ce sont surtout des souches non capsulées qui sont responsables d'infections ; les manifestations respiratoires sont les plus fréquentes et donnent lieu à des broncho-pneumonies compliquant une bronchite chronique ou à des pneumonies avec parfois septicémie. Les méningites et d'autres manifestations invasives à *Haemophilus* sont rares chez l'adulte et surviennent surtout chez les sujets âgés et les immunodéprimés(33).

D'autres localisations peuvent être rarement observées : articulaires, osseuses, oto-rhino-laryngologiques, oculaires, urinaires et génitales (cause d'infection du nouveau né au cours de l'accouchement).

## 4. DIAGNOSTIC

### 4.1. Diagnostic clinique

Le diagnostic clinique se fait par constatation de signes cliniques variant selon l'âge du malade. Les symptômes les plus fréquemment rencontrés sont : raideur de la nuque, fièvre élevée, photophobie, état confusionnel, violentes céphalées ainsi que vomissements.

#### 4.1.1. Définition de cas

##### 4.1.1.1. Cas présumé

Est présumée être atteinte de la méningite toute personne présentant une fièvre soudaine (température rectale  $>38,5^{\circ}\text{C}$  ou axillaire  $>38,0^{\circ}\text{C}$ ) et l'un des signes suivants : raideur ou hypotonie de la nuque, ou tout autre signe d'atteinte méningée (bombement de la fontanelle, convulsions ou autres signes méningés (34).

##### 4.1.1.2. Cas probable

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

##### 4.1.1.3. Cas confirmé

Il ya confirmation chaque fois qu'il ya isolement ou identification de l'agent pathogène causal (*Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* b) dans le LCR d'un cas présumé ou probable, par culture, amplification PCR ou test d'agglutination (34).

### 4.1.2. Diagnostic chez le grand enfant

Le diagnostic est en général « facile » devant :

- Des signes infectieux, avec une fièvre à début le plus souvent brutal survenant parfois aux détours d'un épisode infectieux des voies aériennes supérieures (rhinopharyngite ou otite)
- Des signes évocateurs d'une atteinte méningée : céphalées, vomissements et/ou refus alimentaire, photophobie.

L'examen recherche les deux signes de la contracture d'origine méningée :

- **La raideur de la nuque** : flexion de la nuque douloureuse et limitée alors que les mouvements de latéralité restent possibles,

- **Le signe de Kernig** : Flexion sur le tronc des membres inférieurs maintenus en extension, entraînant une flexion invincible des jambes sur les cuisses.
- **Le signe de Brudzinski** : se caractérise par la douleur et la raideur majorées par le maintien des jambes en extension.

### 4.1.3. Diagnostic chez le nourrisson

Le diagnostic est beaucoup plus difficile ; il est évoqué devant :

- Un enfant grognon, geignard, ayant des cris à la mobilisation (hyperesthésie cutanée) ou des modifications du comportement ;
- Une somnolence inhabituelle entrecoupée de périodes d'agitation insolite, non calmées dans les bras de la mère ;
- Un refus répété de s'alimenter;
- Des convulsions fébriles même brèves et apparemment isolées.

A l'examen, il convient d'apprécier en premier lieu l'existence :

- D'une tension de la fontanelle, au mieux identifiée en position assise et en dehors des cris ;
- D'une hypotonie de la nuque ou une raideur anormale à la mobilisation du rachis avec rejet de la tête en arrière ;
- Des signes neurologiques de localisation.

Il faut aussi évaluer la coexistence de signes d'infections associées des voies aériennes respiratoires hautes (otite moyenne aiguë) ou basses (foyer pulmonaire).

## 4.2. Diagnostic biologique

### 4.2.1. Modalités de recueil du LCR

Le prélèvement du LCR se fait habituellement par ponction lombaire (PL).

Dès les premiers signes cliniques de la maladie, le LCR est prélevé par ponction lombaire entre le 3<sup>ème</sup> (L3) et 4<sup>ème</sup> (L4) ou entre le 4<sup>ème</sup> (L4) et le 5<sup>ème</sup> (L5) vertèbre lombaire (**figure 8**). Le malade est soit en position assise en faisant le dos rond, soit couché sur le côté, les genoux fléchis et le dos en arc pour étirer la région lombaire. Il est recouvert de champs opératoires, la zone de la colonne lombaire est désinfectée. L'espace entre les vertèbres L3 et L4 est palpé avec l'index recouvert d'un gant stérile.

L'aiguille à ponction lombaire est dirigée avec précaution entre les apophyses épineuses, à travers les ligaments inter-épineux dans le canal médullaire.

Après le passage du ligament vertébral postérieur, le mandrin de l'aiguille est retiré et le LCR est prélevé dans le tube stérile pour étude bactériologique, cytologique et biochimique. Après la PL le patient devra rester en décubitus dorsal pendant douze heures afin d'éviter des céphalées. La quantité doit être suffisante (3 ml en moyenne).

Exceptionnellement, chez le nouveau-né, le prélèvement peut se faire par ponction transfontanelle ou par ponction ventriculaire directe.

L'indication d'une PL est posée dans différents contextes :

- . Syndrome méningé;
- . En cas d'infection materno-fœtale, pour éliminer toute atteinte méningée secondaire.
- . Une PL de contrôle est parfois recommandé 36 à 48h après le début de l'antibiothérapie, pour en vérifier l'efficacité. Un retard de stérilisation du LCR est associé à la survenue de séquelles neurologiques comme c'est surtout le cas des méningites à pneumocoque de sensibilité diminuée aux beta-lactamines, et des méningites néonatales.

Une PL de contrôle est également préconisée en cas de méningites néonatales, 48h après la fin du traitement (35).

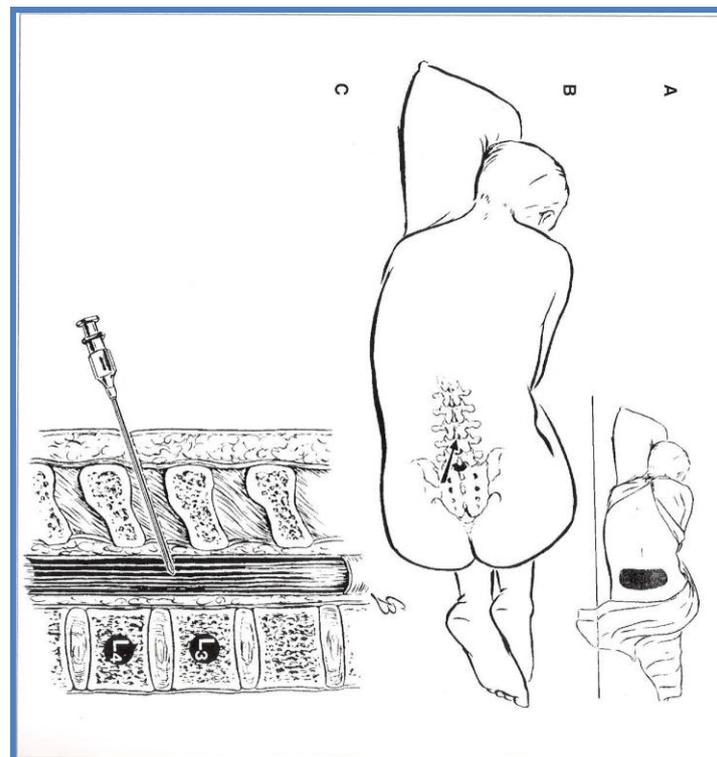


Figure 8: Position de patient et site de la ponction lombaire

#### 4.2.2. Outils de collecte et de transport des échantillons

Du fait de l'importance du diagnostic, de la fragilité des bactéries à tout écart de température et en raison de la lyse rapide des polynucléaires, le LCR aussitôt prélevé, doit être acheminé au laboratoire pour analyse à l'abri de la chaleur. Il ya 3 types d'outils de collecte : les cryotubes, le tube sec et le T-I. Ces derniers sont les plus couramment utilisés.

##### 4.2.2.1. Tube sec

Dans le tube avec fermeture à vis le LCR est recueilli et transporté en moins d'une heure au laboratoire.

##### 4.2.2.2. 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 primaire, de conservation et de transport. Une fois que le Trans-Isolate est inoculé, le transport de l'échantillon doit se faire à la température ordinaire.

##### 4.2.2.3. Cryotube

Lorsque le LCR ne peut pas parvenir au laboratoire en moins d'une heure, il est mis dans le cryotube et transporter réfrigéré pour la confirmation par PCR.

#### 4.2.3. Démarche diagnostique

##### 4.2.3.1. En routine

###### 4.2.3.1.1. Examen macroscopique

La première étape de l'analyse consiste à observer l'aspect du LCR. Le LCR normal est limpide et classiquement dit "eau de roche". Différents aspects pathologiques peuvent être observés :

- Aspect trouble

Il se caractérise par la présence d'environ 200 éléments cellulaires /mm<sup>3</sup>. Le LCR peut être louche ou purulent.

- Aspect xanthochromique : caractérisé par une coloration jaune du LCR due à la transformation de l'hémoglobine

- Aspect hématique voire hémorragique : En cas de PL hémorragique, l'aspect xanthochromique du LCR après centrifugation peut témoigner d'une hémorragie méningée ancienne.

#### **4.2.3.1.2. Culture**

Les milieux utilisés sont la gélose au sang frais et la gélose chocolat enrichi d'un supplément vitaminique, incubée en atmosphère de CO<sub>2</sub> de 5 à 10 % pendant 24 à 48 heures. Elle permet d'obtenir des colonies caractéristiques des espèces bactériennes. Il sert à l'identification de l'espèce et la réalisation de l'antibiogramme voire la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et une éventuelle recherche d'enzyme de résistance ( $\beta$ -lactamase)(38). Une culture positive ne peut être obtenue que lorsque le germe dans le LCR est vivant.

#### **4.2.3.1.3. Examen microscopique**

##### **- Coloration de Gram**

C'est un élément essentiel du diagnostic car permet la mise en évidence des bactéries et d'en préciser leur aspect caractéristique dans le LCR. 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, de 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. La coloration de Gram en fonction de la morphologie observée (caractéristique de *S. pneumoniae* ou *H. influenzae*) donne une orientation sur le milieu de culture à ensemencer. La méningite bactérienne étant une urgence médicale, les résultats préliminaires de la coloration de Gram permettent d'orienter la prise en charge(37).

##### **- Cytologie**

Elle est réalisée par la technique de numération avec la cellule de Malassez ou de Nageotte. Elle permet d'évaluer le nombre d'éléments nucléés et d'hématies par mm<sup>3</sup>. En dehors de la période néonatale, le LCR a une cellularité comprise entre 3 et 5 éléments/mm<sup>3</sup>. Elle doit être réalisée rapidement puisque l'on considère que les polynucléaires neutrophiles sont lysés à 32% en 1 heure et à 50% en 2 heures. Généralement en cas de méningite bactérienne non

tuberculeuse le nombre de polynucléaires neutrophiles augmentent dans le LCR et peut dépasser  $10/\text{mm}^3$ (36).

#### **4.2.3.1.4. 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(39).

#### **4.2.3.1.5. 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(39).

#### **4.2.3.2. Biologie moléculaire**

Elles permettent une identification des séquences d'acide nucléiques et 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 :

##### **4.2.3.2.1. La PCR classique et la PCR en temps réel**

Elles ont permis d'améliorer considérablement le diagnostic de la bactériologie classique en routine et sont utilisées pour l'identification d'espèce, le groupage et le typage des souches. Elles sont basées sur les techniques conventionnelles d'amplification par PCR ; et sont disponibles dans les laboratoires nationaux de références.

##### **4.2.3.2.2. Les MLST**

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

## 5. TRAITEMENT

### 5.1. Prophylaxie

#### 5.1.1. Prévention de la transmission

La prévention repose sur le changement des facteurs comportementaux et environnementaux.  
(40)

##### 5.1.1.1. Préventions de base en cas d'épidémie de méningite

- **Hygiène**
  - Se laver 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 vaccination constitue le meilleur moyen de prévenir les cas de méningite et elle reste une priorité en raison de la gravité des infections sur les terrains fragilisés et de l'augmentation de la résistance des germes aux antibiotiques.

#### 5.1.2. Prévention par la vaccination

##### 5.1.2.1. *Streptococcus pneumoniae*

Pour prévenir ou minimiser les infections à pneumocoque, des vaccins antipneumococciques administrables chez le nourrisson sont disponibles. Ces vaccins protègent contre 7 sérotypes (vaccin à 7 valences), 13 sérotypes (13 valences, cas du **Prevnar 13®**) et 23 sérotypes (cas du **Pneumo 23**).

##### 5.1.2.1.1. Prevnar 13®

C'est le vaccin utilisé dans le cadre du programme élargi de vaccination (PEV) au Mali depuis 2011. Ce vaccin contient 13 sérotypes pneumococciques : 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23 F conjugué à la protéine vectrice de *Corynebacterium diphtheriae* CRM197. Il assure une couverture vaccinale théorique chez 77% pour les méningites, 84 % pour les bactériémies à pneumocoques, et plus de 90 % pour les pneumococcies à pneumocoques résistants à la pénicilline.

Au Mali ce vaccin est recommandé dans le PEV de routine dès l'âge de deux mois et le

calendrier est adapté aux enfants de moins de 6 mois. Il est administré en même temps que le vaccin pentavalent, mais en un autre point d'injection(27). Il est administré par voie intramusculaire et doit être conservé entre 2-8°C. Il reste néanmoins stable à des températures allant jusqu'à 25°C pendant 4 jours. A la fin de cette période il doit être utilisé ou éliminé.

- **Le calendrier de vaccination**

- **Enfants de moins de 6 mois (Cas du PEV du Mali)**

- 0,5 ml par injection à un mois d'intervalle (trois en tout) et injection de rappel au cours de la deuxième année.

- **Enfants de 7 à 11 mois**

- deux doses de 0,5 ml espacées d'un mois
  - Rappel au cours de la deuxième année

- **Enfants de 12 à 24 mois :**

Deux doses de 0,5 ml espacées d'au moins deux mois.

#### **5.1.2.1.2. Pneumo 23**

C'est un vaccin composé de fragments (antigènes) de pneumocoques de 23 sérotypes différents. Ce sont les sérotypes : 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F.

Il ne contient aucun germe vivant. L'immunité apparaît 2 à 3 semaines après l'injection.

Il est utilisé dans la prévention des infections à pneumocoques chez les personnes fragiles (chimiothérapie anticancéreuse, immunodéprimé, ablation de la rate, insuffisance cardiaque).

Il ne peut être utilisé avant l'âge de 2 ans.

Pour garder son efficacité, il doit être conservé entre + 2 °C et + 8 °C (partie la plus froide du réfrigérateur). Toute fois, une rupture de la chaîne du froid pendant une durée limitée (quelques heures à température ambiante inférieure à 25 °C) ne devrait pas prêter à conséquence. En pratique, en cas de nécessité, un délai de quelques heures peut séparer l'achat du vaccin en pharmacie de son stockage au réfrigérateur avant la vaccination. Il ne doit pas être congelé.

- **Calendrier de vaccination**

Bien agiter la seringue avant l'emploi, la réchauffer à température ambiante si nécessaire. L'injection doit être réalisée par voie sous cutanée ou par voie intramusculaire en une seule dose de 0,5 ml chez l'adulte et l'enfant de plus de 2 ans.

La vaccination peut être renouvelée régulièrement tous les 3 à 5 ans chez les personnes à haut risque d'infection.

### **5.1.2.2. *Haemophilus influenzae***

Le vaccin anti *Haemophilus influenzae* de type b est habituellement administré avec le vaccin contre la diphtérie, le tétanos, la poliomyélite et l'hépatite B sous forme combinée (vaccin pentavalent). Il a été introduit dans le programme élargi de vaccination au Mali en 2005 et est administré chez les enfants entre 2 et 6 mois.

#### **5.1.2.2.1. Penta**

Il est constitué essentiellement de polysaccharide d'*Haemophilus influenzae* type b comme principe actif conjugué à la protéine tétanique.

Ce vaccin est indiqué dans la prévention des infections invasives à *Haemophilus influenzae* type b (méningites, septicémies, cellulites, arthrites, épiglottites...) chez l'enfant à partir de 2 mois. Ce vaccin ne protège pas contre les infections dues aux autres types d'*Haemophilus influenzae*, ni contre les méningites dues à d'autres pathogènes. En aucun cas, la protéine tétanique contenue dans ce vaccin ne peut remplacer la vaccination tétanique.

- **Calendrier de vaccination**

Il est administré par voie intramusculaire ou sous-cutanée profonde. Les sites d'injection recommandés sont la face antérolatérale de la cuisse (tiers moyen) chez le nourrisson et la région deltoïdienne chez l'enfant.

- **Avant l'âge de 6 mois (cas du PEV du Mali)**

3 doses successives de 0,5 ml à un ou deux mois d'intervalle suivies d'une injection de rappel (4<sup>ème</sup> dose) un an après la 3<sup>ème</sup> injection.

- **Entre 6 et 12 mois**

2 doses de 0,5 ml à 1 mois d'intervalle, suivies d'une injection de rappel (0,5 ml) à l'âge de 18 mois.

- **De 1 à 5 ans**

1(Une) seule dose de 0,5 ml.

• **Les cas contacts**

Lors d'un contact avec un cas d'infection invasive à *Haemophilus influenzae* (famille ou crèche), la vaccination doit être mise en œuvre en suivant le schéma adapté à l'âge.

## **5.2. Prise en charge**

### **5.2.1. Traitement de base**

Il s'agit d'une injection de Ceftriaxone en dose unique à raison de 100 mg/kg en une injection IM, avec 4 g au maximum ;

**Chez l'enfant de moins de 2 mois**, il faut utiliser l'Ampicilline : 100 mg/kg en perfusion IV lente par jour pendant 5 jours.

### **5.2.2. Traitements complémentaires**

- Enveloppement par linge humide ;
- Paracétamol : 40 mg/kg/jour en 3 prises chez l'enfant et 2 à 3 g/jour chez l'adulte en 3 prises ; ou
- Aspirine : 25 mg/kg/jour chez l'enfant en 3 prises et 2 g/jour chez l'adulte en 3 prises. Il ne faut pas donner d'aspirine en cas de purpura

## **DEUXIEME PARTIE**

### **ETUDE**

## 1. CONTEXTES ET JUSTIFICATIONS

Au Mali, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* occupe une place importante dans les méningites bactériennes. Une étude de surveillance réalisée sur les infections invasives chez les enfants de 0 à 16 ans hospitalisés dans le service de Pédiatrie de l'hôpital Gabriel Touré de juin 2002 à mai 2003, a estimé l'incidence de l'infection à pneumocoque à 44 pour 100 000 chez les enfants de 0 à 4 ans avec une létalité d'environ 10%. Le taux des infections invasives à pneumocoque chez les enfants hospitalisés était plus élevé que dans les pays industrialisés (41).

La surveillance épidémiologique des méningites bactériennes au Mali est réalisée dans tous les districts sanitaires à travers un réseau national. Des ponctions de LCR sont effectuées chez les cas suspects de méningites au niveau des districts sanitaires et acheminés au laboratoire national de référence des méningites à l'INRSP, situé à Bamako. De 2005 à 2007, la surveillance épidémiologique a montré qu'environ 30% des cas confirmés de méningite étaient dus à *Streptococcus pneumoniae* et 18% à *Haemophilus influenzae* b ; environ 44% de ces cas étaient des enfants de 0 à 4 ans (6).

Face au poids de la maladie, et en vue de réduire la mortalité et la morbidité dues à l'infection chez les enfants, le Mali a introduit dans le programme élargi de vaccination, les vaccins anti *Haemophilus influenzae* b en 2005 et anti pneumocoque (Prevnar 13®) en 2011. Ce dernier contient 13 antigènes correspondant à 13 sérotypes fréquemment responsables de méningite. Ces vaccins devraient permettre de réduire de plus de 90% le risque de pathologies bactériennes invasives chez les jeunes enfants et d'entraîner une protection vaccinale des sujets non vaccinés par immunité de groupe. Cependant, la fréquence d'isolement de *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* b reste encore élevée chez les enfants. En effet, *Streptococcus pneumoniae* occupait la 2<sup>ème</sup> place parmi les différentes étiologies de la méningite (18,8%) après *Neisseria meningitidis* (63,0%) en 2012. De même, le rapport de la surveillance épidémiologique de 2012 montre qu'environ 23% des LCR positifs sont des pneumocoques et 6% des *Haemophilus influenzae* non b.

Cette situation soulève plusieurs questions de recherche.

Quels sont les sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* responsables de méningite chez les enfants de moins 5 ans ? Ces sérotypes sont-ils les mêmes que ceux inclus dans le vaccin **Prevnar 13®** ?

Les cas d'*Haemophilus influenzae non b* isolés récemment dans les LCR sont de quel sérotype ?

La présente étude se propose donc d'identifier les sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* et les types de *Haemophilus influenzae* responsables de méningites chez les enfants après la vaccination.

## 2. OBJECTIFS

### 2.1. Objectif général

Caractériser les souches de *Streptococcus pneumoniae* et d'*Haemophilus influenzae* responsables de méningite chez les enfants de 0 à 5 ans après l'introduction du Prevnar 13® et du Pentavalent au Mali

### 2.2. Objectifs spécifiques

- Déterminer la fréquence des méningites à *Streptococcus pneumoniae* et d'*Haemophilus influenzae* chez les enfants de 0 à 5 ans ;
- Déterminer les sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* et les types d'*Haemophilus influenzae* responsables de méningite chez les enfants de 0 à 5 ans ;
- Analyser leur fréquence chez ces enfants en fonction des caractéristiques sociodémographiques et du statut vaccinal.

### 3. MÉTHODOLOGIE

#### 3.1. CADRE THEORIQUE

L'étude s'est déroulée à l'INRP et dans les sites constitués par les districts sanitaires du Mali..

##### 3.1.1. Présentation de l'INRSP

La direction générale de l'INRSP du Mali est située dans le quartier hippodrome sur la route de Koulikoro.

L'INRSP fut Créé par la loi N° 93-014 du 11 février 1993 comme Etablissement Public à caractère Administratif, l'INRSP est passé de ce statut a celui d'Etablissement Public à caractère Scientifique et Technologique par l'Ordonnance N° 06-007/P– RM du 28 février 2006.

**Les missions de l'INRSP se résument comme suit :**

- Promouvoir la recherche médicale et pharmaceutique en sante publique notamment dans les domaines des maladies infectieuses, néoplasiques et sociales, de la santé familiale, l'éducation sanitaire, de l'hygiène du milieu, de la biologie clinique appliquée a la nutrition et aux affections endémo-épidémiques, 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'accord d'assistance mutuelle ;
- Gérer les structures de recherche qui lui sont confiées.

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

- Département Sante Communautaire (DSC),
- Département Médecine Traditionnelle (DMT),
- Département Formation (DF),
- Département Administratif et du Personnel (DAP),
- Département de Diagnostic et de Recherche Biomédicale (DDR) qui se compose de laboratoires de :

Sérologie-Immunologie

**Bactériologie**

Hématologie

Biochimie

Parasitologie

Cytogénétique

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

- Le centre de Selingué ;
- Le centre de Kolokani ;
- Le Centre Régional de Médecine traditionnelle de Bandiagara (CRMT) ;

### **3.1.1.1. 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.
- Un laboratoire des IST qui assure le contrôle de qualité des sites de dépistage sérologique du VIH et de la syphilis, qui participe aux enquêtes épidémiologiques (surveillance sentinelle, ISBS, EDS, etc.)

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 :

- CQ-NICD dans le cadre du contrôle de qualité externe.
- Centre de Recherche pluri pathologique de Ouagadougou et le centre collaborateur de l'OMS pour la méningite à Oslo (Norvège) dans la détermination des séquences/types des méningocoques.
- CDC Atlanta branche méningite apporte son expertise pour le diagnostic moléculaire des méningites, le contrôle de qualité externe et d'autres études.
- OMS apporte son appui en formation, en approvisionnement en matériels et réactifs et la gestion des données de laboratoire.
- Unité de Bactériologie de l'hôpital Charles de Gaulle de Ouagadougou pour la formation à la technique de PCR en temps réel.

### **3.1.2. Type de l'étude**

Il s'agit d'une étude transversale prospective descriptive et analytique s'étendant de janvier à décembre 2014. Elle a été réalisée dans le cadre de la surveillance épidémiologique de la méningite.

## **3.2. MATERIELS**

### **3.2.1. Échantillons**

L'échantillon de travail est constitué de souches de *Streptococcus pneumoniae* ou *Haemophilus influenzae*, de LCR ou d'ADN du germe présent dans le LCR.

### **3.2.2. Patients**

Il s'agissait de 225 enfants âgés de 0 à 5 ans, identifiés comme cas suspect de méningite, chez qui une ponction lombaire a été réalisée.

#### **3.2.2.1 Critères**

##### **3.2.2.1.1. Critères d'inclusion**

Sont inclus dans notre étude :

.Tout patient de 0 à 5 ans répondant à la définition du cas suspect de méningite selon l'OMS et ayant bénéficié d'une ponction lombaire envoyée à l'INRSP pour la confirmation pendant la période de l'étude dans le cadre de la surveillance épidémiologique.

### 3.2.2.1.2. Critères de non inclusion

Ne seront pas retenus dans notre étude :

- Les patients âgés de 0 à 5 ans dont les parents ou tuteurs refuseraient de participer à l'étude (refus de l'assentiment de l'enfant et consentement éclairé du parents)
- Souches de *Streptococcus pneumoniae* et d'*haemophilus influenzae* provenant de LCR de mauvaise qualité

### 3.2.2.2. Echantillonnage

Il s'agit d'un modèle d'échantillonnage simple et exhaustif incluant systématiquement tous les enfants âgés de 0 à 5 ans répondant à la définition de cas suspects de méningite de janvier à décembre 2014 pendant la surveillance épidémiologique des méningites.

### 3.2.2.3. Variables à étudier

Les variables à étudier sont :

- Les caractéristiques sociodémographiques des patients (âge et sexe)
- Le statut vaccinal
- Les souches isolées et typage des souches

## 3.2.3. Equipements, réactifs et consommables

### 3.2.3.1. Ponction

Le matériel nécessaire pour la ponction lombaire est constitué de :

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

### 3.2.3.2. Bactériologie classique

#### 3.2.3.2.1. Etat frais

- Equipements
  - Cellule de Malassez
  - Lamelles porte objet
  - Pipette Pasteur
  - Microscope

### 3.2.3.2.2. Coloration de Gram

#### - Equipement

- Lames porte-objet
- Papier buvard
- Microscope
- Huile à immersion

#### - Réactifs

- Kit color Gram comportant le violet de gentiane, le lugol, l'alcool et la fuschine.

### 3.2.3.2.3. Culture

#### - Milieux de culture

- Gélose au sang frais
- Gélose au sang cuit (ou gélose chocolat) enrichi au polyViteX®
- T-I

. Bouillon glycériné (Bouillon cœur-cerveille plus 15% de glycérine)

. Eau physiologique

#### - Equipements

- Anse
- Hotte
- Boite à incubation sous CO<sub>2</sub>
- Etuve pour conservation des cultures
- Réfrigérateur pour conservation des consommables
- Gants stériles

#### - Réactifs

- Le réactif du test à l'oxydase ;
- Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 3% pour le test à la catalase ;
- Le disque du test à l'optochine.

### 3.2.3.3. Immunologie

#### 3.2.3.3.1. Recherche d'antigènes solubles

- Réactifs : PASTOREX™ MENINGITIS BIO-RAD



**Figure 9:** Présentation de PASTOREX™ MENINGITIS BIO-RAD

PASTOREX™ MENINGITIS coffret pour 25 tests, code 61607, contient :

- Réactif 1 (R1) : *N. meningitidis* B/*E.coli* K1

Le réactif R1 est un flacon de 0,40 ml de suspension de latex rouge sensibilisé par un anticorps monoclonal de souris spécifique de *N. meningitidis* groupe B/*E.coli* K1.

- Réactif 2 (R2) : *N. meningitidis* B/*E. coli* K1 négative control

Le réactif R2 est un flacon de 0,40 ml de suspension de latex rouge sensibilisé par un anticorps monoclonal de souris spécifique de l'anatoxine tétanique.

- Réactif 3 (R3) : *H. influenzae* b

Le réactif R3 est un flacon de 0,40 ml de suspension de latex blanc sensibilisé par des anticorps de lapin spécifiques d'*Haemophilus influenzae* type b.

- Réactif 4 (R4) : *Streptococcus pneumoniae*

Le réactif R4 est un flacon de 0,40 ml de suspension de latex vert sensibilisée par des anticorps de lapin spécifiques de *Streptococcus pneumoniae*.

- Réactif 5 (R5) : Streptococcus B

Le réactif R5 est un flacon de 0,40 ml de suspension de latex jaune sensibilisée par des anticorps de lapin spécifiques de Streptococcus B ;

- Réactif 6 (R6) : *Neisseria meningitidis* A

Le réactif R6 est un flacon de 0,40 ml de suspension de latex bleu sensibilisée par des anticorps de lapin spécifique de *Neisseria meningitidis* groupe A.

- Réactif 7 (R7) : *Neisseria meningitidis* C

Le réactif R7 est un flacon de 0,40 ml de suspension de latex rouge sensibilisée par des anticorps de lapin spécifiques de *Neisseria meningitidis* groupe C.

- Réactif 8 (R8) : *Neisseria meningitidis* Y/W135

Le réactif R8 est un flacon de 0,40 ml de suspension de latex rose sensibilisé par des anticorps de lapin spécifiques de *Neisseria meningitidis* groupe Y et W135.

- Réactif 9 (R9) : control polyvalent négative

Le réactif R9 est un flacon de 0,40 ml de suspension de latex prune sensibilisée par des IgG de lapin non immunisé.

- Réactif 10 (R10) : control polyvalent positif

Témoin positif : extrait antigénique polyvalent lyophilisé à reconstituer avec 1ml d'eau stérile, contient les antigènes polysaccharidiques de *Neisseria meningitidis* A, C, B, W135, *H influenzae b*, *Streptococcus B* et *Streptococcus pneumoniae*.

Il ya un volume suffisant pour 20 réactions. Tous ces réactifs contiennent 0,02% de merthiolate.

Les réactifs R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9 contiennent une quantité inférieure ou égale à 0,1% d'azoture de sodium.

- Cartes d'agglutination jetables.
- Bâtonnets mélangeurs jetables

Bocal pour éliminer la baguette et carte déjà utilisée.

### **3.2.3.4. Biologie moléculaire**

#### **3.2.3.4.1. Identification de l'espèce par la PCR en temps réel**

Pour la PCR il faut 3 Salles : d'extraction (sale), de mixte (propre) et d'amplification

##### **Dans la salle d'extraction**

- **Equipements**
  - Hotte de biosécurité avec lumière UV ;
  - Microtube 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
  - Désinfectant spray

- Poubelle
- Minuteur chrono-rebours
- Plaque chauffante ou bain marie
- Four micro-onde
- Masque de protection anti UV ;
- Microtube PCR de 1,5ml
- Balance
- Embouts
- Centrifugeuses
- Papier « pour la pesée »
- Gants stériles
- **Réactifs**
  - 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 protéinase K
  - Eau de qualité PCR

#### **Dans la salle de mixte**

- **Equipements**
  - Hotte de biosécurité avec lumière UV
  - Micropipettes P2, P20, P100, P200 et P1000
  - Plaque
  - Film adhésive
  - Vortex
  - Micro centrifugeuse
  - Gants stériles

- **Réactifs**

- Le mix :

.TaqMan® Universal PCR Master Mix (www.appliedbiosystems.com, productnumber 4304437) : C'est le mélange contenant les dNTPs (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), le cofacteur MgCl<sub>2</sub>, l'ADN polymérase (Taq polymérase) et le tampon.

Qanta® : c'est un mélange de concentration deux fois supérieure aux autres, contenant des NTPs, le cofacteur MgCl<sub>2</sub>, la Taq polymérase et un tampon. Il est utilisé dans les cas d'identification non concluante.

- 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 VI**).
- 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 VI**)
- L'eau de qualité PCR

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

Espèces/ types	Gènes	Amorces et sondes	Séquences (5'→3')
<b>IDENTIFICATION D'ESPECES</b>			
<i>H. influenzae</i>	Hpd	F : 822 R : 952 Pb : 896i	GGTTAAATATGCCGATGGTGTG TGCATCTTTACGCACGGTGTA TTGTGTACACTCCGT"TT"GGTAAAAGAACTTGAC
<i>S. pneumoniae</i>	LytA	F : 373 R : 424 Pb : 400i	ACGCAATCTAGCAGATGAAGCA TCGTGCGTTTTAATTCCAGCT TGCCGAAAACGC"TT"TGATACAGGGAG
<b>TYPAGE</b>			
<i>H. influenzae</i> type b	BcsB	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"TT" A GCA AAC CGT AAC CTT ACT C

F : amorce sens (Forward)

R : amorce anti-sens (Reverse)

Pb : sonde spécifique (Probe)

**Caractérisation des souches de Pneumocoque et d'*Haemophilus influenzae* responsables de méningites chez les enfants de 0 à 5 ans après l'introduction du Pentavalent et du Prevnar 13® au Mali**

**Tableau VI : Amorces, sondes et colorants des sondes utilisées pour le typage de *Streptococcus pneumoniae* dans une mPCR en temps-réel (42)**

Identificateur Amorce/Sonde	Colorant de sonde	Extincteur (3')	Séquences (5'-3')
1-F			TTTCATCCCTATGTGTGGTATAG
1-R			GCTTTAGAAGGTAGAGTTAACAAC
1-Sonde	FAM	BHQ1	TGCCAAAGCCAGCCA
2-F			TGTTATCCCATATAAGAACCGAGTGT
2-R			AAAATTACCCAAAAGCTATCCAA
2-Sonde	FAM	BHQ1	TTGCAATT"TC"CAATTTTTTGGCCCAATCTC
3-F			CCACTAAAGCTTTGGCAAAAAGAAA
3-R			CCCGAACGTAAAGCTTCTTCA
3-Sonde	HEX	BHQ1	TTGTAGACCGCCCAACA"TC"ATTTTGT
4F			GCTTCTGCTGTAAGTGTGTGC
4-R			CACCACCATAGTAACCAAGTTC
4-Sonde	CY5	BHQ2	TTCCACAAAAGAGAGCCTACAGGTAACCCCA
5-F			CATGATTATGCCCTTTGCAA
5-R			GACAGTATAAGAAAAAGCAAGGGCTAA
5-Sonde	HEX	BHQ1	TCTTCTTCTCA"TC"CGTTCCGCATGCTTTT
6A/6B/6C/6D-F			GTTTGGCACTAGAGTATGGGAAG
6A/6B/6C/6D-R			TAGCCTTTCTGAAAACATTTAGCG
6A/6B/6C/6D-Sonde	FAM	BHQ1	TGTTCTGCC"TC"TGAGCAACTGGTCTTGTATC
6C/6D-F			TTGGGATGATTGGTCGTATTAG
6C/6D-R			CTCTCAATTAGTCTTTCAGTTTCG
6C/6D-Sonde	FAM	BHQ1	CCACGCAATTCGCCATC
7F/7A-F			ATGAAGGCTTTGGTTTGACAGGACA
7F/7A-R			ATTCTCGCCATCAATTGCATATTC
7F/7A-Sonde	CY5	BHQ2	ACACCACTATAGGCTGTTGAGACTAACGC
9V/9A-F			AGGTATCCTATATACTGCTTTAGG
9V/9A-R			CGAATCTGCCAATATCTGAAAAG
9V/9A-Sonde	HEX	BHQ1	ACACATTGACAACCGCT
11A/11D-F			AAATGGTTGGATATGGTTTGGT
11A/11D-R			AGTGCTAACTGTAAAACCTGATTATGAG
11A/11D-Sonde	CY5	BHQ2	ATTCCAACCTCTCCCAATTTCTGCCACGG
12F/12A/12B/44/46-F			GCACCCACGGGTAATAATTCTAC
12F/12A/12B/44/46-R			CAACTAAGAACCAAGGATCCACAG
12F/12A/12B/44/46-Sonde	CY5	BHQ2	TGCCCAACCAACAGGTCAGGT
14-F			AGAGTGTATGAGGAATCC
14-R			ATATATCTACTGTAGAGGGAAT
14-Sonde	FAM	BHQ1	CGCCAAGTAACA"TC"TTCCATTCATT
15A/15F-F			AATTGCCTATAAACTCATTGAGATAG
15A/15F-R			CCATAGGAAGGAAATAGTATTTGTTC
15A/15F-Sonde	FAM	BHQ1	CCCGCAAACCTCTGTCTT
16F-F			TAATGTTATGACCTTGGTAATCTTCCCG
16F-R			TCCCAAAGGATAATCAATAACTTTTAGAA
16F-Sonde	HEX	BHQ1	AGCCATAAGTCT"TC"CCAAATGCTTAACCGCT
18C/18A/18B/18F-F			TCGATGGCTAGAACAGATTTATGG
18C/18A/18B/18F-R			CCATTGTCCCTGTAAGACCATTG
18C/18A/18B/18F-Sonde	HEX	BHQ1	AGGGAGTTGAATCAACCTATAATTCGC CC C
19A-F			CGCCTAGTCTAAATACCA
19A-R			GAGGTCAACTATAATAGTAAGAG
19A-Sonde	FAM	BHQ1	TATCAATGAGCCGATCCGTCATT
19F-F			TGAGGTTAAGATTGCTGATCG
19F-R			CACGAATGAGAACTCGAATAAAAG
19F-Sonde	CY5	BHQ2	CGCACTGTCAATTCACCTTC
22F/22A-F			TCTATTAATAAACCCATTGGAATTGAAACG
22F/22A-R			TCGCAATTGAAGACCACATAAACTG
22F/22A-Sonde	HEX	BHQ1	TCCGTAAT"TC"CGCTTATGGGCACATTCTCCA
23A-F			CTCCCTCCATTACCCATTTGG
23A-R			TGAAGAAAAGTGCTGTTTGTGAACC
23A-Sonde	CY5	BHQ2	AGCTAGAAC"TC"CCACACTCCCTACTCCCA
23F-F			GACAGCAACGACAAATAGTCATCTC
23F-R			TCCATCCCAACCTAACACACTTC
23F-Sonde	CY5	BHQ2	ATTGTGTCCA"TC"AAACCCTCGTCTATTCCAAAG
f33F/33A/37-F			GGAAGTGGTTCAGCAACTATACG
33F/33A/37-R			GGTTCTAAGACCGTCTGAAATACC
33F/33A/37-Sonde	HEX	BHQ1	CCCCAAATAGGAC"TC"TTTCTGCCATGCCAAA

### Dans la salle d'amplification

#### - Equipements

- Stratagene **MX3005P**: C'est un amplificateur avec une détection à temps réel
- Ordinateur permettant de piloter l'amplificateur-Imprimante

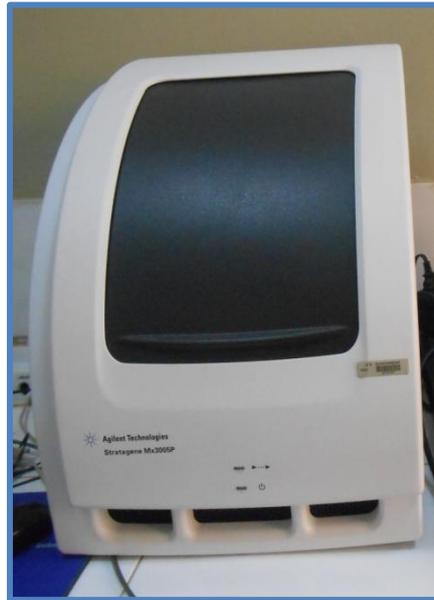


Figure 10: Stratagene MX3005P

### 3.2.3.42. Sérotypage de *Streptococcus pneumoniae* par la PCR en temps réel

#### - Equipements

- 1 poste de travail PCR avec ses propres pipettes pour la préparation réactionnelle
- 1 poste de travail PCR avec ses propres pipettes pour l'ajout de matrice d'ADN
- Vortex
- Plaques à 96 puits
- Systèmes de PCR en temps réel

**- Réactifs**

- Trousse d'Invitrogen Plantinum pour une PCR superMix Quantitative
- Amorces et sondes
- Matrice d'ADN
- Eau pour PCR
- Tubes eppendorf PCR Microfuge Flex de 1,5 ml(propres)
- Tubes de 1ml pour microcentrifugeuse (avec joint torique)
- Râtelier pour tubes eppendorf
- 2 ensembles d'instruments de micropipetage
- Plaques à 96 puits
- Capuchons optiques
- Porte-plaque
- Embouts de filtre pré-stérilisés de 10µl,200µl et 1000µl
- Eau de javel à 10%de concentration
- Ethanol ou isopropanol à 70% de concentration
- Tampons en papier
- Outil de capsulage

L'Invitrogen Plantinum PCR Super Mix Quantitative est stocké à 2-8 °C ou -20°C s'il n'est pas systématiquement utilisé. L'eau stérile de qualité PCR est conservée à 4°C ou à la température ambiante. Les stocks de solutions d'amorces et de sondes sont conservés à -20°C et les solutions en cours d'usage sont stockés à 2-8°C.

### **3.3. METHODES**

#### **3.3.1. Au niveau des sites**

Les principales activités ont consisté à :

- Faire le diagnostic clinique des cas ;
- Remplir la fiche de notification individuelle du cas ;
- Faire la ponction lombaire ;
- Inoculer le LCR dans le T-I ou tube sec et l'acheminer à l'INRSP.
- Acheminer les échantillons au service de bactériologie de l'INRSP accompagné de la fiche de notification.

### **3.3.1.1. Prélèvement**

Il consiste en une ponction lombaire afin de recueillir le LCR et se faisait par un personnel médical qualifié, dans les conditions d'asepsie afin d'éviter la contamination.

### **3.3.1.2. Condition de conservation et de transport**

Le LCR était transporté dès que possible au laboratoire soit dans un tube stérile, soit dans le milieu de transport Trans-Isolate. Le LCR collecté dans le tube doit être maintenu à l'abri de la lumière, la chaleur excessive et acheminé au laboratoire dans un délai de moins d'une heure. Dans l'incapacité de l'acheminer directement au laboratoire on peut le conserver au frais.

Les T-I doivent être acheminés dans un délai de moins de sept jours au laboratoire. Une fois inoculé, le TI ne doit pas être mis au frais.

Chaque prélèvement devait être accompagné d'une fiche de notification bien renseignée (nom, prénom, âge, début de la maladie, date de prélèvement, statut vaccinal ect...)

### **3.3.2. Au niveau de l'INRSP**

L'étude y consistait à :

- Établir le diagnostic étiologique par la culture et par les techniques de biologie moléculaire (PCR) ainsi que le typage des souches.
- Faire la rétro information aux sites.

#### **3.3.2.1. Méthode de laboratoire**

##### **3.3.2.1.1. Examen macroscopique**

A la réception, l'aspect et la qualité du prélèvement est apprécié. Ainsi un prélèvement était dit adéquat s'il est dans un conditionnement adéquat (tube ou T-I), en quantité suffisante et acheminé à temps au laboratoire à l'abri de la lumière. Si ces conditions n'étaient pas respectées le prélèvement était dit inadéquat.

**L'aspect du LCR peut être :**

- Clair (eau de roche)
- Trouble (louche ou purulent)
- Xanthochromique
- Hématique

**Tableau VII : Critères d'appréciation de la qualité des LCR (43)**

<b>CONSOMMABLES UTILISES</b>	<b>CRITERES D'APPRECIATION DE LA QUALITE DU PRELEVEMENT</b>
<b>Flacon de T-I inoculé avec le LCR</b>	Transporté dans un triple emballage ou dans un porte vaccin à température ambiante, sans aiguille d'aération et accumulateurs de froid
	Etiqueté avec le nom du patient et de la formation sanitaire
	Phase solide non rétractée
	Bouchon bien placé, couvercle en aluminium bien serti et opercule soulevé ou enlevé
	Transmis au laboratoire du district dans un délai maximum de 7 jours
<b>Cryotube contenant le LCR</b>	Transporté dans un porte vaccin avec accumulateurs de froid congelés
	Etiqueté avec le nom du malade et de la formation sanitaire
	Bien fermé avec un volume de LCR d'environ 0,5 à 1 ml
	Transmis au laboratoire du district dans un délai maximum de 7 jours
<b>Tube sec contenant le LCR</b>	Transporté à température ambiante à l'abri de la lumière
	Etiqueté avec le nom du patient et de la formation sanitaire
	Bien fermé avec un volume de LCR d'environ 2 à 3 ml
	Transmis au laboratoire dans un délai de moins de 1 heure

### 3.3.2.1.2. La culture

Ensemencer directement le prélèvement sur les milieux de culture si le LCR est collecté en tube sec ou tirer 10µl de la phase liquide pour l'ensemencer si le LCR est en T-I. les milieux utilisés sont :

- La gélose au sang pour *Streptococcus pneumoniae*.
- La gélose au chocolat pour *Haemophilus influenzae*
- Les boîtes ensemencées sont incubées à 37° C sous du CO<sub>2</sub> en atmosphère humide (5 à 10%) pendant 24-48 heures.

### 3.3.2.1.3. Examen microscopique

Les échantillons de LCR reçus ont été traités comme suit :

#### 3.3.2.1.3.1. Tube sec

Une fois le LCR reçu, on le partage entre deux tubes T1 et T2 lorsque la quantité est suffisante (plus d'1ml).

T1 est utilisé pour la réalisation de la cytologie, recherche d'antigènes solubles, culture. Le culot de centrifugation est utilisé pour faire le frotti afin de réaliser la coloration de GRAM.

T2 est conservé dans le congélateur à -80°C pour la réalisation de la PCR (biologie moléculaire).

#### ▪ Cytologie

Elle consistait dans un premier temps à dénombrer par millimètre cube (mm<sup>3</sup>) le nombre de cellule dans le 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 10µl 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 x40.

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<sup>3</sup>.

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<sup>3</sup>.

- **Coloration de Gram**

- Sécher le frottis à l'air dans une enceinte de sécurité.
- Déposer la lame sur un bac de coloration
- Recouvrir le frottis de quelques gouttes de violet de gentiane et attendre 30 à 60 secondes
- Laver la lame à l'eau et la recouvrir de quelques gouttes de lugol et attendre 30 à 60 secondes.
- Laver la lame et procéder à la décoloration avec l'alcool
- Recouvrir enfin la lame de quelques gouttes de fuschine et attendre 30 à 60secondes.
- Laver la lame et procéder au séchage avec du papier buvard
- Procéder enfin à la lecture au microscope avec l'objectif x100 en immersion.

### **3.3.2.1.3.2. Trans-Isolate**

Il peut être utilisé comme milieu de culture, de conservation, et de transport.

Dès la réception, le flacon T-I est aéré par une aiguille et incubé à 37° C. Après 24 heures d'incubation et quand la phase liquide est trouble, on tire une quantité du jus du milieu qui servira à l'isolement et à la coloration de Gram.

### **3.3.2.1.4. Identification**

D'une manière générale, l'identification du germe a été faite comme suit :

- Observation de l'aspect des colonies apparues
- Recherche de la catalase
- Recherche de l'oxydase
- Coloration de Gram d'un frottis réalisé à partir des colonies
- Test à l'optochine (pour *Streptococcus pneumoniae*)
- Test d'agglutination

#### - Oxydase

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 s'il ny pas de survenue de couleur au bout de 30 secondes.

#### - Catalase

La mise en évidence de la catalase a été faite en mélangeant les colonies bactériennes avec une goutte à 3% de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 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.

### - Test d'agglutination

Il est réalisé sur les LCR en tube sec et en cryotubes.

Nous avons utilisé le PASTOREX™ MENINGITIS **BIO-RAD**.

Il permet un accès rapide aux résultats pour la prise en charge et permet d'orienter sur étiologie des cas de méningite pour le traitement.

#### · Principe

Le PASTOREX™ MENINGITIS contient 25 tests constitués de particules de latex sensibilisées par des antisérums spécifiques, permettant par une technique d'agglutination rapide sur carte jetable, de détecter l'antigène correspondant dans le LCR.

#### · Mode opératoire

Les échantillons doivent être traités le plus rapidement possible après le prélèvement. En cas d'impossibilité, on peut stocker le prélèvement quelques heures entre +2 et +8°C ou plus longtemps à -20°C. (Dans ce cas centrifuger, l'échantillon et conserver le surnageant à -20°C).

Il est recommandé de ne faire subir qu'un seul cycle de congélation/décongélation aux échantillons.

La culture doit être faite en priorité afin d'éviter les risques de contamination de l'échantillon.

Un volume minimum de 0,5 ml d'échantillon est nécessaire pour tester l'ensemble des latex.

NB : pour le chauffage au bain-marie, utilisé de tubes hermétiques afin que l'eau ne puisse pénétrer dans les tubes. Utiliser de préférence un incubateur sec.

Dans le cas d'un LCR très trouble ou présentant une quantité importante de globules rouges, le centrifuger pendant 5 minutes et recueillir le surnageant.

Chauffer l'échantillon 3 minutes à 100°C (incubateur sec ou bain-marie) ramener à température ambiante puis centrifuger 5 minutes à 3000 tour ou filtrer sur filtre de 0,45µm.

#### · Procédure du test

On procède comme suit :

- Déposer une goutte (40 à 50 µl) du surnageant de l'échantillon dans chaque cercle de la carte jetable ;
- Bien homogénéiser les réactifs latex.
- Déposer une goutte de chaque réactif latex (maintenir le flacon en position verticale) sur la carte jetable suivant la répartition indiquée : R9, R6, R7, R1, R2 dans les cercles blancs et R8, R3, R4 dans les cercles noirs.

- Mélanger les latex à l'échantillon au moyen d'un bâtonnet en changeant de bâtonnet pour chaque latex.
- Donner à la carte un mouvement de rotation (120 RPM) pendant 10 minutes.
- Observer, dans ce délai de 10 minutes, l'apparition éventuelle d'une agglutination.

• **Lecture des résultats**

La lecture était faite à l'œil nu et sous un bon éclairage.

Réaction négative : la suspension reste homogène et légèrement opalescente (absence d'agrégats) ; le prélèvement est dit négatif au LATEX.

Réaction positive : apparition d'une agglutination franche (ou d'une agrégation) de particules de latex en moins de 10 minutes. L'intensité d'agglutination et le temps d'apparition sont fonction de la concentration en antigènes de l'échantillon testé. L'échantillon est dit positif au LATEX et les germes détectables sont : *Neisseria meningitidis* A, C, Y/W135, B/E. coli K1, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptocoque* du groupe B(GBS), *Haemophilus influenzae type b*.

• **Limites du test**

La technique immunologique au latex permet dans de nombreux cas un diagnostic présomptif du germe en cause. Cependant, la concentration en antigène de l'échantillon peut être inférieure au seuil de détection du kit et donner un résultat négatif dit « faux négatif ». Il est utile, dans ce cas, de répéter le prélèvement ultérieurement. En conséquence, cette technique ne saurait remplacer la culture qui, seule permet la réalisation d'un antibiogramme.

Le diagnostic final, comme pour tout diagnostic biologique, ne peut être pris sur le résultat d'un seul test mais sur un ensemble de données cliniques et de résultats biochimiques, cytologiques et immunologiques.

- **Conservation des souches**

Après vérification de la pureté de la culture, nous ensemençons les souches dans le bouillon glycérine 15%.

Cette méthode consiste à recueillir la totalité de la culture pure de 24 heures avec un écouvillon stérile ou une anse plastique, ensuite déposer la culture dans un Cryotube contenant environ 1ml de bouillon trypticase soja avec 15 à 20% de glycérine et faire tourner l'écouvillon (ou l'anse) pour reléguer les bactéries. Les Cryotubes sont conservés dans un congélateur à -80° C.

### 3.3.2.1.5. Biologie moléculaire

Elle permet 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. Dans notre étude nous nous intéresserons essentiellement à la PCR à temps réel.

#### 3.3.2.1.5.1. Identification par PCR en temps réel et sérotypage

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 MX3005P. Elle comporte une étape d'extraction et une étape simultanée d'amplification et de détection.

- **Lyse de la paroi 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 500µl dans 5 tubes, chacun contiendra 4000 U/ml (ou 4 U/µl) ;

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, ajouter 4mg lysozyme poudre et 1,9µl (4000 U/ml) mutanolysine à chaque 100µl TE buffer.

Lysozyme et mutanolysine doivent être ajoutés à TE buffer juste avant utilisation.

- **Lyse**

Dans un tube Eppendorf de 1.5ml, introduire 100µl de la solution de lyse ;

Ensuite ajouter 200µl d'échantillon ;

Incuber à 37 °C dans un bain marie ou sur une plaque chauffante pendant au moins une heure.

- **Extraction et purification de l'ADN bactérien**

L'extraction est réalisée dans la salle sale (salle d'extraction), chaque salle dispose d'une hotte et des équipements. Le Kit Qiagen est utilisé pour l'extraction et la purification de l'ADN bactérien. 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

- Ajouter 20µl de protéinase K (600M/ml) et vortexer les tubes brièvement.
  - Incuber à 56°C au bain-marie pendant 30minutes.
  - Centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes qui sont à la face interne du couvercle 6000 rpm pendant 30s.
  - Ajouter 200µl de Buffer AL. Vortexer les tubes brièvement.
  - Incuber les tubes à la température ambiante pendant 10 minutes.
  - Ajouter 260µl d'éthanol (96-100%) dans chaque tube contenant l'échantillon, homogénéiser en vortexant pendant 15 secondes. 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.
- . Transférer le mélange dans un tube à colonne QIAamp de 2ml sans mouiller le bord et fermer le couvercle du tube.
- Centrifuger à 6000 ou 8000 rpm pendant 1 minute. Eliminer le filtrat et le tube de collection
  - Placer la colonne dans un nouveau tube de collection. Ajouter **500µl de Buffer AW1** sans mouiller le bord, fermer le couvercle et centrifuger à 6000 ou à 8000 rpm pendant **1 minute**.
  - Eliminer le filtrat et le tube de collection.
  - Placer la colonne dans un nouveau tube de collection. Ajouter **500µl du Buffer AW2**, centrifuger pendant 3 minutes à vitesse maximale (20000 ou 14000 rpm) pour éliminer toutes les traces d'éthanol de la colonne. Eliminer le filtrat et le tube de collection.
  - Placer la colonne dans un tube eppendorf stérile de 1,5ml. Ajouter **100 µl du Buffer AE** dans la colonne. Incuber à la température ambiante du laboratoire pendant **5 minutes**. Centrifuger à 6000 ou 8000 rpm pour éluer l'ADN pendant 1mn.
  - Si l'extrait n'est pas utilisé systématiquement, le garder à **-20°C** jusqu'à l'utilisation.

**- Préparation du Mix et de la plaque**

Dans la salle propre (salle de mix), un mix est préparé pour chaque paire d'amorces dans un tube. Dans chaque tube le mix est composé, pour une réaction, comme décrit dans le tableau VI.

**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 lorsqu'il s'agit de l'identification des espèces et le typage des *Haemophilus influenzae*.
- 20µl par puit de microplaque correspondant, auquel est rajouté 5,0µl de DNA pour un volume total de 25µl par puits lorsqu'il s'agit du typage de *Streptococcus pneumoniae*.

Le Mix est distribué dans les puits de la plaque en respectant un schéma comme indiqué à la **figure 11**. 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), un contrôle négatif de la salle propre (ntc-clean), un contrôle de la série d'extraction d'ADN (extracted H<sub>2</sub>O), un contrôle positif espèce (*Hpd* ou *LytA*), 3 contrôles positifs sérotypes par triplex. Pour l'identification des espèces, une colonne est laissée entre chaque espèce de manière à minimiser les risques de contamination lors de la distribution.

**Tableau VIII : Volumes des éléments composant le milieu réactionnel de la PCR (42)**

	Identification d'espèces et typage Hi	Typage pneumocoque
Mix :	12.5µl	12,5 µl
Eau stérile de qualité PCR :	4.5µl	Variable
Amorce sens (Forward F) :	2.0µl	Variable
Amorce anti-sens (Reverse R) :	2.0µl	Variable
Sonde :	2.0µl	Variable
Rox :	-	0,5µl
MgCl <sub>2</sub>	-	1 ,5 µl
ADN-échantillon clinique	2.0µl	5,0 µl
Total	25µl	25µl

Date:	02/12/2014		PCR #:	10		File name:	Hawa Sanogo										
Note:	Training plate																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	SdC	Hpd	Lyt A		
A	322	361	370		322	361	370		322	361	370		Rxn x 1	26	26	26	
B	325	362	371		325	362	371		325	362	371		Mmix	12,5 ul	325	325	325
C	354	363	374		354	363	374		354	363	374		H2O	4,5 ul	117	117	117
D	355	364	375		355	364	375		355	364	375		Primer F	2 ul	52	52	52
E	358	365	376		358	365	376		358	365	376		Primer R	2 ul	52	52	52
F	359	366	H2O		359	366	H2O		359	366	H2O		Probe	2 ul	52	52	52
G	360	367	NTC P		360	367	NTC P		360	367	NTC P			23 ul	598	598	598
H	SdC	369	NTCS		Hpd	369	NTCS		LytA	369	NTCS		DNA/H2O	2 ul			
Controls:	Sd C				x			Men W									
	Hpd				x			Men X									
	Men C							Men Y									
	H. flu b							Lyt A									

**Figure 11** : schéma de plaque utilisé pour la PCR à temps réel

**- 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. Les cycles thermiques décrits ci-dessous (tableau VII), 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. La sonde hydrolysée, du fait de l'éloignement entre le donneur et l'accepteur, 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.

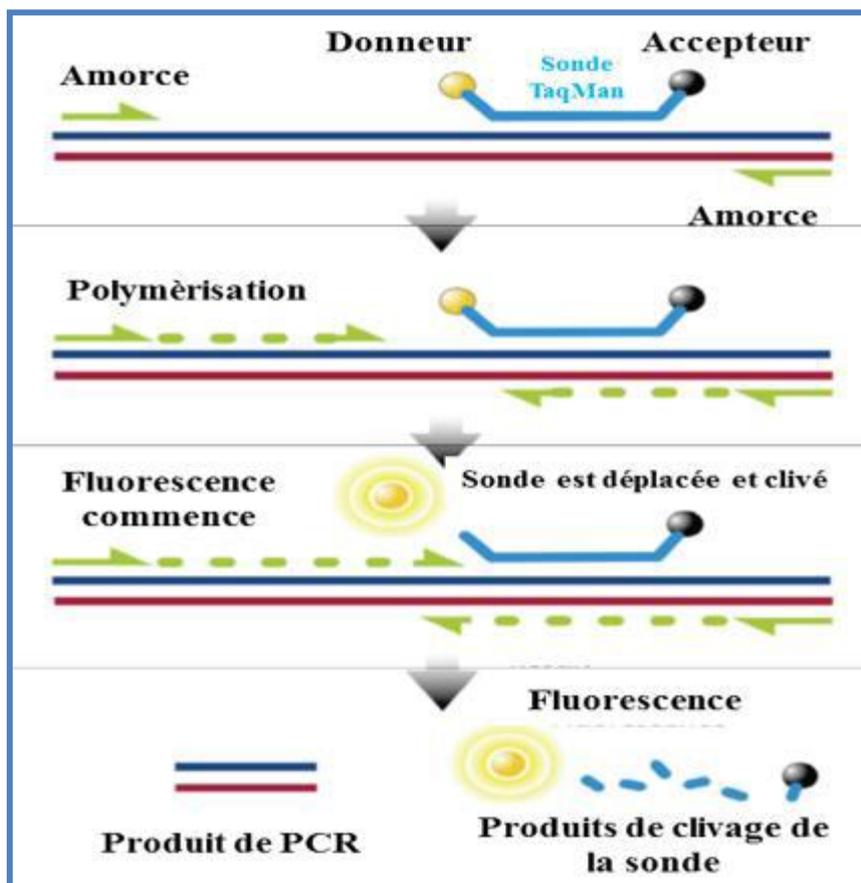


Figure 12: Amplification / Détection (44)

Tableau IX: Cycles thermiques pour l'identification de l'espèce et typage de *Haemophilus influenzae*

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

**Tableau X :** Cycles thermiques pour le typage de *Streptococcus pneumoniae*

	Segment1	Segment2	Segment3
<b>Température et temps</b>	50°C pendant 2mn	95°C pendant 10mn	95°C pendant 15s 60°C pendant 1mn
<b>Nombre de cycle</b>	1	1	40
<b>Activités</b>	Mise à niveau thermique	Dénaturation initiale	Amplification : dénaturation, hybridation, élongation

**- Expression des résultats**

**Ct** 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 Ct est inversement proportionnelle au nombre des copies du gène cible au début de la PCR. L'ordonnée est la quantité de fluorescence émise (**figure 13**). La grille d'interprétation est donnée dans les **tableaux VIII et IX**.

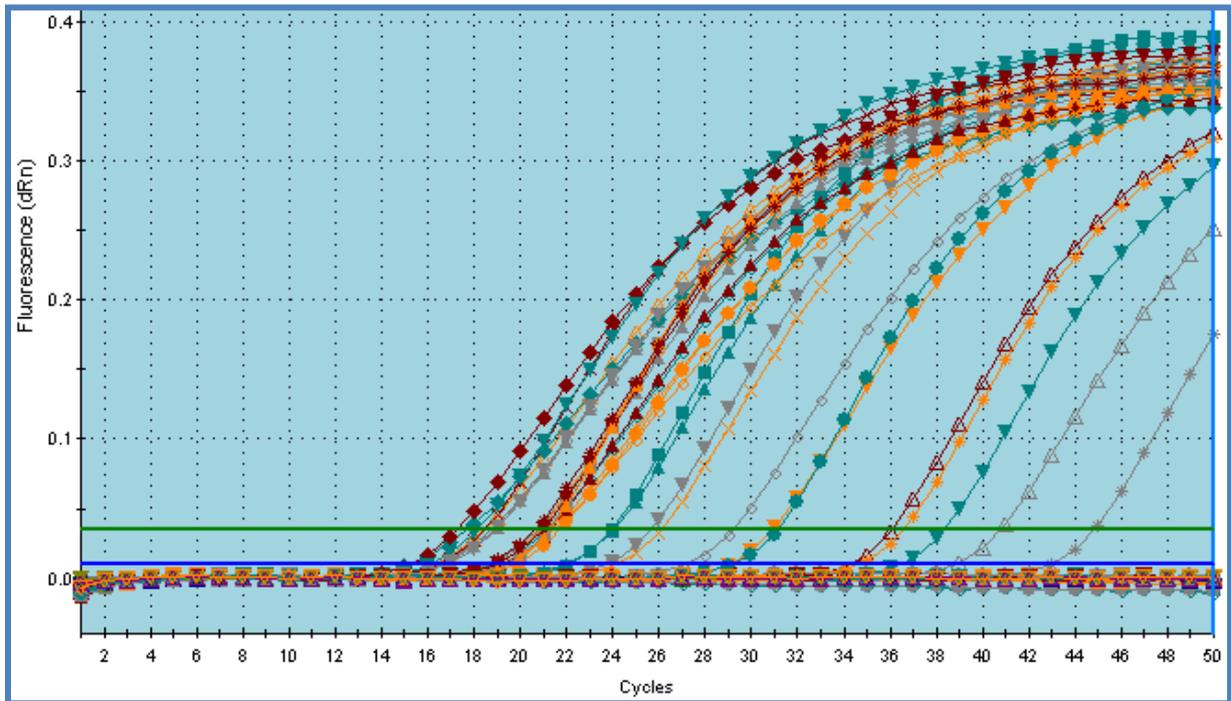


Figure 13: Courbe d'amplification (44)

Tableau XI: Interprétation des valeurs du Ct

$C_t$	Résultat
$\leq 35$	Positif
Entre 36-40	Equivoque
$> 40$ ou absent	Négatif

Pour chaque puits, si possible, une valeur seuil de cycle ( $C_t$ ) sera générée. La valeur  $C_t$  est le cycle d'amplification au cours duquel la fluorescence de l'échantillon a dépassé la valeur de seuil.

Les  $C_t$  de valeur  $\leq 35$  sont considérés comme positifs et ceux de valeur  $\geq 40$  sont considérés comme négatifs ;

Les  $C_t$  de valeurs  $36 \leq C_t \leq 40$  sont considérés comme équivoques et doivent être ré-testés après dilution de la matrice d'ADN au 1/4 et 1/10 dans une eau de qualité PCR, pour réduire les inhibiteurs qui peuvent interférer avec la réaction ; après quoi si la valeur diminue et est inférieure ou égale à 35, les échantillons sont considérés comme positifs.

Les courbes d'amplification doivent être analysées afin de s'assurer qu'elles sont régulières et de formes sigmoïdes.

**Tableau XII:** Algorithme d'interprétation des résultats en fonction des amorces

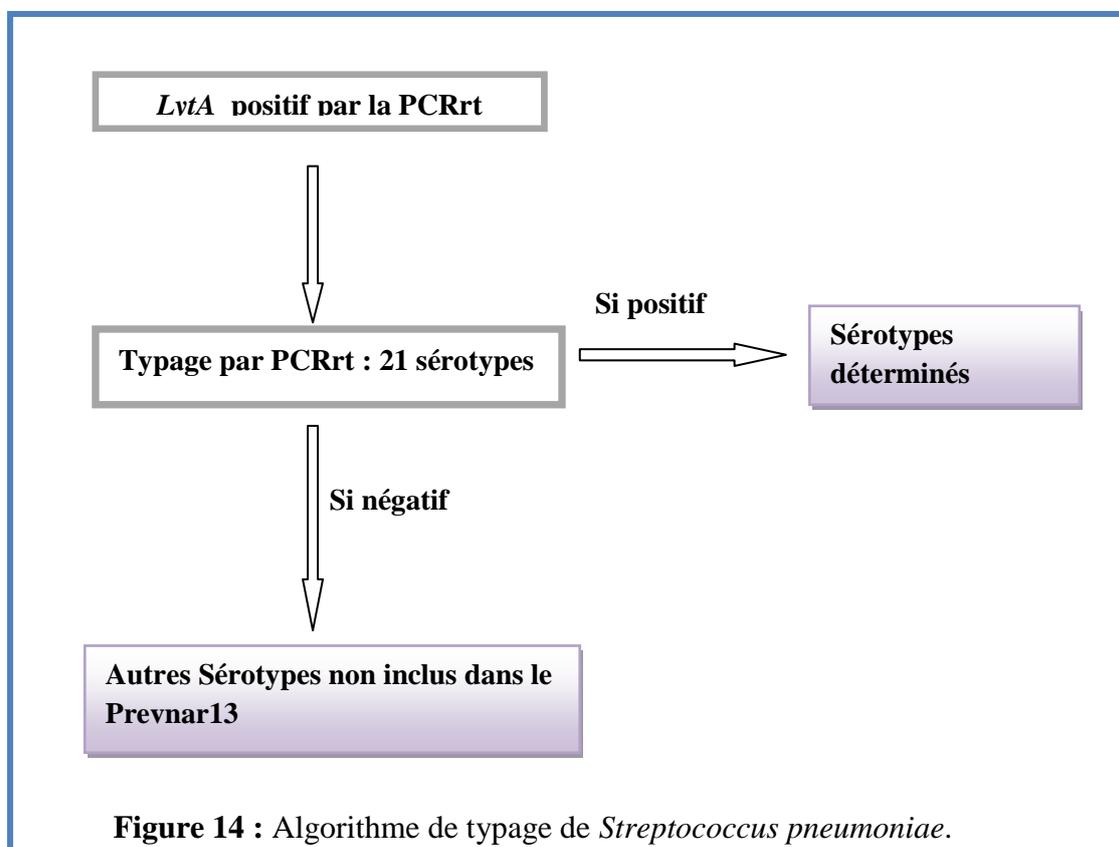
Espèces ( <i>hpd</i> , ou <i>lytA</i> )	Sérotypes	Interprétation
$C_t \leq 35$ cycles		Positifs pour les espèces
	$C_t \leq 35$ cycles	Positif pour le sérotype et pour les espèces
$C_t$ 36-40 cycles	$C_t \leq 35$ cycles	Accepter le serotype comme positive pour l'espèce *
$C_t \leq 35$ cycles	$C_t$ 36-40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

▪ **Typage de *Streptococcus pneumoniae***

Il s'applique aux souches de *Streptococcus pneumoniae*, échantillons cliniques (sang, LCR et autres spécimen...) et les cultures de LCR en T-I. Dans notre étude nous avons utilisé la méthode décrite par **Pimenta et al** (42) et adaptée par l'OMS. Les LCR en tube et les cultures de LCR en T-I qui après extraction de leur ADN ont été testés positifs pour le pneumocoque par identification du gène *lyt A* ont été utilisés. Cette méthode permet d'identifier 21 des sérotypes les plus courants et prend en compte les 13 sérotypes du **Prevnar 13®** à l'aide de 7 réactions (triplex).

▪ **Techniques**

. Préparer des quantités suffisantes de stocks de travail, d'amorces et de sondes.  
. Planifier l'expérimentation en remplissant, imprimant les modèles de fiches de travail pour les plaques. Lors du calcul de la quantité du mélange principal à faire pour chaque test, ajouter deux au nombre total de tests prévu. Calculer la quantité de chaque réactif nécessaire pour chaque gène cible en utilisant la table de teneur de réaction associé à la plaque (**Voir Tableau VIII**).



### 3.4. Collecte des données

Elle a été faite sur les fiches de notification individuelles de surveillance des maladies, révisées par l'OMS (annexe II) et le registre de laboratoire de l'INRSP.

### 3.5. Saisie et analyse des données

Les données ont été saisies sur Epi-info et analysées sur IBM SPSS Statistics20.

### 3.6. Chronogramme

	2014												2015						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7
Élaboration du protocole	■	■	■																
Soumission au comité d'éthique				■															
Collecte des données	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■							
Analyse (Identification espèce)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■							
Acquisition des réactifs et consommables																	■		
Typage des souches de pneumoque																	■	■	
Revue littéraire et Rédaction	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
Rapport final et diffusion																			■

## 4. RESULTATS

### 4.1. Résultat généraux

#### 4.1.1. Description de la population des patients

De janvier à décembre 2014, 225 cas suspects de méningite chez les enfants de 0-5 ans ont fait l'objet d'une ponction lombaire pour la confirmation au laboratoire de bactériologie de l'INRSP.

**Tableau XIII:** Répartition des patients selon le sexe, l'âge

Caractéristiques	Effectifs	Pourcentage%
<i>Sexe (n=225)</i>		
Féminin	91	40,4
<b>Masculin</b>	<b>134</b>	<b>59,6</b>
<i>Tranche d'âge (n=255)</i>		
<b>Moins de 6 mois</b>	<b>68</b>	<b>30,2</b>
7 à 12 mois	56	24,9
13 à 36 mois	61	27,1
37 à 60 mois	40	17,8

Le sexe masculin était prédominant : 59,6%. La majorité des patients était âgée de moins de 36 mois : 30,6%.

(Médiane d'âge en mois : 2,000).

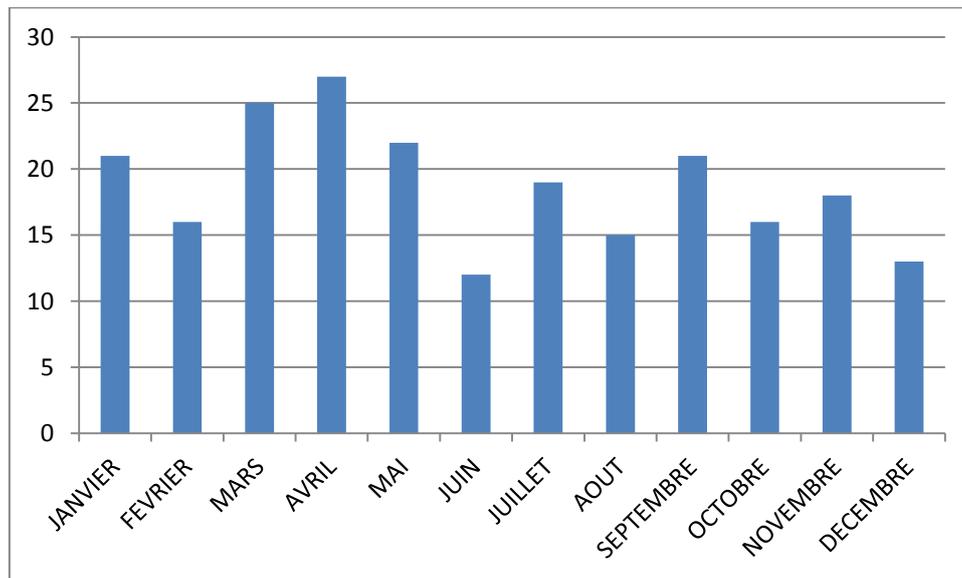
#### 4.1.2. Caractéristiques des échantillons

**Tableau XIV** : Répartition des échantillons en fonction du statut vaccinal et du type de vaccin administré

Caractéristiques	Fréquence	Pourcentage%
<i>Statut vaccinal (n=225)</i>		
Vaccinés	27	12,0
Non vaccinés	16	7,1
Inconnu	182	<b>80,9</b>
<i>Type de Vaccin (n=27)</i>		
Pneumo+Hib	7	25,9
Hib	2	7,4
Pneumo	1	3,7
Vaccin non connu	17	63

Sur la base des déclarations, seulement 27 patients étaient vaccinés soit 12% et pour 182 soit 80,9% le statut vaccinal n'était pas connu.

Parmi les 27 patients déclarés vaccinés, 7 avaient reçu le vaccin Pneumo +Hib soit 25,9%, 2 le vaccin Hib soit 7,4% et 1 le vaccin Pneumo seul soit 3,7%.



**Figure 15:** Répartition des LCR en fonction du mois de notification en 2014.

Les cas suspects de méningites étaient fréquents les mois de mars à mai avec un pic au mois d'avril.

#### 4.1.3. Résultats de la bactériologie classique et de la biologie moléculaire

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

<b>Caractéristiques</b>	<b>Effectifs</b>	<b>Pourcentage %</b>
<b><i>Milieu de transport (n=225)</i></b>		
Tube sec	182	<b>80,9</b>
TI	43	19,1
<b><i>Qualité (n=225)</i></b>		
Adéquat	189	<b>84,0</b>
Non Adéquat	36	16,0
<b><i>Aspect macroscopique</i></b>		
Clair	119	52,9
Hématique	27	12,0
Trouble	28	12,4
Xanthochromique	8	3,6
NA (LCR en TI).	43	19,1

Le tube sec était le plus utilisé pour le transport des LCR : 80,9%.

Les échantillons prélevés étaient adéquats à 84,0%. A l'examen macroscopique la majorité des LCR était clair : 52,9%.

**Tableau XVI:** Répartition des LCR selon les résultats de la coloration du Gram, latex, la culture et la PCR

Caractéristiques	Effectifs	Pourcentage%
<b>Coloration Gram (n=225)</b>		
BGN	9	4,0
DGP	14	6,2
DGN	1	0,4
Négatif	201	89,3
<b>PASTOREX (n=169)</b>		
<i>H. influenzae</i> de type b	5	2,9
<i>S. pneumoniae</i>	11	6,5
Négatif	153	90,5
<b>Culture (n=225)</b>		
Stérile	214	95,1
<i>S. pneumoniae</i>	3	1,3
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0,4
<i>Escherichia coli</i>	1	0,4
Contaminations	6	2,7
<b>PCR (n=225)</b>		
<i>S. pneumoniae</i>	<b>36</b>	<b>16,0</b>
<b>Hi non b</b>	<b>3</b>	<b>1,3</b>
<i>H. influenzae</i> de type b	12	5,3
Nm*	2	0,9
NmW135	2	0,9
Nm X	3	1,3
Négatif	167	74,2

DGP=Diplocoque Gram positif, BGN=bacille Gram négatif

DGN=Diplocoque Gram Négatif

BGN=Bacille Gram Négatif

\*Nm = Neisseria meningitides non A, non B, non C, non W135, non X et non Y

A la coloration de Gram, les types morphologiques les plus fréquemment observés étaient les Diplocoques à Gram Positif avec 14 cas soit 6,2%, suivi des bacilles Gram négatif avec 9 cas soit 4,0%.

Sur 169 échantillons testés au Pastorex, 11 étaient positifs à *Streptococcus pneumoniae* soit 6,5%, 5 à *Haemophilus influenzae type b* soit 2,9%.

Sur 225 échantillons mis en culture, 3 étaient positifs à *Streptococcus pneumoniae* soit 1,3% et 1 à *E.coli* et *Citrobacter freundii* soit respectivement 0,4%.

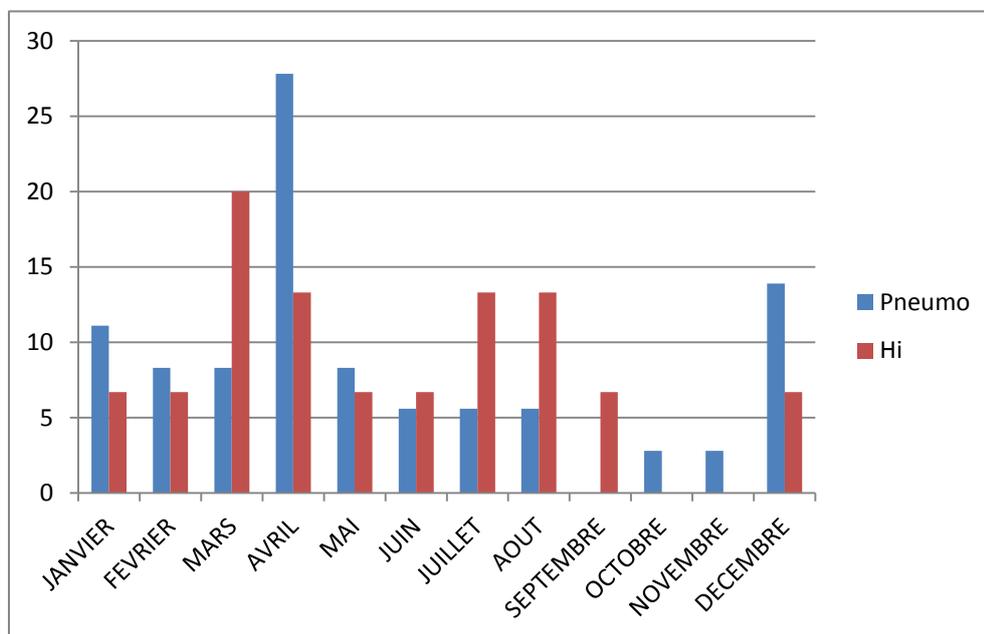
La PCR en temps réel réalisé sur 225 échantillons, a détecté 36 cas de méningite à *Streptococcus pneumoniae* soit 16,0% ; 12 cas à *Haemophilus influenzae b* soit 5,3%, 2 cas à *Haemophilus influenzae non b* soit 1,3% et 2 cas à *Neisseria meningitis*( non A, non B, non C, non W135, non X et non Y) soit 0,9% ; 2 cas de Nm W135 et NmX soit respectivement 0,9%.

**Tableau XVII : Répartition des germes identifiés selon la fréquence**

<b>Caractéristiques</b>	<b>Effectifs</b>	<b>Pourcentage%</b>
<b>Positifs (n= 58)</b>		
<i>S. pneumoniae</i>	<b>36</b>	<b>62,1</b>
<i>H. influenzae type b</i>	12	20,7
<i>H. influenzae non b</i>	<b>3</b>	<b>5,2</b>
Nm	7	12,0
<b>Positifs Hi /Pneumo (n=51)</b>		
<i>S. pneumoniae</i>	<b>36</b>	70,6
<i>H. influenzae</i>	15	29,4

Parmi 58 espèces bactériennes identifiées, *Streptococcus pneumoniae* était prédominant (36 cas) soit 62,1% suivi d'*Haemophilus influenzae b* (12 cas) soit 20,7%.

#### 4.2. Cas confirmés de *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*



**Figure 16 :** Répartition mensuelle des cas confirmés de méningite à *Streptococcus pneumoniae* et à *Haemophilus influenzae* par mois

Excepté le mois de septembre, les cas de méningite à *Streptococcus pneumoniae* étaient rencontrés tous les mois de l'année avec une fréquence plus élevée au mois d'avril 27,8%.

Les cas de méningite à *Haemophilus influenzae* étaient rencontrés tous les mois de l'année sauf les mois d'octobre et novembre. La fréquence des cas était plus élevée au mois de mars avec 20%.

**Tableau XVIII:** Répartition des cas confirmés de méningite à *Streptococcus pneumoniae* et à *Haemophilus influenzae* en fonction du sexe l'âge, le statut vaccinal et le type de vaccin.

<b>Caractéristiques</b>	<b><i>S pneumoniae</i></b>	<b><i>H.influenzae</i></b>
<b>Sexe</b>	<b>(n=36)</b>	<b>(n=15)</b>
Féminin	14(38,9)	4(40%)
<b>Masculin</b>	<b>22(61,1)</b>	<b>9(60%)</b>
<b>Tranche d'âge</b>	<b>(n=36)</b>	<b>(n=15)</b>
<b>0 à 6 mois</b>	<b>18(50%)</b>	<b>9(60%)</b>
7 à 12 mois	7(19,4%)	4(26,7%)
13 à 36 mois	8(22,2%)	2 (13,3%)
37 à 60 mois	3(8,3%)	0(0%)
<b>Statut vaccinal</b>	<b>(n=36)</b>	<b>(n=15)</b>
Oui	4(11,1%)	3(20%)
Non	3(8, 3%)	3(20%)
Inconnu	29(80,6%)	9(60%)
<b>Type de vaccin</b>	<b>(n=4)</b>	<b>(n=3)</b>
Pneumo+hib	1(25%)	1(25%)
Hib	1(25%)	0(0%)
Vaccin non connu	2(50%)	2(75%)

Chez les patients de sexe masculin les méningites à *Streptococcus pneumoniae* (61,1%) et à *Haemophilus influenzae* (60,0%) étaient plus fréquentes que chez les patients de sexe féminin. La méningite à *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* étaient plus fréquente chez les patients âgés de moins de 6 mois avec respectivement 50% et 60,0%.

Sur 36 cas de méningite à pneumocoque, 4 soit 11,1% ont été détectés chez les patients ayant reçu le vaccin, 3 soit 8,3% chez les non vaccinés et 29 soit 80,6% chez ceux dont le statut vaccinal n'était pas connu.

Parmi les 4 vaccinés 1 avait déjà reçu le vaccin pneumo/Hib et 1 le vaccin Hib seul et pour 2 le vaccin n'était pas connu.

Sur 15 cas de méningite à *Haemophilus influenzae* confirmés, 3 soit 20% avaient respectivement reçu ou non le vaccin et 9 soit 60% le vaccin n'était pas connu.

**Tableau XIX : Répartition des cas confirmés à *Haemophilus influenzae* en fonction du statut vaccinal et le type de vaccin**

<i>Caractéristiques</i>	<i>Hi non b</i>	<i>Hib</i>
<b><i>Statut vaccinal (n=15)</i></b>		
Oui	2(66,7%)	1(8,3%)
Non	0(0%)	3(25%)
Inconnu	1(33,3%)	8(66,7%)
<b><i>Type de vaccin</i></b>	<b><i>(n=2)</i></b>	<b><i>(n=1)</i></b>
Pneumo+Hib	1(50%)	0(0%)
Vaccin non connu	1(50%)	1(100%)

*Haemophilus influenzae non b* a été identifié chez 2 patients qui étaient vaccinés parmi lesquels 1 avait reçu le vaccin Pneumo+Hib et pour l'autre l'antigène était inconnu.

Par contre 66,7% des souches de *Haemophilus influenzae type b* ont été identifiés chez des patients dont le statut vaccinal était inconnu. Seul 1 cas soit 8,3% était "déclarés vaccinés" et on ignorait le type de vaccin administré.

**Tableau XX :** Répartition des cas des cas confirmés de *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* en fonction du milieu de transport utilisé, qualité et l'aspect macroscopique du LCR.

Caractéristiques	<i>S .pneumoniae</i>	<i>H .influenzae</i>
<b>Milieu de transport</b>	(n=36)	(n=15)
Tube sec	29( <b>80,6%</b> )	<b>13(86,7%)</b>
TI	7(19,4%)	2(13,3%)
<b>Qualité</b>	(n=36)	(n=15)
Adéquat	32( <b>88,9</b> )	<b>12(80%)</b>
Non Adéquat	4(11,1%)	3(20%)
<b>Aspect macroscopique</b>	(n=29)	(n=13)
Clair	11(37,9%)	2(15,4%)
<b>Trouble</b>	<b>12(41,4%)</b>	<b>9(69,2%)</b>
Hématique	4(13,8%)	1(7,7%)
Xanthochromique	2(6,9%)	1(7,7%)

La majorité des espèces de *Streptococcus pneumoniae* (80,6%) et de *Haemophilus influenzae type b* (86,7%) était identifié dans les LCR prélevés en tube sec .

Dans les prélèvements adéquats, la majorité des pneumocoques (88,9%) et *Haemophilus influenzae type b* (80,0%) ont été identifiés.

La majorité des espèces bactériennes a été identifié dans les LCR troubles : *Streptococcus pneumoniae* (41,4%) et *Haemophilus influenzae type b* (69,2%).

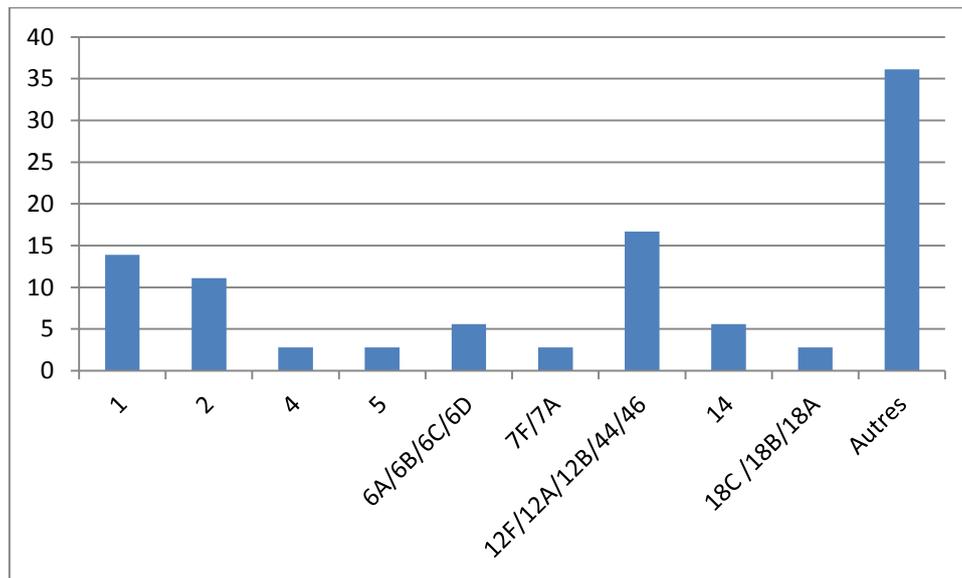
**Tableau XXI : Répartition des sérogroupes/sérotypes de pneumocoque en fonction de leur appartenance au Prevnar 13®.**

<b>Sérotypes de pneumocoque</b>	<b>Effectif</b>	<b>%</b>	<b>Présent dans le Prevnar® 13</b>
1	5	<b>13,9</b>	Oui
2	4	<b>11,1</b>	<b>Non</b>
4	1	<b>2,8</b>	Oui
5	1	<b>2,8</b>	Oui
6A/6B/6C/6D*	2	<b>5,6</b>	Oui*
7F/7A	1	<b>2,8</b>	Oui
<b>12F/12A/12B/44/46</b>	<b>6</b>	<b>16,7</b>	<b>Non</b>
14	2	5,6	Oui
18C /18B/18A**	1	2,8	Oui**
<b>Autres</b>	<b>13</b>	<b>36,1</b>	<b>Non</b>
<b>Total</b>	<b>36</b>	<b>100</b>	

\*sauf 6C/6D ; \*\* sauf 18B/18A, autres ( sérotypes autre que les 21 sérotypes testés )

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

Sur 36 cas de *S. pneumoniae*, les sérogroupes les plus fréquents étaient : autres sérotypes/sérogroupe ou sérotypes/sérogroupe indéterminés 13 cas soit 36,1% et 12F/12A/12B/44/46 6 cas soit 16,7%. Ces sérogroupes ne sont pas inclus dans le Prevnar 13. Le sérotype 1, 5 cas soit 13,9% était le plus fréquent des sérotypes inclus dans le Prevnar 13.



Autres= Sérogroupes/sérotypes non déterminés par la méthode utilisée

**Figure 17 :** Répartition des sérotypes/sérogroupe de pneumocoque selon la fréquence

**Tableau XXII : Répartition des sérotypes/serogroupes de pneumocoque en fonction de la tranche d'âge**

Sérotypes de pneumocoque	Tranche d'âge (Mois)			
	0-6	7-12	13-36	37-60
1	0	1	2	2
2	2	0	2	0
4	1	0	0	0
5	1	0	0	0
6A/6B/6C/6D*	0	1	1	0
7F/7A	1	0	0	0
<b>12F/12A/12B/44/46</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
14	1	1	0	0
18C /18B/18A**	0	1	0	0
<b>Autres</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
Total	18	7	8	3

Les sérogroupes autres (9 cas), 12F/12A/12B/44/46 (3 cas) et le sérotype 2 (2 cas) étaient les plus fréquemment détectés dans la méningite chez les patients âgés de 0 à 6 mois.

**Tableau XXIII** : Répartition des sérotypes/ sérogroupe de pneumocoque en fonction du statut vaccinal des patients.

Sérotypes de pneumocoque	Statut vaccinal		
	Oui	Non	Inconnu
1	2(40%)	1(20%)	2(40%)
2	1(25%)	0(0%)	3(75%)
4	0(0%)	0(0%)	1(100%)
5	0(0%)	0(0%)	1(100%)
6A/6B/6C/6D*	0(0%)	0(0%)	2(100%)
7F/7A	0(0%)	0(0%)	1(100%)
12F/12A/12B/44/46	1(16,7%)	1(16,7%)	4(66,7%)
14	0(0%)	1(50%)	1(50%)
18C /18B/18A**	0(0%)	0(0%)	1(100%)
Autres	0(0%)	0(0%)	13(100%)
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>29</b>

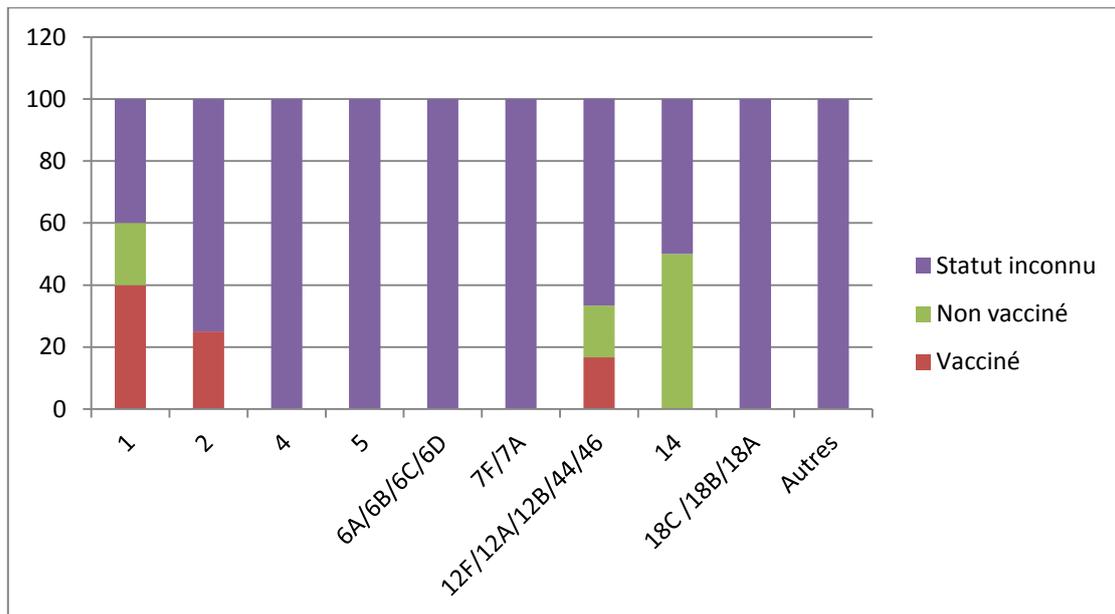
**Les sérotypes/sérogroupe détectés chez les patients vaccinés étaient:**

- sérotype 1: 2/5 soit 40%
- sérotype 2 : 1/4 soit 25%
- sérogroupe 12F/12A/12B/44/46 : 1/6 soit 16,7%.

**Trois sérotypes/ sérogroupe ont été détectés chez les patients non vaccinés :**

- sérotype 2 : 3/4 soit 75% ;
- sérogroupe 12F/12A/12B/44/46 : 4/6 soit 66,7%.

Tous les sérotypes non déterminés (autres) ont été enregistré chez les patients de statut vaccinal inconnu.



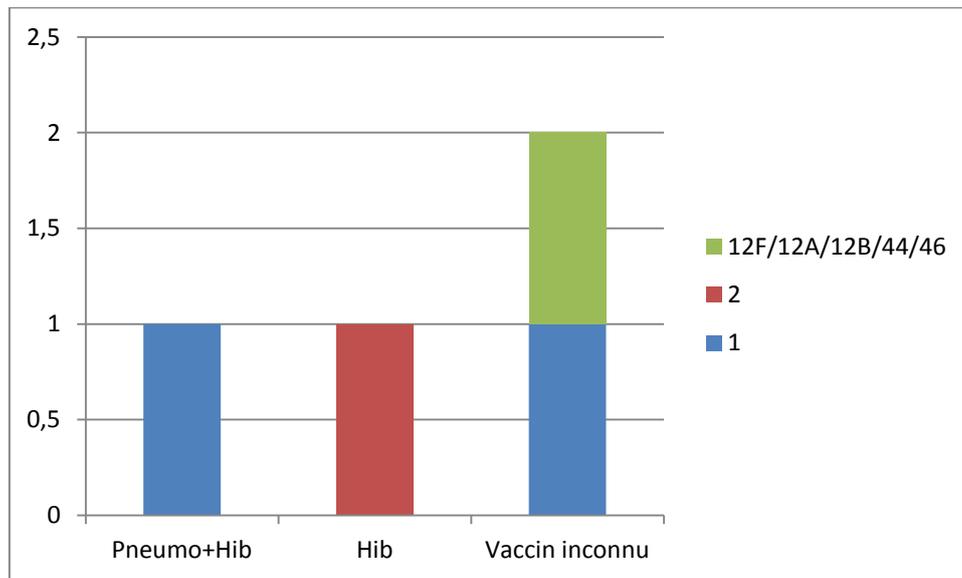
**Figure 18 :** Répartition des sérotypes/sérogroupe de pneumocoque en fonction du statut vaccinal

**Tableau XXIV : Répartition des sérotypes/sérogroupe de pneumocoque en fonction du type de vaccin administré**

<b>Sérotypes de pneumocoque</b>	<b>Hib</b>	<b>Pneumo+Hib</b>	<b>Vaccin non connu</b>
<i>n = 4</i>			
1	0	<b>1</b>	1
<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
4	0	<b>0</b>	0
5	0	0	0
6A/6B/6C/6D*	0	<b>0</b>	0
7F/7A	0	<b>0</b>	0
<b>12F/12A/12B/44/46</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
14	0	0	0
18C /18B/18A**	0	0	0
<b>Autres</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>

Le sérotype 1 a été détecté chez 1 patient ayant reçu le vaccin Hib /pneumo et le sérotype 2 chez 1 patient vacciné avec le vaccin Hib.

Le sérotype 1 et le sérogroupe 12F/12A/12B/44/46 ont été détectés respectivement chez 1 patient dont le vaccin n'était pas connu.



**Figure 19 :** Répartition des sérotypes/sérogroupe de pneumocoque en fonction du type de vaccin.

## 5. COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

Il s'agit d'une étude transversale prospective qui s'est déroulée de janvier à décembre 2014 dans le cadre de la surveillance de la méningite bactérienne pédiatrique. Elle a concerné 225 LCR dont la ponction lombaire a été faite chez des enfants âgés de 0 à 5 ans répondant à la définition de cas suspect de méningite de l'OMS. Elle présente des limites. Le sérotypage du *Streptococcus pneumoniae* a été fait selon le schéma de **Pimenta et al** par la technique de la PCR en temps réel couvrant 21 sérotypes. Les échantillons positifs pour le *Streptococcus pneumoniae* mais négatifs au test de sérotypage pour ces 21 sérotypes ont été classés dans d'autres sérotypes ou sérogroupes. Faute d'amorces et de sondes correspondant, un certain nombre de sérotypes ont été regroupés en groupe de sérotypes et typé comme tel. Les cas d'*Haemophilus influenzae* non b n'ont pas été typés pour les autres sérotypes (a, c, d, e et f) car le laboratoire ne disposait pas de sondes et d'amorces spécifiques pour ce test. En dehors de quelques cas où le carnet de vaccination était disponible avec la précision sur l'antigène administré, les patients considérés comme vaccinés ont été renseignés sur la base de la déclaration des parents.

### 5.1. Résultats généraux

#### 5.1.1. Répartition des patients en fonction de l'âge, le sexe et le statut vaccinal

Les cas suspects de méningite étaient fréquents chez les patients de sexe masculin avec un sexe ratio de **1,47**. Ces résultats sont similaires à ceux de **DIARRA AS.** (45) et **DOUMBIA S.** (46) qui avaient trouvé respectivement un pourcentage de **58,50 %** et **62,3%** en faveur du sexe masculin.

Nous avons constaté que le statut vaccinal des enfants n'était pas renseigné sur les fiches de notification dans la majorité des cas. Sur les 225 cas, 182 avaient un statut inconnu soit **80,9%**. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'au Mali socialement ce sont les mamans qui s'occupent de la vaccination des enfants. Elles sont le plus souvent des ménagères ; donc face à de nombreuses contraintes (manque d'information sur l'importance de la vaccination, file d'attente trop long, heure non convenable par rapport à leurs nombreuses activités du foyer et autres, etc.) ne font pas vacciner (ou pas correctement) leurs enfants ou même si elles le font ; ignorent quel type de vaccin leur enfant a reçu. L'absence de carnet de vaccination est aussi un facteur déterminant car au cours de notre étude, le pédiatre en charge de remplir la fiche

de notification affirme que la plupart des parents se présente sans le carnet de vaccination et affirme l'avoir égaré ou oublié à la maison.

Ce constat est similaire à celui de **DOUMBIA S.** (46) qui trouvait que 80,9% des patients avaient un statut inconnu après l'introduction du vaccin men afrivac pendant 2011-2012

Contrairement à nos résultats, **BAGAYOGO KD.** (47) avait pu examiner la majorité des carnets de vaccination de ses participants soit **91,1 %** en **2007** après l'introduction du vaccin Hib dans le PEV de routine. Cette différence peut s'expliquer par le fait que nos fiches de notification sont remplies à l'hôpital dans un contexte d'urgence c'est à dire que les ponctions lombaires sont faites devant un tableau d'urgence ou les parents amènent l'enfant dans la précipitation sans forcément se munir généralement du carnet et ignore le statut vaccinal de l'enfant. **BAGAYOGO KD.** (47) avait fait une enquête de couverture vaccinale au niveau de 3 quartiers de Bamako chez des **enfants sains de 6 à 7 mois**. De même, **DIARRA F.** (48) avait 79,9% des patients dont le statut était connu soit 98,8% des enfants à jour pour la vaccination. Seulement 8,1% avait leur statut inconnu.

### 5.1.2. Aspect macroscopique

A la macroscopie, le LCR clair était le plus fréquent (**52,9%**) contre seulement 12,4% de LCR troubles. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la définition de cas est plus sensible au niveau des services de pédiatries. Cela est nettement supérieur aux résultats de **DIARRA AS.** (45) qui trouvait aussi plus de LCR clair que trouble avec respectivement 37,3% et 30,9%.

Contrairement au nôtre, **DIARRA F.** (48) trouvait 56,1% de LCR troubles contre 31,1% de LCR clairs.

### 5.1.3. Germes détectés

Le test d'agglutination au PASTOREX a permis de détecter 11/36 cas de *Streptococcus pneumoniae* et 5/12 cas de *Haemophilus influenzae* type b.

La culture a détecté seulement 3 cas de *Streptococcus pneumoniae* soit 1,3%. Nos résultats sont inférieurs à ceux de CISSE (49) à Dakar et DAO (50) à Bamako qui trouvaient respectivement un taux de positivité de 75,4% et 48,16% pour la culture ; 94,36% et 77,21% pour le test d'agglutination au latex.

Cette différence pour la culture pourrait s'expliquer par le fait que **CISSE** et **DAO** ont réalisé leur étude dans des hôpitaux ou un laboratoire est incorporé. Cela permet non seulement la

mise en culture rapide des LCR donc de réduire le délai de transport requis, mais aussi de minimiser les facteurs de risque des pertes de germe dus à la conservation du LCR.

Ce faible taux de positivité de la culture dans notre étude pourrait aussi s'expliquer d'une part par l'antibiothérapie préalable, et d'autre part par les conditions d'acheminement, de conservation des échantillons qui ne sont pas toujours bonnes car les souches de *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* sont très fragiles et supportent mal les écarts de température.

Puisque l'antibiothérapie, n'a pas d'effet sur l'immun-détection par le PASTOREX (les anticorps étant déjà produits), la faible performance ici pourrait être liée à la technique de l'opérateur, à la qualité du Kit utilisé ou la faible concentration en anticorps car il s'agit de sujet de moins d'un an en majorité.

La PCR (en temps réel) avait une bonne performance car elle a permis de détecter une fréquence de souches de *Streptococcus pneumoniae* et d' *Haemophilus influenzae* largement plus élevée que la culture et l'agglutination au latex. Un tel résultat a été obtenu par **OUEDRAOGO A.** (51) au Burkina Faso entre 2004 et 2011..

## **5.2. Résultats *Streptococcus pneumocoque, Haemophilus influenzae***

*Streptococcus pneumoniae* était le germe le plus fréquemment associés à la méningite dans notre étude (36/58 soit 62,1%).

**GOITA D.** (52) en 2004 trouvait des résultats similaires avec *Streptococcus pneumoniae* comme première étiologie des méningites ( 50%). Nos résultats sont légèrement au dessus de ceux de **FONKOUA et col (53)** au Cameroun ; **DOUMBIA A.** (54) et **DIARRA AY. (55)** qui trouvaient respectivement que *Streptococcus pneumoniae* occupait la première place avec 56,2% ; 52,3% et 45,8%.

Par ailleurs au Sénégal **CISSE** (56) avait montré qu'elle occupait la 2<sup>ème</sup> place après *Haemophilus influenzae* avec 31,9%.

*Haemophilus influenzae* était le second germe le plus fréquemment isolé dans les cas confirmés de méningite avec 25,9%.

Nos résultats sont superposables à ceux de **GOITA L.** (38) ; **GOITA D.** (52); **DOUMBIA A.** (54); **FONKOUA et col (53)** qui trouvaient tous que *Haemophilus influenzae* était le second germe le plus isolé des LCR.

Cela peut être expliqué par le fait que le nombre de méningite a considérablement diminué après l'introduction du vaccin pentavalent dans le PEV de routine en dehors de tout contexte épidémique.

Parmi les cas de méningite à *Haemophilus influenzae*, 5,2% sont dus à *Haemophilus influenzae* non b. Le centre national de référence de l'*Haemophilus influenzae* de Toulouse trouvait de 1994 à 1999, 22/119 cas de souches capsulées non b (a, c, e, f) toutes non couvertes par le vaccin, 44/119 souches non capsulées, non typables(57) . **GUILLOT M. et al** (57)ont trouvé 1 cas de méningite à *Haemophilus influenzae* non capsulé réputées non invasives ou la survenue semble liée aux particularités de l'hôte : déficit immunitaire, brèche méningée, susceptibilité génétique, conditions anatomiques particulières (hydrocéphalie valvée avec stase du liquide céphalorachidien), définissant ainsi des profils de risque (57). Dans notre étude, nous n'avons pas pu conclure si les *Haemophilus influenzae* non b sont de type a, c, d, e ou f ou s'ils sont non capsulés.

Les méningites sévissent pendant toute la période de notre étude à part le mois de septembre pour le pneumocoque ; octobre et novembre pour *Haemophilus influenzae*.

Cependant il existait un pic pour les LCR positifs à *Streptococcus pneumoniae* pendant le mois d'avril. Bien que la différence entre les fréquences d'isolement de *Haemophilus influenzae* en fonction du mois soit peu significative, le plus de cas a été enregistré pendant le mois de mars avec 20% contrairement à **BOCOUM T.** (6) qui enregistrerait une recrudescence de *Haemophilus influenzae* pendant le mois d'avril en 2011.

**ZOGOI B.** (58) a eu un pic d'isolement pour *Streptococcus pneumoniae* pendant le mois de janvier tandis que **KY BP.** (59) a eu des moments de pic différents en fonction de l'année : 2005 pendant février et juin ; février et avril en 2006 ; décembre en 2007 et avril en 2008 .

Cette alternance pour les mois de pic concorde avec la littérature qui dit que le pneumocoque sévit aussi bien en saison fraîche qu'en saison sèche.

Le sexe masculin était le plus représenté avec 61,1% pour le pneumocoque et 60% pour *Haemophilus influenzae*. La fréquence d'isolement était élevée chez les enfants de moins de 6 mois soit 50% pour le pneumocoque et 60% pour *Haemophilus influenzae*. **ABOMO OBAMA EL.** (60) à Yaoundé trouvait un sexe ratio de 3,0 en faveur du sexe masculin et une fréquence élevée des cas de *Streptococcus pneumoniae* chez la tranche d'âge de 2 à 23 mois.

La prédominance de l'affection chez la tranche d'âge de 0 à 6 mois pourrait s'expliquer par l'immaturation du système immunitaire qui s'installe au fur et à mesure de l'âge, la sensibilité

des nourrissons aux infections oto-rhino-laryngologiques constituant en effet la porte d'entrée des germes responsables de la méningite et l'existence d'un grand nombre de nourrissons ne recevant pas les vaccins.

La majorité des pneumocoques a été identifiés chez des patients de statut inconnu soit 80,6% contrairement à **OBOMO OBAMA EL.** (60) à Yaoundé qui trouvait que 66,7% des enfants qui ont fait la méningite à pneumocoque après l'introduction du vaccin 13-valent n'était pas vaccinés.

Les 2/3 des souches d' *Haemophilus influenzae non b* étaient isolées chez des patients vaccinés dont l'un avait reçu les vaccins contre le Hib et le pneumocoque ; on ignorait le type de vaccin administré pour l'autre.

Cela pourrait s'expliquer par le fait que le vaccin ne couvre que les *Haemophilus influenzae* de type b. Guillot M. et al (60) trouvaient en France que l'excellente couverture vaccinale en 2001 après l'introduction du vaccin contre *Haemophilus influenzae* type b n'aboutissait pas comme on aurait pu le craindre, à une variation de la fréquence des souches capsulées non b (a, e, f) ni des souches non capsulées, qui présentent une incidence équivalente à celle qui prévalait avant la généralisation de la vaccination par le vaccin conjugué anti-*Haemophilus* de type b.

*Haemophilus influenzae type b* a été isolé chez un seul patient déclaré vacciner dont on ignorait le type de vaccin administré.

Le statut vaccinal étant renseigné sur déclaration orale, on pourrait être amené à douter du statut vaccinal ou de la qualité du vaccin. L'enfant pourrait être également incorrectement vacciné.

**Guillot M.** et al (57) trouvaient qu'en dépit d'une couverture vaccinale excellente, il existe une persistance de la méningite à *Haemophilus influenzae* de type b limitée mais réelle liée à la pérennisation d'une circulation de la bactérie dans les populations, par le biais de portages nasopharyngés chroniques et l'existence de sujets sensibles: enfants non ou insuffisamment vaccinés, non répondeurs ou trop jeunes pour subir la vaccination complète. La vaccination ne permet donc pas une éradication totale des méningites à *Haemophilus influenzae* capsulées de type b, même si l'on peut parler d'un effondrement de l'incidence.

Par contre **OUEDRAOGO A.** (51) trouvait qu' aucun enfant vacciné contre le Hib n'avait fait la maladie.

Les sérotypes de pneumocoque les plus fréquents au Mali n'étant pas inclus dans le vaccin administré dans le PEV de routine et le contexte non épidémique de l'étude pourrait expliquer la prépondérance du pneumocoque malgré l'introduction du vaccin qui devrait normalement faire baisser la fréquence. La majorité des sérotypes isolés n'était pas incluse dans le Prevnar®13 (63,9%) notamment ceux qui n'ont pas pu être déterminés par notre méthode 36,1% ; et des sérogroupes /sérotypes 12A/12B/12F/44/46 et 2 (respectivement 16,7% et 11,1%).

Ces résultats sont différents de ceux de Campbell et al (41) qui trouvait une plus grande fréquence pour le sérotype 5 soit 54% entre 2002 et 2003 dans un site sentinelle de l'Hôpital Gabriel Touré au Mali contre 2,7% dans notre étude. Par contre ils ont trouvé 14% pour le sérotype 2 ce qui est légèrement plus élevé que nos résultats.

**MARIKO R.**(61) trouvait des résultats similaires avec 50 % de sérotype 5 suivi du sérotype 7 F 14,8 %. Elle trouvait également 9,3% de sérotype 2.

**Ramdani-Bouguessa N.** et al avaient trouvé des résultats légèrement inférieurs mais superposables en Algérie avec plus de sérotype 5 (12%) (62) entre 1996 et 2000.

Cette différence dans notre étude pourrait s'expliquer au Mali par la diminution du sérotype 5 due à l'effet du vaccin introduit en 2011 au Mali. Aussi par le fait que notre échantillonnage n'a concerné que les cas de méningites. Nous n'avons pas évalué l'impact de la vaccination sur la survenue de pneumonies aussi très fréquente chez la même couche de la population.

Respectivement 25% et 16,7% des sérotypes 2 et 12A/12B/12F/44/46 ont été isolés chez des patients vaccinés. Cela s'explique aisément puisqu'ils ne sont pas inclus dans le vaccin du PEV de routine au Mali. Le reste était chez des patients à statut vaccinal inconnu.

Le pneumocoque sérotype 1 bien qu'inclus dans le vaccin du PEV a été isolé chez 2/5 des patients vaccinés soit 40% dont l'un avait reçu le vaccin contre le pneumocoque.

Ceci pourrait être dû au fait que l'enfant n'a pas été vacciné correctement, complètement ou à la qualité du vaccin qui peut être mauvaise à cause des conditions de conservation, ou simplement il s'agit d'enfant non répondeur dont la proportion n'est pas connue au Mali.

## 6. RECOMMANDATIONS

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

### Aux personnels des hôpitaux et des différents districts sanitaires

- . Respecter les directives pour le conditionnement et le transport des LCR dans les meilleures conditions vers le laboratoire national de référence de la méningite (INRSP).
  - . Renseigner tous les items des fiches de notification individuelles lors de l'envoi des LCR en particulier la rubrique statut vaccinal.
  - . Faire accompagner tout LCR prélevé d'une fiche de notification lors de l'acheminement vers le laboratoire national de référence de la méningite (INRSP).
- Sensibiliser les parents à faire vacciner les enfants selon le calendrier vaccinal.

**Garder soigneusement les carnets de vaccination** des enfants et s'en munir chaque fois qu'ils se rendent dans une structure sanitaire.

### A l'INRSP

- . Mettre en place la technique de PCR classique pour l'identification d'autres sérotypes de pneumocoque.
- . Poursuivre l'étude en renseignant mieux les cas *Haemophilus influenzae* non b.
- . Partager les résultats de cette étude avec les services d'immunisation et les districts sanitaires.

### Au Programme Elargi de Vaccination(PEV)

- . Exploiter les résultats de cette étude
- . Veillez à l'informatisation des données du PEV pour faciliter la traçabilité des statuts vaccinaux des enfants.

### A l'OMS et au CDC

. Continuer d'appuyer l'INRSP :

- ✓ Dans la formation sur les techniques de PCR en temps réel dans le diagnostic des méningites bactériennes vues les limites de la bactériologie classique
- ✓ Dans l'acquisition des réactifs et consommables pour le typage d'*Haemophilus influenzae* non b et de *Streptococcus pneumoniae* (PCR conventionnelle)

## 7. CONCLUSION

Les méningites bactériennes pédiatriques restent l'une des causes importantes de mortalité et de morbidité chez les enfants de moins de 5 ans. Elles restent un sérieux problème de santé publique malgré les différents progrès faits dans ce domaine.

La détermination des sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* circulant au Mali a permis d'identifier des sérotypes qui ne sont pas inclus dans le vaccin actuellement utilisé par le programme élargi de vaccination PEV (Prevnar13) d'où la nécessité de poursuivre cette étude pour déterminer la prévalence des différents sérotypes de pneumocoque associés à la méningite bactérienne pédiatrique. L'existence d'*haemophilus influenzae non b* mériterait des investigations poussées, pour mieux étayer ces cas.

## 8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Lapeyssonnie L.** Cerebrospinal Meningitis in Africa. 1963;28:1-114 Epub Bull World Health Organ.1963;28 Suppl:1-114
2. **Harrington SM, Stock F, Kominski AL, Campbell JD, Hormazabal JC, Livio S, et al.** Genotypic analysis of invasive *Streptococcus pneumoniae* from Mali, Africa, by semiautomated repetitive-element PCR and pulsed-field gel electrophoresis. Journal of clinical microbiology. 2007;45(3):707-14. Epub 2006/12/29.
3. **Cutts FT, Zaman SMA, Enwere G, col.** C-reactive protein and procalcitonin in the evaluation of the efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine in Gambian children. Tropical Medicine and international Health. Mai 2008;13(5):603-11. Epub 6 MARS 2008.
4. **Mahamadou A.** Strategie de surveillance de la méningite au laboratoire national de référence de Bamako avant l'introduction du vaccin conjugué: FMPOS; 2010.
5. **Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H.** Bactériologie clinique. 3 ed2000. 602 p.
6. **Bocoum T.** Etude de l'infection à *Haemophilus influenzae type b* en 2008 après l'introduction de vaccin anti-Haemopilus type b chez les enfants de 0-15 ans hospitalisés dans le service de pédiatrie du CHU GABRIEL TOURE: FMPOS; 2011.
7. **Bentley RW, Leigh JA, Collins MD.** Intragenic structure of Streptococcus on comparative analysis of small subunit rRNA sequences. intJSystBacteriol. 1991;41:487-94.
8. **Schleifer KH, Killper-Balz R.** Molecular and chemotaxonomy approaches to the classification of Streptococci,Enterococci,Lactococci. ReviewSystApplMicrobiol. 1987;10:1-19.
9. **Hardie JM, Willey RA.** Recents developments in Streptococcal taxonomy,their relation with infections. revMedMicrobiol. 1994;5:151-69.
10. **Bergey.K.** Killian bergey'manuel. 1994.
11. **Avril JL.** Bactériologie clinique. 3ème Ellipses edition Marketing ed2000.
12. [WWW.Infectiologie.ORG](http://WWW.Infectiologie.ORG). 2014 [10/05/14].
13. **Horaud T, Lebouguenec C.** *Streptococcus pneumoniae* Bacteriologie Médicale. p. 817-8.
14. **Henrichsen J.** Sixnewly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. JClinmicrobiol. 1995;33:2759-62.
15. **Park IH, al.** Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol,. 2007;45(4):1225-33.
16. **Bratcher PE, al.** Production of a unique pneumococcal capsule serotype belonging to serogroup 6. Microbiology. 2009 155(2):576-83.
17. **Rieux V.** Les facteurs de virulence de *Streptococcus pneumoniae*. Medecine et maladies infectieuses. 2002;32 suppl1:1-2.
18. **Paolis F, Beghetto E, Spadoni A, Montagnani F, Felici F, Ogioni MR, et al.** Identification of a human immunodominant B-cell epitope within the immunoglobulin A1 protease of *Streptococcus pneumoniae*. BMC Microbiology. 2007;7:113.
19. **Van der PT, Opal SM.** Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. THE LANCET. 2009;374(9700):1543-56. Epub 29 Octobre 2009.
20. **Alonsodevelasco E, Verheul AF, Verhoef J, Snippe E.** *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. Microbiol Mol Biol Rev. 1995;59:591-603. Epub 1 décembre 1995.

21. **Gastinel P, Fasquelle R, Nevot A, Nicolle P, col.** Précis de bactériologie. 2ème édition refondu, Paris ed1957.
22. **Jaeger F, Leroy J, Estavoyer JM, Hoen B.** Infection à *Haemophilus influenzae type b*. Encyclopédie Médico-chirurgicale Maladies infectieuses. Elsevier ed. Paris1999. p. 6.
23. **Gilbert GL.** Epidemiology of *Haemophilus influenzae type b* disease in Australia and New Zealand. Vaccine Department of Microbiology and Infectious Disease, Royal Children's Hospital, Flemington Rd, Parkville, Victoria 3052, Australia. 1991;9(1):S10-S3. Epub 10 ovembre 2002.
24. **Fernandez J, Levine OS, Sanchez J, Balter S, col.** Prevention of *Haemophilus influenzae type b* colonization by vaccination in 2000: correlation with serum anti-capsular IgG concentration. The journal of infectious diseases. 2000;182(5):1553-6.
25. [WWW.CHU-ROUEN](http://WWW.CHU-ROUEN). 2015 [Date de consultation le 13/07/2015].
26. [WWW.CDC.GOV](http://WWW.CDC.GOV). 2015 [Date de consultation le 13/07/2015].
27. [WWW.GOOGLE.FR](http://WWW.GOOGLE.FR). 2014 [Date de consultation 20/05/2014].
28. **Gastinel.P, Fasquelle.R, Nevot.A, Nicolle.P, col.** Précis de bactériologie. 2ème édition refondu, Paris ed1957.
29. **Leminor L, Veron M.** Bactériologie médicale. 2 ed1989 1er janvier 1989.
30. **Imbert P, Rapp C, Dot JM, Debord T, Roué R.** Médecine et maladies infectieuses, Service des maladies infectieuses et tropicales; hôpital d'instruction des armées. Bégin, 69, avenue de Paris, 94160 Saint-Mandé, France2001. 723-4 p.
31. **Nassif X.** Physiopathologie des méningites purulentes. Med Mal Infect. 1996;26 1016 21.
32. **Tunkel AR, Scheld WM.** Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. Clin Microbiol Rev. Avril 1993;6(2):118-36.
33. **Farley MM, Stephens DS, Brachman PS, Harvey RC, col.** Meningitis surveillance Group-Invasive *Haemophilus influenzae* disease in adults, a prospective population based-surveillance. Ann intern Med. 1992 May 15;116(10):806- 12.
34. WHO. Gestion des épidémies de méningite en Afrique : guide de référence rapide à l'intention des autorités sanitaires et des soignants2010.
35. **Denis F, Ploy MC, Christian M, Bingen E, Quentin R.** Bactériologie Médicale, techniques usuelles. 2 ed 11/2011.
36. **Bernard I.** Les méningites bactériennes Progrès dans le développement de vaccin Global Programme for vaccine and immunization. 2012:90.
37. **Denis F.** Apport des données microbiologiques dans le diagnostic étiologique bactérien des méningites purulentes. Medecine Maladies Infectieuses. 1996;26:1060-7.
38. **Goita L.** Les méningites purulentes de l'enfant. Fréquence, aspects cliniques, étiologiques, thérapeutiques et évolutifs. Bamako: FMPOS; 2003.
39. **Borel T, Rose AMC, 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. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene. 2006;100:964-9.
40. **Kane AM.** Aspect épidémiologiques et bactériologique des méningites purulentes au Mali de 1979 à 1999. Bamako: FMPOS; 2003.
41. **Campbell JD, Sow SO, Levine MM, Kotloff KL, Tapia M, Keita MM, et al.** Invasive Pneumococcal Infections Among Hospitalized Children in Bamako, Mali. Pediatric Infectious Disease Journal. 2004;23(7):642-9.

42. **Pimenta FC, Roundtree A, Soysal A, Bakir M, du Plessis M, Wolter N, et al.** Sequential triplex real-time PCR assay for detecting 21 pneumococcal capsular serotypes that account for a high global disease burden. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(2):647-52. Epub 2012/12/12.
43. **OMS.** Guide nationale et procedure operationnelle standard pour la surveillance cas par cas de la méningite au Mali 2010.
44. **Lee LG, Connel CR, Bloch W.** Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Research*. 1993.
45. **Diarra AS.** Etude comparative de la PCR classique et la PCR en temps réel dans le diagnostic des méningite à *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*. Bamako: FMPOS; 2014.
46. **Doumbia S.** Aspects épidémiologique et bactériologiques de la méningite dans le district de Bamako avant et après l'introduction du MenAfrivac. Etude comparative de données des périodes (2009-2010) et (2011-2012). Bamako: FMOS; 2013.
47. **Bagayogo KD.** Détermination du taux d'anticorps anti-*Haemophilus influenzae type b* (Hib) dans le serum et enquête de couverture vaccinale chez les enfants âgés de 6-7 mois à 18 mois ( janvier 2007) après l'introduction du vaccin Hib dans le district de Bamako, Mali. Bamako: FMPOS; 2010.
48. **Diarra F.** Facteurs pronostiques et devenir des enfants atteints de méningite bactérienne dans le departement de pédiatrie du CHU GABRIEL TOURE de 2009 à 2010. Bamako: FMPOS; 2012.
49. **Cisse MF.** The elimination of *Haemophilus influenzae type b* meningitis following conjugate vaccine introduction in Senegal. *Vaccine impact in Senegal. the pediatric infectious disease*. 2010:1-5.
50. **Dao S, Col.** Aspects épidémiologiques des méningites purulentes au Mali 2008.
51. **Ouedraogo A.** Méningite à *Haemophilus influenzae type b*: impacts de la vaccination en milieu pédiatrique au centre hospitalier universitaire YALGADO OUEDRAOGO (CHUYO). Ouagadougou 2012.
52. **Goita D.** Emergence de *Neisseria meningitidis* W135 en Afrique: cass du Mali du 1er janvier 2000 au 30 juin 2004. Bamako: FMPOS; 2005.
53. **Fonkoua MC, Sorlin P.** Les méningites d'étiologie bactérienne à Yaoundé (Cameroun) de 1990-2000. *BULLSOCPATHOL*. 2001;94:300-3.
54. **Doumbia A.** Méningites aiguës purulentes chez les enfants de 1 mois à 5 ans hospitalisés dans le service de pediatrie du CHU GABRIEL TOURE. BAMAko: FMPOS; 2005.
55. **Diarra AY.** Etude epidemio-clinique des méningites bactériennes dans le service de pédiatrie du CHU GABRIEL TOURE du 1er janvier 2008 au 31 décembre 2009. Bamako: FMPOS; 2010.
56. **Cisse MF, Sow HD, col.** Bacterial meningitis in pediatric hospital in tropical zon. *med tropical*. 1989:265-9.
57. **Guillot M, Eckart P, Amiour M, El-Hachem C, Paris C, Dabernat H.** Méningite bactérienne à *Haemophilus influenzae* : le risque résiduel ; à propos d'un cas. *Archive pédiatrique* 2001;8:1082-5.
58. **Zogoi B.** Aspects épidémiologiques de la méningite à *Streptococcus pneumoniae* au Mali du 1er janvier 1998 au 31 décembre 2004 à propos de 321 cas. Bamako: FMPOS; 2006.

59. **Ky BP.** Fréquence de l'isolement de *Haemophilus influenzae* type *b* au CHU GABRIEL TOURE avant et l'introduction du vaccin pentavalent dans le PEV. Bamako: FMPOS; 2009.
60. **Abomo obama EL.** Effet du vaccin antipneumococcique conjugué 13-valent sur l'incidence relative de la méningite à pneumocoque chez les enfants de 2- 59 mois à Yaoundé. Health sciences and diseases. 2013.
61. **Mariko R.** Caractères bactériologiques et place des *Streptococcus pneumoniae* dans les infections bactériennes invasives chez les enfants hospitalisés dans le service de pédiatrie de l'Hopital Gabriel Touré Bamako: FMPOS; 2004-2005.
62. **Ramdani-Bouguessa N, Rahal K.** Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Algiers,. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2003;47(2):824–6. Epub 2003/01/25.

## 9. ANNEXES

### 9.1. Instructions d'utilisation des milieux de transport TI

#### 9.1.1. Orientations pour l'utilisation des milieux TI, pour la conservation et le transport des méningocoques et autres germes responsables de méningites bactériennes aigües présents dans le LCR.

Le milieu T-I est un milieu diphasique qui permet la culture primaire de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* et *H. influenzae* à partir de prélèvements de LCR et de sang. Il peut alors être utilisé comme milieu de culture, de conservation et de transport.

Les flacons de milieu T-I peuvent être conservés et utilisés pendant au moins 2 ans s'ils sont bien fermés et stockés à 4 °C. Au réfrigérateur, la phase liquide devient gélatineuse mais redevient liquide à la température ambiante.

Le milieu T-I a été conçu pour assurer la conservation et le transport des germes responsables de méningite bactérienne, des localités où l'identification par la culture est impossible vers les laboratoires plus spécialisés.

Pour permettre au milieu T-I de jouer pleinement son rôle, il est indispensable d'éviter les contaminations en :

- Appliquant les mesures d'asepsie pendant le prélèvement du LCR et pendant son inoculation dans le flacon,
- En réduisant au maximum le délai entre le prélèvement du LCR et son inoculation dans le milieu TI (30 minutes au maximum).

#### 9.1.2. Méthode d'inoculation du milieu T-I

Il faut :

- Retirer le flacon de Trans-Isolate (T-I) du réfrigérateur au moins 30 minutes (pour permettre à la phase liquide qui était gélatineux de redevenir liquide) avant d'inoculer le prélèvement de LCR. Ceci permet de réchauffer le flacon à la température ambiante et favorise la prolifération des organismes.
- Avant inoculation, regarder s'il y a une prolifération microbienne visible dans le flacon ou si le milieu est trouble. En cas de prolifération visible ou turbidité, jeter le flacon car il peut être contaminé.
- Soulever l'opercule situé au milieu de la capsule métallique fermant le flacon de T-I.
- Désinfecter 2 fois le bouchon du flacon de T-I à l'alcool à 70°C ou à l'iode.

- Laisser sécher à chaque fois (30 à 60 secondes en général)
- Aspirer 0,5 à 1 ml de LCR contenu dans le tube, à l'aide d'une seringue montée stériles (21G de préférence).
- Injecter le LCR dans le flacon de T-I à travers le bouchon désinfecté et sec, l'injection du LCR dans une zone stérile minimise le risque de contamination.
- Etiqueter le flacon de T-I en portant sur l'étiquette les informations relatives :

à l'identité du malade, au service ou à la formation sanitaire ayant effectué le prélèvement, à la date et l'heure du prélèvement, au numéro de l'échantillon si c'est nécessaire.

- Conserver le flacon T-I ensemencé et le restant du LCR, à la température ambiante et à l'abri de la lumière.

### **9.1.3. Transport des échantillons de la formation sanitaire au laboratoire du district**

Assurer le transport des flacons T-I ensemencés à la température ambiante et dans un emballage clos pour réduire au maximum les risques de contamination.

**Ne pas oublier de joindre les fiches de notification et le tube contenant restant du LCR.**

#### **9.1.3.1. Traitement des flacons T-I au niveau du laboratoire du district**

La procédure à suivre dépendra du temps nécessaire pour que les flacons T-I arrivent au Laboratoire de référence où la culture et l'isolement seront effectués.

Si les flacons de T-I **ne peuvent pas** arriver au Laboratoire de référence en moins de 48 heures :

- Ventiler le flacon de T-I au moyen d'une grosse aiguille cotonnée stérile. L'aiguille ne doit pas toucher le milieu de culture.
- Conserver le flacon debout à la température ambiante. Eviter la lumière directe, la chaleur excessive et la poussière.

Si les flacons de T-I peuvent arriver au Laboratoire de référence en moins de 48 heures , envoyer les flacons T-I sans ventilation

#### **9.1.4. Transport des flacons T-I ensemencés du laboratoire du district au laboratoire de référence**

- Avant de transporter le flacon, retirer l'aiguille cotonnée. Ceci évitera les fuites et la contamination pendant le transport.

**Caractérisation des souches de Pneumocoque et d'*Haemophilus influenzae* responsables de méningites chez les enfants de 0 à 5 ans après l'introduction du Pentavalent et du Prevnar 13® au Mali**

- Assurer le transport à la température ambiante dans un emballage clos réduisant au maximum les risques de contamination. **Ne pas oublier de joindre la fiche de notification.**

**2. Fiche de notification révisée**

Région : _____		District: _____		Formation Sanitaire : _____	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Choléra	Diarrhée avec	Draconculose	Fièvre Hém.	Fièvre J.	Diphtérie
					Méningite
					PFA
					Rougeole
					TNN
					Sang/Shigella
Autres: _____					
<b>Assigné par le District :</b>					
N° EPID : _____					
_____	_____	_____	_____	_____	_____
<small>Région</small>	<small>District</small>	<small>Année</small>	<small>Cas n°</small>	<small>Date d'arrivée à la DRS</small>	<small>Date d'arrivée Niveau national</small>
Nom (s) du patient : _____		Date : ____/____/____		Age : _____	
naissance* : ____/____/____		(si DN)		Ans _____ Mois _____	
<small>(Nom pas nécessaire en cas de SIDA)</small>				<small>(Jours et TNN) (Si &lt; 12 mois)</small>	
Résidence du patient : Village /voisinage _____			Sexe : <input type="checkbox"/> F - Féminin / M - Masculin		
Ville / Canton : _____		District de résidence : _____		<input type="checkbox"/> U - Urbain / R - Rural	
Information sur la localisation : _____					
<small>Si possible Nom de la mère et du père si nouveau-né ou enfant</small>					
Date de consultation à la formation sanitaire : ____/____/____		<small>Pour les cas de Fièvre Jaune, Méningite, Rougeole et TNN (TT chez la mère)</small> 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"/>		<small>Four Hib, pneumo, Fièvre Jaune, Rougeole et TT vérifier sur la carte de vaccination. Pour Méningite Nm par histoire</small>			
Date de notification au DS par la formation sanitaire : ____/____/____		Date de la dernière vaccination ____/____/____			
		<small>Seulement pour Fièvre Jaune, Méningite, Rougeole et TT (chez la mère)</small>			

**Caractérisation des souches de Pneumocoque et d'*Haemophilus influenzae* responsables de méningites  
chez les enfants de 0 à 5 ans après l'introduction du Pentavalent et du Prevnar 13® au Mali**

---

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- Exclé 4- Suspect		
Agent ayant rempli le bulletin : _____		Date d'envoi du bulletin au DS : ____/____/____
(email et tel)		
Si échantillon est prélevé		
<small>Pour unité assistante : si échantillon de laboratoire prélevé, compléter l'information suivante. Envoyer une copie de ce bulletin au laboratoire avec l'échantillon</small>		
Date de prélèvement : ____/____/____		Heure du prélèvement : ____/____/____
Date d'envoi du prélèvement au laboratoire : ____/____/____		Type de prélèvement : Selles <input type="checkbox"/> Sang <input type="checkbox"/> LCR <input type="checkbox"/> 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 <input type="checkbox"/> Non Adéquat <input type="checkbox"/>
Maladie	Type de Test	Résultats
Choléra	Gram	.....
	Culture	.....
	Méthode Examen	Direct Utilisé
Méningite		
Liquide céphalo-rachidien (LCR) : Trouble <input type="checkbox"/> Clair <input type="checkbox"/> Hémorragique <input type="checkbox"/> Xanthochromique <input type="checkbox"/>		
Gram : DGN <input type="checkbox"/> DGP <input type="checkbox"/> BGN polymorphe <input type="checkbox"/> Autres à préciser : _____		
Latex : Positif <input type="checkbox"/> Négatif <input type="checkbox"/>		
Si positif : NmA <input type="checkbox"/> Nm C <input type="checkbox"/> Nm B <input type="checkbox"/> Nm Y / W135 <input type="checkbox"/> NmX <input type="checkbox"/> NmY <input type="checkbox"/> Pneumo <input type="checkbox"/> Hib <input type="checkbox"/>		
Autres à préciser : _____		
Laboratoire envoyant les résultats : _____		Autres tests en attente : _____

**Caractérisation des souches de Pneumocoque et d'*Haemophilus influenzae* responsables de méningites chez les enfants de 0 à 5 ans après l'introduction du Pentavalent et du Prevnar 13® au Mali**

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 MERCIERS 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	+ -	Rougeole	IgM	+ -
Méningite	Gram		Rubéole	IgM	+ - Détection du Virus
<i>N. meningitidis</i>	Culture	+ -	RVF	IgM	+ - + -
<i>S. pneumoniae</i>	Culture	+ -	Ebola	IgM	+ - + -
<i>H. influenzae</i>	Culture	+ -	CCHF	IgM	+ - + -
<i>N. meningitidis</i>	Latex	+ -	Lassa	IgM	+ - + -
<i>S. pneumoniae</i>	Latex	+ -	Marburg	IgM	+ - + -
<i>H. influenzae</i>	Latex	+ -			
	PCR	+ -			

Si culture, latex ou PCR positif pour *N.meningitidis* précisez le sérotype : NmA /\_\_\_/ Nm C /\_\_\_/ Nm B /\_\_\_/ Nm W135 /\_\_\_/ NmX /\_\_\_/ NmY /\_\_\_/

Si typage du *S. pneumoniae* est fait, précisez le sérotype : \_\_\_\_\_

Autres germes identifiés à préciser: \_\_\_\_\_

**Caractérisation des souches de Pneumocoque et d'*Haemophilus influenzae* responsables de méningites  
chez les enfants de 0 à 5 ans après l'introduction du Pentavalent et du Prevnar 13® au Mali**

---

Shigella Dysenteriae	Culture	SD type 1 /_/_/	Autres Shigella. _____	Pas Shigella /_/_/	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					

**Figure 20** : Fiche de notification révisée

### 3. Fiche signalétique

**Nom** : Sanogo

**Prénom** : Hawa

**E-mail** : HawaSanogo14@yahoo.fr

**Année de soutenance** : 2015

**Titre de la thèse** : Caractérisation des souches de *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* responsables de méningite chez les enfants de 0 à 5 ans après l'introduction du Prevnar 13® et du Pentavalent au Mali.

**Ville de soutenance** : Bamako

**Résumé** :

**Introduction** : *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* sont respectivement les germes les plus incriminés dans les méningites bactériennes chez les enfants de 0 à 5 ans et cela malgré l'introduction des vaccins correspondants en dehors de tout contexte épidémique. Le but était de caractériser les souches de *Streptococcus pneumoniae* et d'*Haemophilus influenzae* circulant au Mali

**Population et méthode** : Il s'agissait d'une étude prospective réalisée dans le cadre de la surveillance épidémiologique de la méningite au Mali de Janvier à décembre 2014 chez des patients âgés de 0 à 5 suspects de méningite selon la définition de cas de l'OMS. Les souches de *Streptococcus pneumoniae* et d'*Haemophilus influenzae* ont été identifiées et serotypées par les techniques de la bactériologie classique, et par la PCR en temps réels.

**Résultats** : L'étude a concerné 225 patients et le statut vaccinal était inconnu chez 182 patients soit 80,9%. *Streptococcus pneumoniae* était le germe le plus incriminé dans les méningites avec 62,1%. La moitié des patients chez qui il a été identifié était dans la tranche d'âge des moins de 6 mois. Les sérotypes de pneumocoque identifiés étaient : 1, 2, 4, 5, 6A/6B/6C/6D, 7F/7A, 12F/12A/12B/44/46, 14, 18C/18B/18A et d'autres sérotypes non déterminés par la PCR en temps réel. Le sérotype 2,12F/12A/12F/44/46 n'est pas inclus dans le vaccin actuellement utilisé dans le PEV de routine au Mali (Prevnar ® 13) ainsi que les sérotypes non déterminés. *Haemophilus influenzae* était le second avec 25,9% dont 5,2% des *Haemophilus influenzae non b*. Seul 1 patient "déclaré vacciné" chez qui on ignorait le type d'antigène reçu avait fait la maladie. Aussi un seul patient ayant reçu l'antigène contre *Haemophilus influenzae type b* et le pneumocoque a fait la maladie à *Haemophilus influenzae non b*.

**Conclusion :** L'existence de sérotypes non inclus dans le **Pevnar 13®** au Mali ainsi que les *Haemophilus non b* nécessite de poursuivre cette étude pour déterminer la prévalence des différents sérotypes de pneumocoque associés à la méningite bactérienne pédiatrique. Aussi l'existence d'*haemophilus influenzae non b* mériterait des investigations poussées, pour mieux étayer ces cas.

**Mots clés :** *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, vaccination, sérotype, Mali, méningites, enfants de 0 à 5 ans.

## Identification sheet

**Nom:** Sanogo

**Prénom:** Hawa

**E-mail:** HawaSanogo14@yahoo.fr

**Defense year:** 2015

**Title:** Characterization strains of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* meningitis responsible for children 0-5 years after Prevnar 13® and Pentavalent vaccine introduction in Mali.

**Defense country:** Bamako

### Summary

#### Introduction

*Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* are respectively germs the most incriminated in the bacterial meningitises at the children from 0-5 years old it in spite of the introduction of corresponding vaccines except any epidemic context.

#### Population and method

It was about a forward-looking study realized within the framework of the epidemiological supervision of the meningitis in Mali. It extended from January till December, 2014. The LCR was taken at old patient's from 0 to 5 suspects of meningitis according to the definition of case of the WHO. The sociodemographic data were collected thanks to the register of INRSP laboratory of bacteriology and the index cards of notifications revised and updated by the WHO. The stumps of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* were identified by the techniques of the classic bacteriology, identified and serotyped by the techniques of the real time PCR.

#### Results

The study concerned 225 patients to whom a lumbar puncture was made. The vaccinal status was unknown at 182 patients' that is 80, 9 %. *Streptococcus pneumoniae* was the germ the most incriminated in the meningitises with 62, 1 %. Half of the patients to whom it was identified were in the age bracket least than 6 months. The sérotypes of pneumocoque identified were: 1, 2, 4, 5, 6A / 6B / 6C / 6D, 7F / 7A, 12F / 12A / 12B / 44 / 46, 14, 18C / 18B / 18A and sérotypes not determined by the real time PCR. The sérotype 2,12F / 12A / 12F / 44 / 46 are not included in the vaccine at present used in the PEV of routine in Mali:

**Prevnar 13®** as well as the not determined sérotypes because the real time PCR tests 13 sérotypes of Prevnar 13. *Haemophilus influenzae* was the second with 25, 9 % among which 5,2 % of *Haemophilus influenzae not b*. Only 1 patient " declared inoculated " to whom we ignored the type of received antigen had made the disease. So a single patient having received the antigen against *Haemophilus influenzae type b* and the pneumocoque made the disease for *Haemophilus influenzae not b*.

**Conclusion:** The existence of serotypes not included in Prevnar 13® in Mali as well as non *Haemophilus b* requires further study to determine the prevalence of different pneumococcal serotypes associated with pediatric bacterial meningitis. Also the existence of *haemophilus influenzae b* not deserves extensive investigations to better support these cases.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, vaccination, sérotype, Mali, meningitises, children from 0 to 5 years old.

## 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 couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.*

*Je le jure !*