

SIGLES ET ABBREVIATIONS

IRAS : Infections Respiratoires Aiguës Sévères

OMS : Organisation mondiale de la Santé

CERMES : Centre de Recherche Médicale et Sanitaire

CDC : Centre for Disease Control and Prevention

MSP : Ministère de la Santé Publique

DGSP : Direction Générale de la Santé Publique

DPHL : Direction des Pharmacies et Laboratoires

LNRG : Laboratoire National de Référence pour la Grippe

HNN : Hôpital National de Niamey

HNL : Hôpital National de Lamordé

CHR : Centre Hospitalier Régional

HD : Hôpital de district

OMD : Objectifs du Millénaire pour le Développement

CNEN : Comité National d’Ethique du Niger

VIH : Virus de l’Immunodéficience Humaine

ILI : Influenza- Like Illness

MERS-CoV : Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus

SRAS : Syndrome Respiratoire Aiguë Sévère

rRT-PCR : real time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Ct : Cycle threshold (seuil)

IC : Contrôle Interne

PP : Primer and Probe

PC : Contrôle Positif

NC : Contrôle Négatif

ABI : Applied BioSystem

INF A et B : Influenza A et B

PIV : Para influenza virus

RV : Rhinovirus

AV : Adénovirus

VRS : Virus Respiratoire Syncytial

MPV : Métapneumovirus

BV : Bocavirus

EV : Entérovirus

PV : Parechovirus

CV : Coronavirus

M. pneumoniae : *Mycoplasma pneumoniae*

C. pneumoniae : *Chlamydia pneumoniae*

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

S. pneumoniae : *Streptococcus pneumoniae*

Hib : *Haemophilus influenzae*

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

< : Inférieur

> : Supérieur

% : Pourcentage

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Composition du kit FTD 21 Plus.

Tableau II : Préparation du master mix.

Tableau III : Caractéristiques des enfants < 5ans, hospitalisés pour IRAS au Niger.

Tableau IV : Prévalence des virus respiratoires chez les enfants <5 ans, hospitalisés pour IRAS au Niger.

Tableau V : Prévalence des bactéries respiratoires chez les enfants<5 ans, hospitalisés pour IRAS au Niger.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Localisation des sites sentinelles de surveillance de la grippe au Niger.

Figure 2 : Kit Copan pour la réalisation des prélèvements nasopharyngés.

Figure 3: Technique de réalisation du prélèvement nasopharyngé.

Figure 4 : Kit QIAGEN pour l'extraction de l'ARN viral.

Figure 5: Thermocycleur ABI 7500 Fast pour rRT-PCR.

Figure 6: Schéma de plaque pour la réalisation de la PCR avec le kit FTD 21. Plus

Figure 7 : Courbes d'amplification des échantillons analysés.

Figure 8 : Proportion des pathogènes respiratoires détectés en mono infection (N=22) chez les enfants < 5 ans, hospitalisés pour IRAS au Niger.

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Certificat de contrôle de qualité de l’OMS.

ANNEXE 2 : Fiche de consultation des patients pour la surveillance de la grippe au Niger.

ANNEXE 3 : Procédure d’extraction des ARN et ADN à l’aide du kit QIAGEN.

SOMMAIRE

RESUME.....	4
ABSTRACT.....	5
INTRODUCTION	6
PREMIERE PARTIE: GÉNÉRALITÉS.....	8
I. GENERALITE SUR LES ETIOLOGIES VIRALES ET BACTERIENNES DES IRAS.....	9
I.1. ETIOLOGIES BACTÉRIENNES DES IRAS	11
I.2. ETIOLOGIES VIRALES DES IRAS	13
II. ASPECTS MORPHOLOGIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES DES PATHOGENES VIRAUX	
IMPLIQUES DANS LES IRAS.....	15
II.1. INFLUENZA A ET B (INF A ET B).....	15
II.2. PARA INFLUENZA VIRUS (PIV).....	15
II.3. RHINOVIRUS (RV)	16
II.4. CORONAVIRUS (CoV)	16
II.5. VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL (VRS)	16
II.6. MÉTAPNEUMOVIRUS (MPV).....	17
II.7. ADÉNOVIRUS (AV)	17
II.8. BOCAVIRUS (BV).....	17
II.9. ENTÉROVIRUS (EV)	18
II.10. PARÉCHOVIRUS (PV)	18
III. ASPECTS MORPHOLOGIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES DES PATHOGENES BACTERIENS	
IMPLIQUES DANS LES IRAS.....	19
III.1. <i>MYCOPLASMA PNEUMONIAE</i> (<i>M. PNEUMONIAE</i>)	19
III.2. <i>CHLAMYDIA PNEUMONIAE</i> (<i>C. PNEUMONIAE</i>)	19
III.3. <i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i> DE TYPE B (HIB)	20
III.4. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> (<i>S. AUREUS</i>).....	20
III.5. <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> (<i>S. PNEUMONIAE</i>)	20
IV. SURVEILLANCE SENTINELLE DE LA GRIPPE HUMAINE AU NIGER	22

DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX DE TERRAIN ET DE LABORATOIRE	25
I. BUT, HYPOTHESES DE RECHERCHE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	26
I.1. BUT DE L'ÉTUDE.....	26
CONTRIBUER À L'AMÉLIORATION DE LA PRISE EN CHARGE DES IRAS CHEZ LES ENFANTS DE MOINS DE CINQ ANS AU NIGER.....	26
I.2. HYPOTHÈSES DE RECHERCHE	26
I.3. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	26
I.3.1. Objectif général.....	26
I.3.2. Objectifs spécifiques.....	27
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	28
II.1. TYPE D'ÉTUDE.....	28
II.2. CADRE DE L'ÉTUDE	28
II.3. TECHNIQUE DE COLLECTE DES DONNÉES	30
II.4. CRITÈRES D'INCLUSION DES CAS D'IRAS.....	30
II.5. CRITÈRES DE NON INCLUSION	30
II.6. DÉFINITION DES CAS D'IRAS CHEZ LES ENFANTS <5ANS	30
II.7. CALCUL DE LA TAILLE DE L'ÉCHANTILLON	31
II.8. CONSIDÉRATIONS ÉTHIQUES	31
II.9. PRÉLÈVEMENTS.....	32
II.10. EXTRACTION DES ACIDES NUCLÉIQUES (ARN ET ADN)	33
II.11. ANALYSE MOLÉCULAIRE	35
II.11.1. Composition du kit	37
II.11.2. Principe de la méthode :	38
II.11.3. Préparation du master mix	38
II.11.4. Préparation du mélange réactionnel	40
II.11.5. Etapes de réalisation.....	40
II.11.6. Plan de schéma de plaque	41
II.11.7. Programme d'amplification pour la rRT-PCR.....	42
II.11.8. Validation et interprétation des résultats	43
II.11.9 Analyse des données	45

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSIONS	46
I. RESULTATS.....	47
II. DISCUSSION	54
CONCLUSION	60
SUGGESTIONS ET PERSPECTIVES	61
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:.....	62

RESUME

Introduction : Les infections respiratoires aiguës sévères (IRAS) constituent une cause importante de morbidité et de mortalité chez les jeunes enfants avec le plus lourd fardeau en Asie et Afrique subsaharienne. Néanmoins, les données sur les étiologies virales et bactériennes des IRAS sont quasi inexistantes au Niger.

Méthode : Il s'agit d'une étude rétrospective sur les échantillons issus de la surveillance sentinelle de la grippe au Niger entre janvier 2010 et décembre 2012. Une randomisation sur 20 % des prélèvements nasopharyngés collectés chez les enfants de moins de 5 ans, hospitalisés pour IRAS et négatifs aux virus influenza A et B a été réalisée. Les échantillons sélectionnés ont été testés à l'aide du kit Fast Track Diagnostic Respiratory Pathogens 21plus (Biomérieux) qui permet de détecter 23 pathogènes respiratoires dont 18 virus et 5 bactéries.

Résultats : Au total, sur les 160 échantillons testés, 138 (86%) sont positifs à au moins un pathogène (virus ou bactérie) ; 22 (16%) sont des cas de mono infection. Au moins un virus respiratoire a été détecté dans 126 (78%) et au moins une bactérie a été détectée dans 102 (64%) des échantillons. Le virus respiratoire syncytial (56/160; 35%), le rhinovirus (47/160; 29%) et le virus parainfluenza (39/160; 24%) sont les principaux pathogènes viraux. Parmi les bactéries, *Streptococcus pneumoniae* (90/160; 56%) et *Haemophilus influenza* type b (20/160; 12%) prédominent.

Conclusion : Les données de cette étude montrent pour la première fois la circulation des pathogènes respiratoires (virus et bactérie), impliqués dans les IRAS chez les enfants de moins de 5 ans au Niger. La forte prévalence de certains pathogènes viraux et bactériens nous éclaire quant à la nécessité d'envisager une surveillance active de ces pathogènes au Niger pour améliorer la prise en charge et la riposte.

ABSTRACT

Background: Globally, pneumonia is the leading cause of morbidity and mortality in children, with the highest burden experienced in sub-Saharan Africa and Asia. However, there is a dearth of information on the etiology of severe acute respiratory illness (SARI) in Africa, including Niger.

Methods: We implemented a retrospective study as part of the national influenza sentinel surveillance in Niger. We randomly selected 21% of nasopharyngeal samples collected from children (<5 years of age) hospitalized with SARI from January 2010 through December 2012 in Niger. The samples were selected from individuals that tested negative by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (rRT-PCR) for influenza A and B virus. The samples were analyzed using the Fast Track Diagnostic Respiratory Pathogens 21plus Kit (Biomérieux), which detects 23 respiratory pathogens including 18 viral and 5 bacterial agents.

Results: Among the 160 samples tested, 138 (86%) tested positive for at least one pathogen (viral or bacterial) included in the study; 22 (16%) were single detections. We detected at least one respiratory virus in 126 (78%) samples and at least one bacterium in 102 (64%) samples. Respiratory syncytial virus (56/160; 35%), rhinovirus (47/160; 29%) and parainfluenza virus (39/160; 24%) were the most common viral pathogens detected. Among bacterial pathogens, *Streptococcus pneumoniae* (90/160; 56%) and *Haemophilus influenza* type b (20/160; 12%) predominated.

Conclusions: The high prevalence of certain viral and bacterial pathogens among children <5 years of age with SARI highlights the need for expanded surveillance in Niger so as to inform policies and interventions. Selected pathogens should be included for routine surveillance in Niger.

INTRODUCTION

Les infections respiratoires aiguës sévères (IRAS) sont parmi les maladies les plus courantes dans le monde et constituent partout la première ou la deuxième cause de fréquentation des jeunes enfants dans les structures sanitaires (WHO/UNICEF, 2009; Nair *et al.*, 2013). Elles représentent aussi une cause importante de morbidité et de mortalité chez les enfants de moins de cinq ans dans le monde (Bezerra *et al.*, 2011; WHO, 2014) pour avoir fait plus de victimes que le SIDA, le paludisme et la rougeole réunis (Bezerra *et al.*, 2011; WHO, 2014). La mortalité annuelle des enfants de moins de cinq ans liée aux IRAS dans le monde est estimée à 3-4 millions environ, dont plus de la moitié dans les pays en développement (Izadnegahdar *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014).

Huit objectifs du Millénaire pour le développement (OMD) ont été définis, avec des cibles identifiés et un calendrier proposé au niveau mondial, en vue de lutter contre la pauvreté sous ses différents aspects, d'ici 2015. La lutte contre la mortalité des enfants est l'un de ces huit objectifs et porte le numéro 4. Ce dernier vise, en particulier, à réduire de deux tiers, entre 1990 et 2015, le taux de mortalité des enfants de moins de 5 ans. Pour y parvenir, il faut lutter d'urgence contre les infections respiratoires (pneumonie en particulier), responsables de plus de 19% des décès d'enfants de moins de cinq ans (WHO, 2014).

En général, les facteurs de risque des IRAS incluent la malnutrition, le faible poids à la naissance, le tabagisme, l'allaitement exclusif, le faible statut socio-économique, la surcharge environnementale, l'immunodéficience et l'infection par le VIH (Aubry, 2014). Par conséquent, la majorité de la morbidité infantile associée aux IRAS est enregistrée dans les pays en développement.

En Afrique subsaharienne, les IRAS constituent un véritable problème de santé publique chez les jeunes enfants de par la complexité de leur prise en charge d'une part et d'autre part le lourd tribut économique qu'elles engendrent (Enan *et al.*, 2013; Lekana-Douki *et al.*, 2014).

Au Niger où les IRAS sont reconnues comme étant les causes les plus fréquentes de morbidité et de mortalité des enfants âgés de 1 à 15 ans (Cenac *et al.*, 2002), très peu des données les concernant sont publiées. Aussi, selon les rapports nationaux de santé de ces dix dernières années publiés par le Ministère de la santé publique, les IRAS constituent la deuxième cause de mortalité chez les enfants de < 5 ans juste après les gastroentérites et devant même le paludisme (Annuaire statistique de la santé 2012).

PREMIERE PARTIE: Généralités

I. GENERALITE SUR LES ETIOLOGIES VIRALES ET BACTERIENNES DES IRAS

Les IRAS représentent un groupe hétérogène d'infections dues à un grand nombre d'agents étiologiques complexes et divers et affectant toutes les parties du système respiratoire (Feikin *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014). Le mode de transmission primaire des IRAS se fait principalement à travers l'émission des gouttelettes (aérosols), soit directement lors de la toux, l'éternuement, la parole, par le biais de la salive, des postillons, des écoulements du nez, ou soit indirectement par les mains, et parfois les objets souillés (Pica et Bouvier, 2012). En fonction du niveau de l'atteinte de l'arbre respiratoire, les IRAS se répartissent principalement en infections respiratoires aiguës hautes (angines, sinusites, otites, laryngites, etc.) et infections respiratoires aiguës basses (bronchites, bronchiolites et pneumonies),(Aubry, 2014). Les épidémies de Syndrome Respiratoire Aiguë Sévère (dont l'agent étiologique est un coronavirus, le virus SRAS-CoV) en février 2003, de grippe aviaire A(H5N1) en janvier 2004, de grippe A (H1N1) pandémique en avril 2009, nous rappellent la fréquence et la gravité des infections respiratoires aiguës dans le monde (Niang *et al.*, 2010). Récemment encore l'émergence des nouveaux virus respiratoires à savoir le Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus (MERS-CoV) en 2012 et du virus influenza A(H7N9) en 2013 démontre une fois de plus les défis auxquels la communauté scientifique est confrontée (Owusu *et al.*, 2014).

Les étiologies des IRAS ont été assez bien caractérisées dans certaines parties du monde, particulièrement dans les régions tempérées de l'hémisphère nord (Lina *et al.*, 1996; Ucakar *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2014). Elles sont très variées et sont principalement virales mais aussi bactériennes ou mixtes (WHO, 2014).

Cependant les étiologies des IRAS ne peuvent être déterminées que dans 30 à 50% des cas en utilisant seulement les méthodes conventionnelles de diagnostic.

En général la prise en charge des IRAS est initiée sans que les agents étiologiques ne soient biologiquement identifiés (Shafik *et al.*, 2012).

Une étiologie d'IRAS indéterminée aboutit souvent à un usage abusif des antibiotiques, dont une des conséquences est le développement de résistances et surtout des coûts supplémentaires de la prise en charge (Caglayan *et al.*, 2014).

Parmi les infections virales, celles dues aux virus influenza, le virus respiratoire syncytial (VRS), les para-influenza virus (PIV) de types 1 à 4, le métapneumovirus (MPV), le rhinovirus (RV), les adénovirus (AV) et les coronavirus (CV) représentent une proportion significative des IRAS (Zuccotti *et al.*, 2011; Sentilhes *et al.*, 2013; Lekana-Douki *et al.*, 2014). Les infections bactériennes sont majoritairement dues à *Streptococcus pneumoniae* et à *Haemophilus influenzae* (Caglayan *et al.*, 2014). Chez le nourrisson, les infections dominantes sont celles dues au VRS et au rhinovirus (Ucakar *et al.*, 2013; Esposito *et al.*, 2014) et chez les enfants entre 2 et 5 ans, la répartition des IRAS est plus homogène entre les infections à virus influenza, virus respiratoire syncytial, adénovirus métapneumovirus et rhinovirus. A partir de 5 ans, la grippe devient l'infection majoritaire (Lina *et al.*, 1996).

Peu d'attention était portée aux IRAS dans les pays en développement jusqu'à un passé récent, mais de nos jours, beaucoup de ces pays s'intéressent de plus en plus au problème et font preuve d'une forte implication pour lutter contre ces infections.

Les données sur les étiologies des IRAS chez les enfants en Afrique ont connu des changements considérables depuis l'expansion et l'utilisation abusive des antibiotiques (WHO, 1988; Adegbola *et al.*, 1994), mais aussi avant l'avènement des nouvelles techniques de détection telles que les techniques moléculaires qui ont révolutionner la capacité de détection des différents pathogènes notamment viraux (Elisabeth G. *et al.*, 2012; Feikin R. *et al.*, 2013).

Aussi l'introduction récente des vaccins conjugués pour les deux majeures causes bactériennes à savoir *Haemophilus influenzae* de type b et *Streptococcus pneumoniae* dans le programme élargi de vaccination (PEV) dans les pays africains, pourrait aussi conduire à un bouleversement dans la distribution de ces étiologies. En Afrique, plus particulièrement celle au Sud du Sahara, peu d'études ont décrit les étiologies des IRAS dues aux virus autres que l'influenza (Niang *et al.*, 2010; Hoffmann *et al.*, 2012).

Au Niger, les données concernant les agents étiologiques responsables des infections des voies respiratoires sont anciennes, ce qui rend leur prise en charge très présomptive et inappropriée. Seul un Réseau de Sites Sentinelles pour la surveillance de la grippe est animé par le Centre de Recherche Médicale et Sanitaire (CERMES) depuis avril 2009 et fournit des données sur les virus influenza et leurs sous-types circulant dans le pays (Heraud *et al.*, 2012; Jusot *et al.*, 2012).

I.1. Etiologies bactériennes des IRAS

Le rôle des bactéries dans la transmission des IRAS a été largement élucidé depuis plusieurs dizaines d'années. Ceci a permis de développer des traitements antimicrobiens efficaces et disponibles. Les antimicrobiens sont fréquemment prescrits à tort dans le traitement des IRAS bien que la plupart d'entre elles sont d'origine virale. L'insuffisance ou le manque de diagnostic adéquat, pour les cas de co-infections bactériennes et virales rendent la prise en charge difficile (Caglayan *et al.*, 2014). Malheureusement dans les pays en développement, l'usage abusif de ces antibiotiques entraîne parfois des cas de résistance. Selon une étude Britannique, les agents antimicrobiens sont prescrits dans les services d'urgences médicales dans 56,9% des cas de prise en charge des infections respiratoires, représentant ainsi une estimation potentielle de 11,4 millions de prescriptions annuelles (Kronman *et al.*, 2014).

Les infections respiratoires bactériennes peuvent être favorisées par un état fébrile lié à des facteurs tels que la malnutrition, mauvaise condition environnementale et le manque d'un système de santé approprié. Elles sont généralement les causes des infections respiratoires aiguës des voies basses comme les pneumonies et les bronchites. Comparées aux virus, Il existe très peu de bactéries qui sont responsables des complications des infections respiratoires. L'indication de la prévalence des agents bactériens en cause dans les infections respiratoires aiguës montre que *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) est le pathogène le plus souvent à l'origine des infections respiratoires bactériennes (Michelow *et al.*, 2004), suivi par *Haemophilus influenzae* type b (Hib) et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Aydemir *et al.*, 2014).

Selon une étude sur l'incidence de la mortalité due aux bactéries dans les infections respiratoires, on constate une baisse significative dans plusieurs parties du monde qui se justifie essentiellement par l'introduction des vaccins à *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* type b (Hib) avec un impact respectif de 40% et 60% (Izadnegahdar *et al.*, 2013).

D'autres bactéries dite atypiques, *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*), *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) et *Legionella pneumoniae* (*L. pneumoniae*) sont malheureusement impliquées ces dernières années avec une fréquence croissante, mieux dans certaines études elles représentent la proportion majoritaire des bactéries isolées (Maysaa et Goda, 2009).

La culture a été pendant longtemps la méthode de référence pour le diagnostic bactérien dans les IRAS, mais des études ont démontré que les techniques moléculaires (PCR, RT-PCR) ont permis d'optimiser le taux de détection de bactéries au double (64%) comparé à la culture (32%) (Aydemir *et al.*, 2014).

I.2. Etiologies virales des IRAS

Les virus sont les causes majeures des IRAS surtout chez les jeunes enfants qui portent le plus lourd fardeau des maladies respiratoires virales (Pavia, 2011). Ils sont responsables de plus de 70% de cas de complications respiratoires (Feng *et al.*, 2014). Plusieurs centaines de virus peuvent infecter l'organisme humain par voie essentiellement respiratoire. Les virus respiratoires sont généralement transmis par inhalation ou contact direct avec les aérosols ou sécrétions respiratoires (Khor *et al.*, 2012).

Les facteurs environnementaux influençant la transmission d'une infection respiratoire virale sont la température, l'humidité, la pluviométrie et la vitesse du vent (Jusot *et al.*, 2012; Pica et Bouvier, 2012). Les infections respiratoires virales favorisent en générale l'émergence des infections bactériennes (dus aux germes opportunistes) et leur incidence décroît avec l'âge.

Les virus sont généralement les causes des infections respiratoires aiguës basses et depuis 2001, plusieurs nouveaux virus émergents ont été décrits. Ce sont principalement les métapneumovirus (MPV), coronavirus (CoV NL63 et HKU1) et les bocavirus (BV) (Hoffmann *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2014).

Plusieurs études ont démontré que le virus respiratoire syncytial (VRS) est la cause majeure d'infections respiratoires des jeunes enfants dans le monde. Ce virus est très contagieux et infecte principalement les nourrissons âgés de moins de deux ans (Kwofie *et al.*, 2012; Emukule *et al.*, 2014). Les métapneumovirus (MPV), les rhinovirus (RV) et les parainfluenzae virus (PIV) secondent le VRS avec quelques pics saisonniers et des co-infections impliquant plus d'un pathogène viral chez 4-33 % des enfants (Bezerra *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013). L'identification des pathogènes viraux est d'une grande importance pour la prise en charge des patients et la réduction de la transmission des infections nosocomiales ainsi que la maîtrise par certains cliniciens d'une prescription hasardeuse des antibiotiques (Elisabeth G. *et al.*, 2012).

Le site primaire de la réplication virale est l'épithélium cilié des voies aériennes supérieures pour tous les virus. L'excrétion virale se faisant au niveau du nez pendant 4 à 7 jours, les prélèvements à but diagnostique doivent être réalisés dans les 2-3 premiers jours de la maladie. Selon la technique diagnostique mise en œuvre, les prélèvements seront acheminés au laboratoire ou placés dans un milieu de transport spécifique pour virus. Le délai d'acheminement au laboratoire conditionne la qualité des résultats.

La preuve étiologique d'une infection à origine virale est difficile à apporter, les étiologies virales varient en fonction de la géographie, la saison et l'âge des sujets affectés (Gendrel, 2002). Pendant des décennies, le diagnostic viral reposait sur la sérologie et l'isolement viral. Le manque de sensibilité dans la détection des antigènes, le retard lié au rendu des résultats par l'isolement viral et les limites de détection des virus uniquement cultivables ont rendu incomplet le diagnostic des virus respiratoires (Kouni *et al.*, 2013).

La détection et l'identification des virus respiratoires ont cependant été révolutionnées ces dernières années grâce aux nouvelles techniques de détections moléculaires. La technologie moléculaire notamment par la réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (rRT-PCR) a rehaussé le niveau de détection des agents étiologiques viraux (sensibilité et spécificité) ainsi que le développement des amplifications multiplex permet la détection simultanée d'un large panel des virus (Lassauniere *et al.*, 2010; Pretorius *et al.*, 2012).

II. ASPECTS MORPHOLOGIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES DES PATHOGENES VIRAUX IMPLIQUES DANS LES IRAS

II.1. Influenza A et B (INF A et B)

Ce sont des virus à ARN de la famille des *Orthomyxoviridae*. Le type influenza A qui est le plus important est classé en plusieurs sous-types en fonction des propriétés antigéniques de leur hémagglutinine (HA ou H) et neuraminidase (NA ou N). La circulation des virus influenza est saisonnière selon les différentes parties du globe, mais coïncide le plus souvent avec les périodes de température basse ou humide (Tarnagda *et al.*, 2014). Ils sont responsables d'importantes infections virales du système respiratoire de l'adulte et de l'enfant. Les symptômes sont la fièvre, la myalgie, maux de gorge et la toux. Des cas sévères peuvent se manifester surtout chez les jeunes enfants, les personnes âgées et les femmes enceintes. Chez l'enfant, des symptômes de gastroentérites peuvent aussi être présents. La circulation du « swine-lineage » du virus influenza A de sous-type A(H1N1) pdm09 en Afrique a été rapportée au printemps 2009 (Heraud *et al.*, 2012).

II.2. Para influenza virus (PIV)

Ce sont des virus, à ARN non segmenté et classé en quatre types 1, 2, 3 et 4 de la famille des *Paramyxoviridae*. Ils sont responsables des infections respiratoires basses et hautes chez les enfants. L'incidence à PIV varie selon les différents types. Cependant le PIV 3 est cité dans toutes les littératures comme étant le plus infectieux (Palmer *et al.*, 2014). Les types 1 et 2 ont tendance à circuler pendant l'hiver et le type 3 au printemps. Le type 3 seconde seulement le VRS comme cause de bronchiolite et pneumonie chez l'enfant. Par contre le type 4 est très rarement recherché lors du diagnostic des IRAS ce qui explique le peu de connaissance sur son épidémiologie.

II.3. Rhinovirus (RV)

Ce sont des virus à ARN, non enveloppé de la famille des *Picornaviridae*. Ils sont responsables de la moitié des cas de rhume. Ils sont aussi associés aux crises d'asthme, sinusite, otite, et mieux, provoquent des exacerbations pulmonaires chez les enfants (Esposito *et al.*, 2014). On retrouve plus de 100 types de rhinovirus qui sont responsables d'infections respiratoires chez l'homme. L'infection à rhinovirus est caractérisée par une période d'incubation courte (1-2 jours) et intervient tout au long de l'année avec des pics en saison froide.

II.4. Coronavirus (CoV)

Ce sont des virus à ARN enveloppés qui appartiennent à la famille des *Coronaviridae*. Cinq types sont identifiés comme coronavirus humain : 229E, OC 43, NL 63, HKU1 et les SARS (Owusu *et al.*, 2014). Les types CoV HKU1 et NL63 sont responsables d'infections respiratoires graves comme les pneumonies et les bronchiolites chez les enfants. Cependant le SARS est de loin le type le plus dangereux en termes de mortalité chez les adultes. De façon générale, les coronavirus humains sont responsables de rhumes, des pneumonies chez l'adulte et de dépression chez l'enfant. Ils sont aussi impliqués dans les infections hautes et basses du système respiratoire. Depuis 2012 le sous-type MERS-CoV provoque de graves affections respiratoires notamment chez les adultes au Moyen Orient.

II.5. Virus respiratoire syncitial (VRS)

C'est un virus à ARN, non segmenté de la famille des *Paramyxoviridae*. Ils sont classés en VRS A et B en fonction des propriétés antigéniques. Les symptômes cliniques associés au VRS A tendent à être plus sévères que ceux causés par le VRS B. Les VRS sont en tête de tous les pathogènes viraux dans la transmission des infections respiratoires sévères dans tous les groupes d'âge (Charles R. Woods, 2013). Ils sont particulièrement la cause d'infection respiratoire basse

chez l'enfant. Ils circulent plus pendant l'hiver de décembre à mars dans les pays tempérés. La transmission se fait essentiellement par contact ou par inhalation des gouttelettes émises par un sujet souffrant d'infection respiratoire sévère.

II.6. Métapneumovirus (MPV)

Ce sont des virus à ARN, enveloppés et non segmentés, découverts en 2001. Ils sont classés en deux groupes A et B en fonction de leur propriété antigénique. Les MPV sont responsables du spectre d'infections respiratoires qui va de l'infection respiratoire haute moyenne à la bronchiolite et pneumonie sévères. La circulation du virus est beaucoup plus intense en hiver et le mode de transmission est essentiellement par contact ou par les aérosols (Kroll et Weinberg, 2011).

II.7. Adénovirus (AV)

Ce sont des virus à ADN de la famille des *Adenoviridae*. Cette famille comprend environ 51 sérotypes dont seulement le tiers est associé aux infections inter humaines; les autres étant exclusivement asymptomatiques. Les infections à adénovirus sont associées aux infections respiratoires, gastro-intestinales et ophtalmologiques. Les infections à adénovirus affectent beaucoup plus les enfants et les adolescents que les adultes. Les voies d'infection comprennent la bouche, le nasopharynx et les orifices oculaires.

II.8. Bocavirus (BV)

Ce sont des virus à ADN, non enveloppés de la famille de parvovirus découvert en 2005 (Brieu *et al.*, 2008). Ils sont responsables des infections respiratoires et gastro-entérites chez l'enfant. Le groupe d'âge le plus vulnérable est compris entre 6 mois et 2 ans. L'évidence d'une saisonnalité liée à ce virus n'est jusqu'à pas établie, cependant le virus circule tout au long de l'année avec souvent une prédominance en saison pluvieuse (Arnott *et al.*, 2013). En général, le parvovirus est plus connu comme pathogène chez les animaux.

II.9. Entérovirus (EV)

Ce sont des virus à ARN, non enveloppés de la famille des *Picornaviridae*. Ils sont responsables des infections respiratoires, encéphalites, méningites, myocardites et d'autres infections néonatales (Verboon-Maciolek *et al.*, 2008). La transmission se fait principalement par la voie orale, cependant certains sérotypes peuvent passer par la voie respiratoire. Ces infections sont rares en hiver.

II.10. Paréchovirus (PV)

Ce sont des petits virus à ARN de la famille des *Picornaviridae* identifiés en 2004 et responsables des infections respiratoires et gastroentériques (Verboon-Maciolek *et al.*, 2008). Les paréchovirus sont transmis par la voie féco-orale et rarement par la voie respiratoire. Les diarrhées sont les manifestations cliniques les plus fréquentes suivies des symptômes respiratoires.

III. ASPECTS MORPHOLOGIQUES, EPIDEMIOLOGIQUES DES PATHOGENES BACTERIENS IMPLIQUES DANS LES IRAS

III.1. *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*)

C'est une bactérie fusiforme pléomorphe Gram négative des voies respiratoires qui appartient à la famille des *Mycoplasmataceae*. Elle est la cause de nombreuses infections des voies respiratoires supérieures (50% des cas), y comprise la pneumonie primaire atypique et la trachéobronchite. Les manifestations cliniques comprennent un mal de gorge, un enrouement, de la fièvre, de la toux (peut être purulente), des céphalées, une rhinite, des maux d'oreille, une myalgie, des frissons et un malaise généralisé. Il peut également y avoir une dyspnée, et, dans certains cas, la toux présente les caractéristiques d'une toux coquelucheuse (Atkinson *et al.*, 2008). Chez certains enfants, il peut y avoir une inflammation de la gorge, une adénopathie cervicale, une conjonctivite ou une myringite. La transmission est par contact entre les personnes et sécrétions respiratoires. La période d'incubation est entre une à quatre semaines.

III.2. *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*)

C'est un organisme dont les caractéristiques se rapprochent de ceux des virus du fait de la difficulté de sa mise en culture et sa réplication en milieu intracellulaire. Les *Chlamydiae* sont néanmoins associés aux bactéries et regroupent trois espèces, responsables de plusieurs infections : *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* et *Chlamydia pneumoniae*. La dernière espèce est responsable comme le nom l'indique, d'infections respiratoires. La pneumonie causée par *C. pneumoniae* est catégorisée comme une pneumonie atypique.

III.3. *Haemophilus influenzae* de type b (Hib)

C'est un coccobacille Gram négatif de la famille des *Pasteurellaceae*. C'est une bactérie encapsulée, qui est classée sur la base de son antigène capsulaire. Elle est commensale de l'oropharynx et du nasopharynx chez l'homme. Une infection à Hib peut causer une méningite, une épiglottite, une pneumonie, une arthrite septique, une cellulite, une ostéomyélite ou une bactériémie généralisée. La pathogénicité de Hib n'est pas complètement connue même si la présence de la capsule chez le type b est connue comme un facteur majeur de la virulence.

Après l'introduction du vaccin contre la méningite à Hib, l'incidence des cas d'infection a diminué de 97%. Actuellement, Hib est plus fréquent dans les pays en développement, et les populations autochtones sont plus à risque.

III.4. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

C'est une coccobactérie Gram positive, appartenant à la famille des *Staphylococcaceae*. Les staphylocoques sont des bactéries impliquées dans des pathologies variées et sont souvent responsables d'infections contractées dans les hôpitaux (nosocomiales). Elle peut être à la base des infections mineures comme les dermatoses ou les infections majeures comme la pneumonie, la méningite. Leur habitat naturel est constitué par les flores cutanées et les muqueuses humaines et animales. Ils sont également retrouvés dans l'environnement (eau, sol, air, aliments, objets). Le traitement est difficile car de nombreuses souches sont multi résistantes aux antibiotiques.

III.5. *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*)

C'est un coccobacille Gram positif qui appartient à la famille des *Streptococcaceae*. Il colonise les surfaces muqueuses du rhinopharynx et des voies respiratoires supérieures, et les symptômes d'inflammation apparaissent lorsque la bactérie migre dans les parties stériles des voies respiratoires (Kadioglu *et al.*, 2008). Il est l'agent étiologique le plus fréquent de la pneumonie et de l'otite moyenne d'origine communautaire et il vient au

deuxième rang des causes de méningite bactérienne chez l'enfant et l'adulte. La Transmission interhumaine se fait par des aérosols projetés lors de la toux ou des éternuements, mais l'infection est inhabituelle, car cette bactérie est commensale du nasopharynx donc présente même chez les personnes saines. Il existe plusieurs vaccins conjugués contre le pneumocoque. Depuis 2000, l'introduction des vaccins conjugués à pneumocoque (PCV-7) a permis de réduire significativement l'incidence de l'infection à pneumocoque chez les enfants vaccinés mais aussi de réduire cette incidence chez les enfants non vaccinés et les adultes (Adegbola *et al.*, 2014).

IV. SURVEILLANCE SENTINELLE DE LA GRIPPE HUMAINE AU NIGER

Suite à l'avènement de la grippe aviaire due au virus influenza A(H5N1) hautement pathogène en 2006 et la pandémie de grippe due au virus influenza A(H1N1)pdm09 en début 2009, le Centre de Recherche Médicale et sanitaire(CERMES), fort de son expérience dans la recherche sur les maladies transmissibles, a mis en place un réseau des sites sentinelles pour la surveillance de la grippe au Niger (Jusot *et al.*, 2012).

Ce réseau est piloté par un laboratoire national de référence pour la grippe (LNRG) crée par arrêté N°249 MSP/DGSP/DPHL/MT du 18/08/2011.

Dix sites sentinelles répartis dans trois régions du pays plus la capitale, Niamey, ont été identifiés et comprenaient en leur sein des hôpitaux nationaux, des hôpitaux régionaux et des cliniques privées. Les principaux objectifs de la surveillance sentinelle étaient:

- Connaître les types et sous-types de virus influenza circulant au Niger
- Connaître la distribution des infections assimilées à la grippe (ILI) et des infections respiratoires aiguës et sévères (IRAS) au Niger.
- Définir l'hypothèse d'une saisonnalité de la grippe au Niger.

Depuis avril 2009, le LNRG analyse les échantillons nasopharyngés prélevés dans les différents sites et fournit de façon hebdomadaire la situation épidémiologique de la grippe au Ministère de la santé, à l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et aux centres collaborateurs de l'OMS. L'expertise du LNRG a permis de mettre très vite en évidence la circulation du sous type influenza A(H1N1)pdm09 et mieux de confirmer l'épidémie due à ce virus. Ceci a permis aux décideurs d'élaborer un plan de riposte au niveau national.

Il est très important de rappeler que le laboratoire de référence pour la grippe participe chaque année aux contrôles de qualité à l'échelle mondiale organisés par l'OMS et le Centre for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, ce qui a permis au laboratoire d'obtenir depuis 2010 la mention parfaite avec un certificat délivré à cet effet (voir annexe 1).

Des études ont démontré que la circulation du virus influenza est relative à une température basse mais aussi à d'autres facteurs comme l'humidité (Jusot *et al.*, 2012; Tarnagda *et al.*, 2014). En effet, le Niger est un pays enclavé situé à plus de 50% dans la zone saharienne caractérisée par quatre saisons climatiques qui sont (Jusot *et al.*, 2012) :

- Une saison froide qui va de décembre à février avec une température oscillant entre 19 et 27°C;
- Une saison chaude et sèche entre mars et mai avec une température variant entre 36 et 44°C;
- Une saison pluvieuse qui va de juin à septembre avec une température entre 28 et 32°C;
- Une saison chaude et humide entre octobre et novembre avec une température moyenne autour de 35°C.

Au cours des cinq premières années de surveillance de la grippe au Niger, nous avons pu établir que la circulation des virus influenza, connaît un pic en saison froide et pluvieuse, alternée par une circulation sporadique en saison chaude (Heraud *et al.*, 2012; Jusot *et al.*, 2012). Ceci démontre que le virus influenza circule tout au long de l'année au Niger malgré un taux de détection relativement faible de l'ordre de 10% (Jusot *et al.*, 2012).

Ce taux de détection est quasi similaire à celui enregistré par une étude dans 15 autres pays africains, qui se situe au tour de 10.6 % (Radin *et al.*, 2012). C'est pour cette raison que nous avons planifié cette étude sur les autres pathogènes

viraux et bactériens impliqués dans les IRAS afin de déterminer leur proportion dans 20% des cas d'IRAS négatifs aux virus influenza et définir une probable saisonnalité associée à ces pathogènes.

Cette étude s'inscrit dans la continuité de la surveillance de la grippe au Niger et vise à renforcer l'expertise du CERMES dans le diagnostic moléculaire (virologique et bactériologique) des IRAS afin de fournir des données permettant d'orienter et d'optimiser la prise en charge de la grippe en général et plus particulièrement des IRAS chez les enfants de moins de cinq ans.

DEUXIEME PARTIE : Travaux de terrain et de laboratoire

I. BUT, HYPOTHESES DE RECHERCHE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

I.1. But de l'étude

Contribuer à l'amélioration de la prise en charge des infections respiratoires aiguës sévères chez les enfants de moins de cinq ans au Niger.

I.2. Hypothèses de recherche

- Les bactéries telles que *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*), *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*), *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae* type b (Hib) et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) sont des agents étiologiques des IRAS chez les enfants de moins de cinq ans au Niger.
- Les virus tels que Influenza A (INF A), Influenza B (INF B), Influenza A(H1N1) pdm09, Parainfluenzae virus1 (PIV1), Parainfluenzae virus 2 (PIV2), Parainfluenzae virus humain 3 (PIV3), Parainfluenzae virus 4 (PIV4), Coronavirus NL63, Coronavirus 229E, Coronavirus OC43, Coronavirus HKU1, Métapneumovirus A/B (MPV), Virus respiratoire syncytial A/B (VRS), Rhinovirus (RV), Entérovirus(EV), Bocavirus (BV), Adénovirus (AV) et Paréchovirus (PV) sont des agents étiologiques des IRAS chez les enfants de moins de cinq ans au Niger.

I.3. Objectifs de l'étude

I.3.1. Objectif général

Décrire les étiologies virales et bactériennes des infections respiratoires aiguës sévères chez les enfants de moins de cinq ans au Niger de janvier 2010 à décembre 2012.

I.3.2. Objectifs spécifiques

- Identifier les cas suspects (cas cliniques) d'IRAS chez les enfants de moins de cinq ans dans les sites sentinelles au Niger de janvier 2010 à décembre 2012.
- Détecter les virus et les bactéries des cas suspects (cas cliniques) d'IRAS de l'étude par la RT-PCR en temps réel (rRT-PCR).
- Déterminer les proportions et les types de co-infections virales et/ou bactériennes de l'échantillon de l'étude.
- Constater les éventuelles tendances à la saisonnalité des différents pathogènes identifiés chez les enfants de moins de cinq ans hospitalisés pour IRAS au Niger.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. Type d'étude

Il s'est agi d'une étude transversale à la fois rétrospective et prospective: la collecte des échantillons étant effectuée de janvier 2010 à décembre 2012, la conception de l'étude et la réalisation des analyses de laboratoire sont intervenues en 2014.

II.2. Cadre de l'étude

Les prélèvements ont été réalisés dans huit sites sentinelles répartis dans quatre des huit régions du pays à savoir :

- quatre sites à Niamey (capitale du Niger),
 - ✓ Hôpital National de Niamey (HNN)
 - ✓ Hôpital National de Lamordé (HNL)
 - ✓ Centre Hospitalier Régional de la Poudrière (CHR)
 - ✓ Clinique Pasteur
- Un site à Maradi (capitale économique)
 - ✓ Centre Hospitalier Régional de Maradi (CHR Maradi)
- Un site à Dosso
 - ✓ Hôpital de district de Gaya (HD Gaya)
- Un site à Tillabéry
 - ✓ Centre Hospitalier Régional de Tillabéry (CHR Tillabéry)

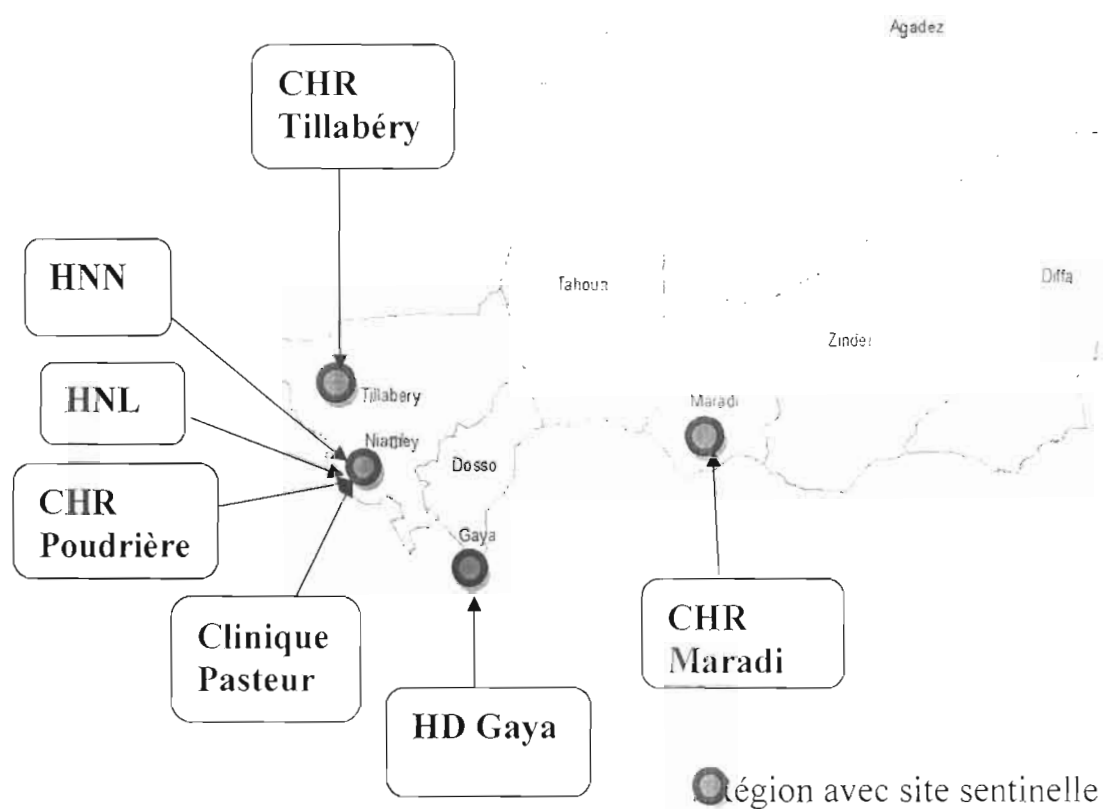


Figure 1: Localisation des sites sentinelles de surveillance de la grippe au Niger.

II.3. Technique de collecte des données

Les données épidémiologiques, cliniques et démographiques des patients (nom, sexe, âge, définition des cas, etc. ont été enregistrées par l'épidémiologiste à travers les fiches de consultation préalablement élaborées (voir annexe 2) mais aussi à travers la base des données de la surveillance de la grippe sur Epi Info 4.

II.4. Critères d'inclusion des cas d'IRAS

Les enfants < 5ans admis dans une des formations sanitaires d'un site sentinelle de surveillance de grippe, répondant à la définition du cas d'IRAS (définition d'IRAS), ont été inclus dans l'étude.

II.5. Critères de non inclusion

- Les enfants de moins de cinq ans souffrant d'infections autres que les infections respiratoires aiguës sévères (IRAS).
- Les enfants de moins de cinq ans souffrant d'IRAS mais dont les parents ou les tuteurs ont refusé de donner un consentement éclairé (écrit ou verbal).

II.6. Définition des cas d'IRAS chez les enfants <5ans

Un cas d'IRAS chez les enfants de < 5ans est tout enfant:

- Hospitalisé ou qui doit être hospitalisé, **avec**
- Fièvre > 37,5°C, **avec**
- Toux ou dyspnée, **avec**
- Début des symptômes inférieur à 7 jours, **avec en plus**

Un des symptômes ou signes clinique suivants :

- Tachypnée
- Incapacité de boire ou de prendre du lait maternel
- Vomissement de tout aliment
- Convulsions ou léthargie, inconscience

- Tirage intercostal ou stridor chez un enfant calme
- Battement des ailes du nez
- Grognement
- Saturation en oxygène < 90%

II.7. Calcul de la taille de l'échantillon

Notre échantillon a été déterminé sur la base des spécimens et des résultats issus de la surveillance sentinelle de la grippe au Niger. En effet entre janvier 2010 et le 31 Décembre 2012, 2028 patients ont été inclus dans la surveillance de la grippe dont 1176 cas d'infections assimilées à la grippe (ILI) (58%) et 852 cas d'IRAS (42%). Parmi ces échantillons, 146 cas d'ILI (12%) et 54 cas d'IRAS (6%) étaient positifs aux virus influenza A et B.

Etant donné que notre étude porte uniquement sur les cas d'IRAS, nous avons réalisé un échantillonnage aléatoire sur les échantillons conservés dans notre bio-banque à -80°C, qui consiste à un tirage au sort de 20% des cas d'IRAS négatifs aux virus influenza A et B.

Soit X= nombre total des cas d'IRAS

Y= nombre des cas d'IRAS positifs aux virus influenza

N= nombre des cas d'IRAS négatifs aux virus influenza

$N = X - Y$

$N = 852 - 54$

$N = 798$

Soit n = échantillon de travail

$n = 20\% \times (798)$

$n = 159$ que nous allons finalement arrondir à 160 pour constituer notre échantillon d'étude.

II.8. Considérations éthiques

En 2009, le Comité National d'Ethique du Niger (CNEN) a donné son approbation au Centre de Recherche Médicale et Sanitaire (CERMES) pour

mener la surveillance de la grippe humaine au Niger (référence de la lettre d'approbation 06/2009/CCNE du 2 Avril 2009) et en 2011, le CERMES devenait Laboratoire National de Référence pour la grippe (LNRG) par décision officielle du Ministère de la santé par lettre N° 249 MSP/DGSP/DPHL/MT du 18 Aout 2011. En 2013, le Comité d'Ethique National a donné une extension d'approbation définitive au CERMES pour la surveillance des autres infections respiratoires autre que la grippe.

II.9. Prélèvements

Tous les prélèvements ont été réalisés après avoir obtenu le consentement éclairé du parent ou tuteur des patients. Pour ce faire le kit de Copan qui comprend un écouvillon et un milieu de transport viral a été utilisé pour la réalisation du prélèvement. Celui-ci s'effectue au niveau du nasopharynx par écouvillonnage.

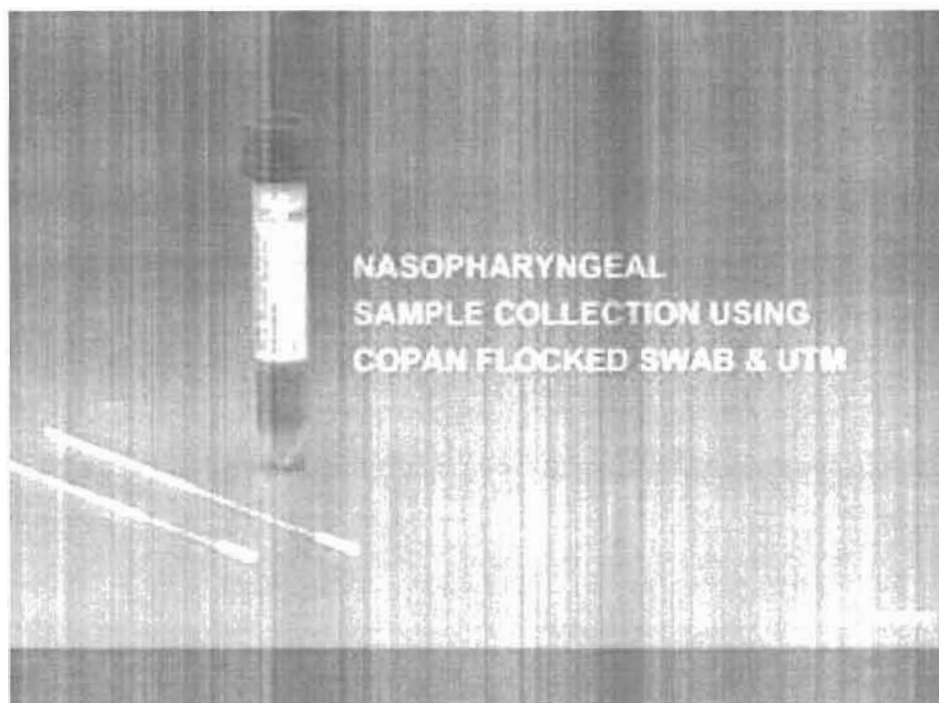


Figure 2 : Kit Copan pour la réalisation des prélèvements nasopharyngés



Figure 3: Technique de réalisation du prélèvement nasopharyngé

II.10. Extraction des acides nucléiques (ARN et ADN)

Les extractions des ARN viraux et des acides nucléiques bactériens (ADN et/ou ARN) seront simultanément et manuellement effectuées à l'aide du kit QIAamp Viral RNA Mini Kit de QIAGEN. Ce kit permet une très bonne purification de l'ARN sur colonne avec un rendement final très important.



Figure 4 : Kit QIAGEN pour l'extraction de l'ARN viral

L'extraction des acides nucléiques s'est déroulée comme suit :

- Décongélation du contrôle négatif (RespNC, bouchon blanc) et d'un contrôle interne (RespIC, bouchon bleu) dans le kit FTD Resp 21 Plus
- Extraction de 10 échantillons ou des séries de 10 échantillons en incluant à chaque série un contrôle négatif. Un volume d'extraction de 300 µl au début et 75 µl d'élution est recommandé.
- Ajout de 3µl de contrôle interne (IC, bouchon bleu) directement dans le tampon de lyse de chaque extraction. Ceci permet de mesurer le succès de l'extraction ainsi que de vérifier la présence d'éventuels inhibiteurs.
- Le contrôle positif n'est pas extrait.

De façon générale, l'extraction s'est effectuée en quatre principales étapes à l'aide du kit QIAamp Viral RNA conformément à la procédure d'extraction du laboratoire (voir annexe 3) :

- La lyse des cellules
- La fixation des acides nucléiques sur la membrane
- Les lavages des produits de lyse et de fixation
- L'élution des ARN et ADN

II.11. Analyse moléculaire

La technique moléculaire dénommée en anglais, real time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (rRT-PCR) est utilisée dans cette étude pour la détection des différents pathogènes viraux et bactériens à l'aide d'un thermocycleur de type ABI 7500 Fast (Applied BioSystem). En effet cette technique présente l'avantage d'être très spécifique en minimisant les risques de contamination.



Figure 5: Thermocycleur ABI 7500 fast pour rRT-PCR

Pour ce faire, nous avons utilisé le kit « FTD Respiratory Pathogens 21 Plus » (FTD Resp 21 plus) de Bio-Mérieux qui est commercialisé par la société Fast Track Diagnostic au Luxembourg.

Le kit FTD Resp 21 Plus est un test in vitro qui permet de détecter simultanément sur une même plaque PCR 23 pathogènes respiratoires dont 18 virus et 5 bactéries à travers 6 PCR multiplexes. Chacune des PCR multiplexes se déroule sur une ligne de la plaque pour tester 10 spécimens et 2 contrôles (négatif et positif) pour la recherche des pathogènes suivants :

1^{ère} multiplexe :

- Influenza A (INFA)
- Influenza B (INFB)
- Influenza A(H1N1) pdm09
- Rhinovirus (RV)

2^{ème} multiplexe :

- Coronavirus NL63
- Coronavirus 229E
- Coronavirus OC43
- Coronavirus HKU1

3^{ème} multiplexe :

- Parainfluenza virus 2 (PIV2)
- Parainfluenza virus 3 (PIV3)
- Parainfluenza virus 4 (PIV4)
- Contrôle interne (IC)

4^{ème} multiplexe :

- Parainfluenzae virus 1(PIV1)
- Metapneumovirus A/B (MPV A/B)
- Bocavirus (BV)
- *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*)

5^{ème} multiplexe :

- Virus respiratoire syncytial A et B (VRS A/B)
- Paréchovirus (PV)
- Entérovirus (EV)
- Adénovirus (AV)

6^{eme} multiplexe :

- *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*)
- *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*)
- *Haemophilus influenzae* b (Hib)
- *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

II.11.1. Composition du kit

Le kit FTD 21 Plus contient tous les réactifs nécessaires pour la réalisation de l'analyse à l'exception de l'enzyme. Il s'agit essentiellement des différents mix, du contrôle interne, des contrôles positif et négatif et l'eau.

Tableau I : Composition du kit FTD 21 Plus

PCR multiplexe	Réactifs	Volume
FluRhino PP	PP mix pour INF A, B, A(H1N1)pdm& RV	8 × 24µl
Cor PP	PP mix pour CV 63, CV 43, CV 229, & CV HKU1	8 × 24 µl
Para.EAV PP	PP mix pour PIV 2, 3, 4 & IC	8 × 24µl
BoMpPfl PP	PP mix pour PIV 1, MPV A & B, BV & <i>M. pneumoniae</i>	8 × 24µl
RsEPA PP	PP mix pour VRS A & B, EV & PV	8 × 24µl
RespBac PP	PP mix pour <i>C. pneumoniae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> & Hib	8 × 27µl
RespBac PC	PC : pool de plasmide pour Resp Bac PP	8 × 22µl
Resp PC	PC : pool des plasmides pour FluRhino PP, Cor PP, BoMpfl PP, RsEPA PP	8 × 55µl
Resp NC	Contrôle négatif	8 × 330µl
Resp IC	Contrôle interne	8 × 43µl

PP= primer et probe. IC= contrôle interne. PC= contrôle positif, NC= contrôle négatif

II.11.2. Principe de la méthode :

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre simultanément la quantification de l'ADN présent dans la réaction (au même moment où l'analyse se déroule et non à la fin). Des sondes fluorescentes se fixent soit sur l'ADN double brin (technologie SYBR) ou sur une séquence d'ADN précise (technologie Taqman et Beacon). Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN, ce qui se traduit par une courbe d'amplification présentant une allure sigmoïdale et exponentielle. Un seuil de fluorescence est établi par le programme de l'appareil PCR en temps réel. La quantité d'ADN amplifiée permettant aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil est atteinte après un certain nombre de cycles PCR appelé "Ct" pour "Cycle Threshold " en Anglais ou "cycle seuil" en Français. C'est cette valeur qui est à la base des calculs pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative et de déterminer si le spécimen est positif ou négatif à la réaction.

Dans le cas de notre analyse, les ADN des germes à ADN sont amplifiés directement d'une part, d'autre part les ARN des germes à ARN sont transcrits en ADN complémentaires (ADNc) en utilisant des amorces spécifiques de médiation à l'étape de transcription inverse suivie dans le même tube par l'amplification proprement dite de ces ADNc. La détection des produits se fait via une sonde doublement marquée (dual labelled) pour chaque virus ou chaque bactérie pour la PCR multiplexe.

La présence des séquences de virus ou de bactéries spécifiques dans la réaction est détectée par une augmentation de la fluorescence qui est reportée en cycle threshold value (Ct) par l'appareil PCR (thermocycleur).

II.11.3. Préparation du master mix

Le mélange s'effectue toujours sur la glace et les différents éléments qui le composent sont placés dans les microtubes au niveau de la salle de préparation du mix (salle propre) sous une hotte cabine PCR dans l'ordre suivant: H₂O, tampon, amorces, sonde et enfin l'enzyme.

NB: Toujours réaliser un témoin dans lequel l'ADN sera remplacé par de l'eau (témoin négatif) afin de déceler une éventuelle contamination (la contamination par de l'ADN précédemment amplifié représente le principal risque). Un témoin positif qui permet de valider la bonne conservation des réactifs, de l'enzyme responsable de la polymérisation et des performances du thermocycleur. Un témoin interne présent dans le milieu réactionnel ajouté à l'étape de l'extraction renseignera sur la présence ou l'absence d'inhibiteurs de l'amplification.

Les étapes de préparation du mix sont les suivantes :

- Décongeler les réactifs suivants : FluRhinoPPmix, Cor PPmix, Para.EAV PPmix, Bo.Mp.Pfl PPmix, RsEPA PPmix et RespBac PPmix, les contrôles positifs (Resp PC and RespBac PC) et le tampon 2X RT PCR de l'enzyme AgPath-ID™ One-Step.

NB : Les contrôles positif et négatif doivent faire partie de chaque analyse.

- Les réactifs dans chaque colonne sont suffisants pour 12 tests, y compris les contrôles.
- Ajouter le volume nécessaire (Tableau 1) du tampon « 2xRT-PCR » dans le FluRhinoPPmix, Cor PPmix, Para.EAV PPmix, BoMp.Pfl PPmix, RsEPA PPmix et RespBac PPmix. Changer de cône pour chaque pipetage.
- Ajouter le volume nécessaire (Tableau 1) du AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Taq dans le FluRhinoPPmix, Cor PPmix, Para.EAV PPmix, Bo.MpPfl PPmix, RsEPA PPmix et RespBac PPmix comprenant déjà le tampon 2xRT-PCR. Changer de cône pour chaque pipetage puis passer au vortex et centrifuger brièvement.

Tableau II : Préparation du master mix

	1 Rxn	13 Rxns(10 Ech+1NC+ 2PC)
PP mix	1,5µl	19,5µl
Enzyme	1µl	13µl
Buffer	12,5µl	162,5µl
Total	15µl	195µl

Rxn : Reaction ; Ech : Echantillons

II.11.4. Préparation du mélange réactionnel

Cette étape se déroule dans la salle d'extraction sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) doté d'un flux pour éviter tout risque de contamination. Les extraits d'ARN ainsi que les différents contrôles (positif et négatif) sont ajoutés dans la plaque PCR au master mix précédemment préparé en salle propre.

II.11.5. Etapes de réalisation

Pour réaliser l'analyse à l'aide du kit FTD 21 Plus, on procède de la manière suivante :

- 1) Prendre une plaque 96 well compatible avec l'ABI 7500
- 2) Pipeter 15ul du mélange FluRhinoPPmix. 2x RT PCR buffer & enzyme (préparer précédemment) dans les puits
- 3) Pipeter 15ul du mélange Cor PPmix, 2x RT PCR buffer & enzyme dans les puits
- 4) Pipeter 15ul du mélange Para.EAV PPmix, 2x RT PCR buffer & enzyme dans les puits
- 5) Pipeter 15ul du mélange BoMpPfl PPmix, 2x RT PCR buffer & enzyme
- 6) Pipeter 15ul du mélange RsEPA PPmix, 2x RT PCR buffer & enzyme
- 7) Pipeter 15ul du mélange RespBac PPmix, 2x RTPCR buffer & enzyme
- 8) Ajouter 10ul d'extrait d'échantillon, d'extrait du NC et le PC (qui ne pas extrait)
- 9) Mélanger brièvement en pipetant

- 10) Refermer la plaque avec l'adhésif
- 11) Centrifuger brièvement
- 12) Mettre la plaque dans l'ABI 7500
- 13) Démarrer l'analyse

II.11.6. Plan de schéma de plaque

Avant de commencer les manipulations, un schéma de plaque doit être préétabli afin d'éviter les risques d'erreurs (Figure 3). Les positions des échantillons ainsi que la succession des différents mix doit être clairement définies pour permettre une interprétation rapide et exacte des résultats à la fin de l'analyse et mieux assurer la documentation du travail.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ech 1	Ech 2	Ech 3	Ech 4	Ech 5	Ech 6	Ech 7	Ech 8	Ech 9	Ech10	Resp PC	Resp NC
B	Ech 1	Ech 2	Ech 3	Ech 4	Ech 5	Ech 6	Ech 7	Ech 8	Ech 9	Ech10	Resp PC	Resp NC
C	Ech 1	Ech 2	Ech 3	Ech 4	Ech 5	Ech 6	Ech 7	Ech 8	Ech 9	Ech10	Resp PC	Resp NC
D	Ech 1	Ech 2	Ech 3	Ech 4	Ech 5	Ech 6	Ech 7	Ech 8	Ech 9	Ech10	Resp PC	Resp NC
E	Ech 1	Ech 2	Ech 3	Ech 4	Ech 5	Ech 6	Ech 7	Ech 8	Ech 9	Ech10	Resp PC	Resp NC
F	Ech 1	Ech 2	Ech 3	Ech 4	Ech 5	Ech 6	Ech 7	Ech 8	Ech 9	Ech10	RespBac PC	Resp NC
G												
H												

Légende

Ech 1 à Ech 10 = Master mix + échantillons de 1 à 10

Resp PC et RespBac PC= Master mix + contrôle positif

Resp NC= Master Mix + extrait contrôle négatif

A1-A12= master mix avec FluRhinoPPmix

B1-B12= master mix avec Cor PPmix

C1-C12= master mix avec Para.EAV PPmix

D1-D12= master mix avec BoMpPfl PPmix

E1-E12= master mix avec RsEPA PPmix

F1-F 12= master mix avec RespBac PPmix

Figure 6 : Schéma de plaque pour la réalisation de la PCR avec le kit FTD

21 Plus

II.11.7. Programme d'amplification pour la rRT-PCR

Avant le démarrage de l'analyse, l'appareil PCR (ABI7500 Fast) doit être programmé en fonction du programme d'amplification défini par le protocole.

Le programme d'amplification comporte quatre principales étapes au cours

desquelles la quantité d'ADN à amplifier est multipliée par le nombre des cycles (2^n).

- **La transcription reverse :** comme la PCR fonctionne sur la base des ADN, les matrices ARN sont transcrites à cette étape en ADN complémentaire (ADNc)
- **La dénaturation thermique de l'ADN:** à 95°C, les liaisons d'hydrogènes sont rompues et les 2 brins de l'ADN se séparent. L'ADN passe sous forme simple brin dans le milieu.
- **Hybridation des amorces:** le milieu réactionnel contient deux amorces dont chacune complémentaire d'un des 2 brins et une sonde fluorescente. Les amorces en large excès, s'hybrident dès lors qu'elles rencontrent les séquences complémentaires et au même moment la sonde fluorescente est activée pour émettre un signal lumineux.
- **Extension des amorces:** intervention de l'enzyme (Ambion Taq) qui allonge les amorces en y incorporant les ADNc de la séquence de la matrice à hybrider.

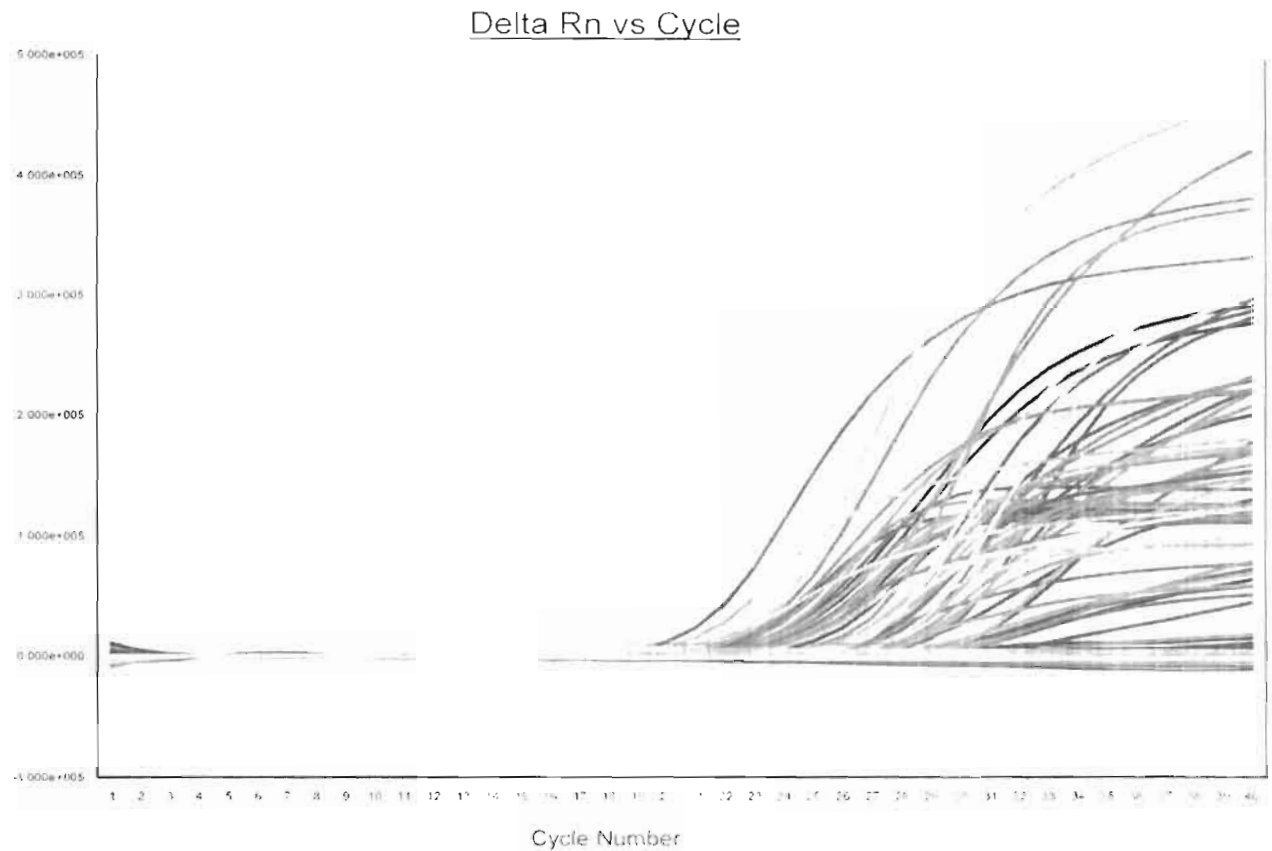
Le programme d'amplification est le suivant :

Transcription reverse:	50°C, 15 min hold	
Dénaturation de l'ADN:	95°C, 10 min hold	
Hybridation des amorces:	95°C, 8 sec	} X40
Extension par l'enzyme:	60°C, 34 sec	

II.11.8. Validation et interprétation des résultats

A la fin du programme d'amplification, les résultats de l'analyse sont validés en fonction de l'interprétation suivante :

- Tous les contrôles négatifs (NC) doivent être en dessous du seuil. Si il y'a une potentielle contamination (apparence d'amplification), les résultats seront ininterprétables et toute l'analyse doit être reprise.
- Tous les contrôles positifs doivent présenter des courbes d'amplification exponentielle. Ils doivent avoir des $Ct \leq 33$.
- Tous les contrôles internes doivent présenter des courbes d'amplification exponentielle. Ils doivent avoir un $Ct \leq 33$. Dans le cas où ces contrôles échouent, la méthode de purification doit être revue.
- Les échantillons qui présentent des courbes d'amplification exponentielle avec un $Ct \leq 33$ sont considérés positifs et ceux ayant un $Ct > 33$ sont considérés négatifs (Figure 3).



Selected Detector: All
Well(s) A1-G12

Figure 7 : Courbes d'amplification des échantillons analysés

II.11.9 Analyse des données

Les données de l'étude sont analysées à l'aide des logiciels Excel et R pour démontrer les prévalences et proportions des différents pathogènes ainsi que les cas des co-infections. Les intervalles de confiance ont été calculés grâce au logiciel de régression logistique. Aussi la saisonnalité relative aux différents pathogènes est établie pour permettre de mieux maîtriser la circulation des virus et bactéries en fonctions des saisons.

TROISIEME PARTIE : **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

I. RESULTATS

Entre janvier 2010 et décembre 2012, le laboratoire national de référence pour la grippe au Niger a inclus 868 enfants de <5ans hospitalisés pour IRAS, parmi lesquels 818 (94%) ont été testés négatifs aux virus influenza A et B. Dans le cadre de la présente étude, 160 (20%) prélèvements négatifs aux virus influenza A et B, ont été sélectionnés par randomisation pour constituer l'échantillon d'étude. Par rapport au sexe, 72/160 prélèvements retenus pour l'étude, provenaient d'enfants de sexe féminin. Parmi les prélèvements sélectionnés, 90/160 (56%) d'entre eux étaient issus d'enfants dont l'âge <1 ans et les 70/160 (44%) restants étaient issus d'enfants d'un âge compris entre 1 et 4 ans.

Afin de ne pas introduire de biais dans la sélection, la randomisation a été réalisée de façon à respecter en tout point de vue les similarités entre l'échantillon d'étude et l'échantillon de base (tous les enfants < 5 ans hospitalisés pour IRAS). De façon générale, les caractéristiques des enfants sélectionnés pour l'étude sont semblables à ceux des enfants non sélectionnés pour l'étude. Ainsi la répartition par groupe d'âge, par durée des symptômes et par saison montre que les caractéristiques des deux échantillons sont semblables (Tableau III).

Table III: Caractéristiques des enfants < 5ans, hospitalisés pour IRAS au Niger.

Caractéristiques	Enfants sélectionnés pour l'étude n/N (%)	Enfants non sélectionnés pour l'étude n/N (%) ^a	Odds ratio (95% IC) ^b	P
Age (année)				
<1	90/160 (56,2)	362/625 (57,9)	Référence	-
1-4	70/160 (43,8)	263/625 (42,1)	1,1 (0,7-1,5)	0,703
Sexe				
Féminin	73/160 (45,6)	243/625 (38,9)	Référence	-
Masculin	87/160 (54,4)	382/625 (61,1)	0,7 (0,5-1,1)	0,121
Durée des symptômes (jour)				
0-3	125/160 (78,1)	524/625 (83,8)	Référence	-
4-7	35/160 (21,9)	101/625 (16,2)	1,4 (0,9-2,2)	0,090
Saison				
Chaude	64/160 (40,0)	255/625 (40,8)	Référence	-
Froide	6/160 (3,7)	97/625 (15,5)	0,2 (0,1-0,6)	0,002
Pluvieuse	48/160 (30,0)	135/625 (21,6)	1,4 (0,9-2,2)	0,090
Sèche	42/160 (26,3)	138/625 (22,1)	1,1 (0,7-1,8)	0,456

Abréviations: CI: intervalle de confiance

^a Y compris les enfants testés positifs à influenza A et B.

^b Estimer à l'aide de la régression logistique inconditionnelle.

Après les analyses de laboratoire, nous avons déterminé la prévalence des virus respiratoires chez les enfants < 5 ans, hospitalisés pour IRAS au Niger. Au total, 126/160 (78, 7%) des spécimens étaient positifs à au moins un pathogène viral. Concernant ces mono-infections virales (infection due à un virus), les résultats démontrent la prédominance des virus suivants: 56/160 (35%) cas de VRS, 47/160 (29%) cas de RV et 39/160 (24%) cas de PIV. Les autres virus respiratoires tels que les CV, MPV, BV, EV et AV ont été individuellement détectés dans moins de 15% de tous les échantillons testés. Par contre, aucun

échantillon n'a été trouvé positif au PV. La classification par groupe d'âge montre que chez les enfants < 1ans (N= 90), VRS (n= 44 ; 48,9%) ; PIV (n= 28 ; 31,1%) et MPV (n= 16 ; 17,8%) sont les types viraux les plus prévalent comparé aux enfants d'âge compris entre 1 à 4 ans (Tableau IV).

La circulation des différents virus respiratoires en fonction des saisons montre que le RSV, PIV et MPV sont plus fréquemment détectés pendant la saison chaude (octobre à mi-décembre), par contre RV et BV circulent plus en saison pluvieuse (juin- septembre). Les autres virus circulent à des fréquences constantes au cours des différentes saisons (Tableau IV).

Plusieurs cas de co-infection entre différents sous-types viraux sont détectés dans 6 (30%) et 20 (51%) des cas positifs aux CV et PIV respectivement.

Dans l'échantillon d'étude, 20 spécimens ont été testés positifs aux coronavirus dont 13/20 (65%) cas du sous type OC43, 9/20 (45%) cas du sous type 229E, 6/20 (30%) cas du sous type NL63 et 4/20 (20%) cas du sous type HKU1. Parmi les 39 échantillons testés positifs aux PIV 1-4, 9 (23%) sont du sous type 1 ; 3 (8%) du sous type 2 ; 31 (79%) du sous type 3 et 21 (53%) du sous type 4 (Tableau IV).

Bien que nous avons choisi notre échantillon d'étude parmi les spécimens testés préalablement négatifs aux virus influenza A et B par rRT-PCR, 6 (3%) spécimens sont révélés positifs aux virus influenza à l'aide du kit FTD 21 dont 2(1%) à INF A et 4 (2%) à INF B.

Tableau IV: Prévalence des virus respiratoires chez les enfants <5 ans, hospitalisés pour IRAS au Niger.

Caractéristiques	Prévalence n (%)								Tous virus
	RV	CV	PIV	MPV	BV	RSV	EV	AV	
Total (N=160)	47 (29.4)	20 (12.5)	39 (24.4)	21 (13.1)	21 (13.1)	56 (35.0)	7 (4.3)	10 (6.2)	126 (78.7)
Groupe d'âge	p = 0.878	p = 0.718	p = 0.024	p = 0.048	p = 0.302	p < 0.001	p = 0.465	p = 0.805	p = 0.006
<1 an (N=90)	26 (28.9)	12 (13.3)	28 (31.1)	16 (17.8)	14 (15.6)	44 (48.9)	3 (3.3)	6 (6.7)	78 (86.7)
1-4 ans (N=70)	21 (30.0)	8 (11.4)	11 (15.7)	5 (7.1)	7 (10.0)	12 (17.4)	4 (5.7)	4 (5.7)	48 (68.6)
Saisons	p < 0.001	p = 0.218	p = 0.011	p = 0.044	p = 0.009	p < 0.001	p = 0.438	p = 0.468	p < 0.001
Chaud (N=64)	16 (25.0)	12 (18.8)	24 (37.5)	14 (21.9)	10 (15.6)	34 (53.1)	2 (3.1)	6 (9.4)	56 (87.5)
Froide (N=6)	0 (0.0)	1 (16.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (16.7)
Pluie (N=48)	26 (54.2)	3 (6.2)	7 (14.6)	5 (10.4)	11 (22.9)	13 (27.1)	4 (8.3)	3 (6.2)	42 (87.5)
Sèche (N=42)	5 (11.9)	4 (9.5)	8 (19.1)	2 (4.7)	0 (0.0)	9 (21.4)	1 (2.4)	1 (2.4)	27 (64.3)

Abréviations: RV: Rhinovirus; CV: Coronavirus (229, 63, 43, HKU); PIV: Parainfluenza virus (types 1-4); HMPV: métapneumovirus; RSV: Respiratory Syncytial Virus;

EV: Enterovirus; AV: Adenovirus.

La prévalence des pathogènes bactériens montre qu'au moins une bactérie a été détectée dans 102 (63%) échantillon de l'étude. Parmi les 160 échantillons testés, *S. pneumoniae* (n=90; 56%) est le type bactérien le plus fréquemment détecté, suivie par Hib (n=20; 12%), *Staphylococcus aureus* (n=18; 11%) et *C. pneumoniae* (n=4; 2.5%). Aucun cas positif au *M. pneumoniae* n'a été détecté dans cette étude (Tableau V).

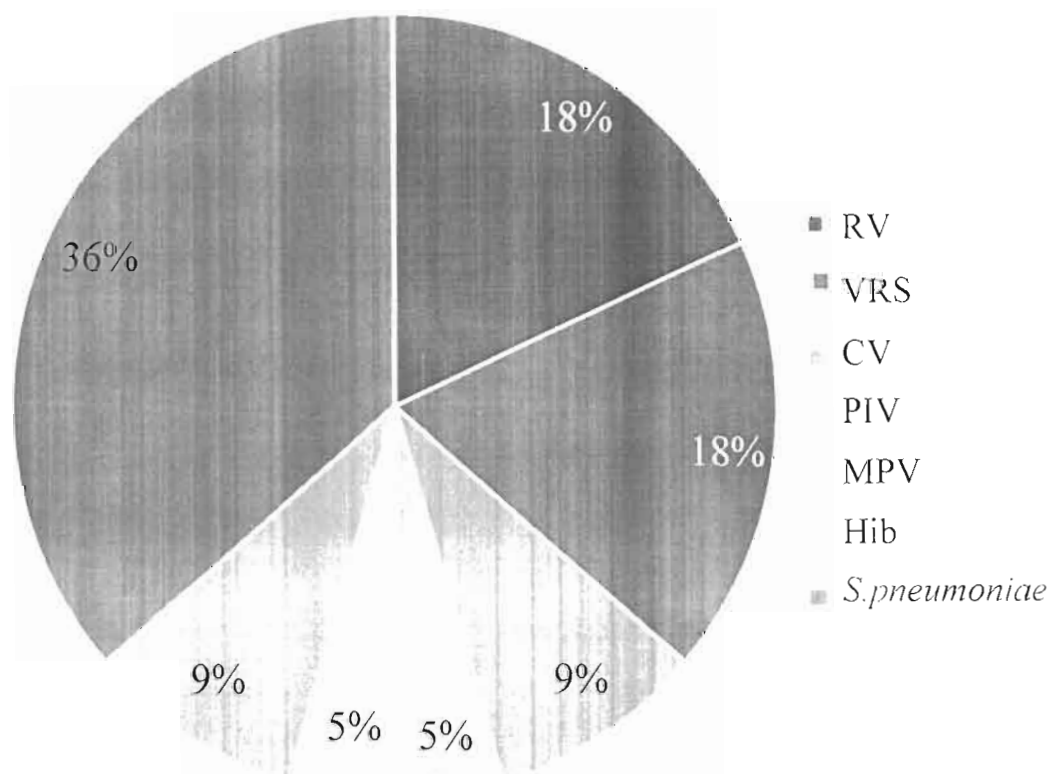
Dans le groupe d'âge des enfants <1 an, on remarque une prédominance de *S.pneumoniae* (n=49 ; 54%) et de *S. aureus* (n=11 ; 12%) tandis que chez les enfants appartenant au groupe d'âge 1-4ans, *S.pneumoniae* (n= 41 : 58%) et Hib (n= 12 ; 17%) sont les plus détectés (Tableau V).

La circulation des différents germes bactériens est relativement plus intense en période de haute température. Ainsi, *S. pneumoniae* est détecté principalement en saison chaude, pluvieuse et sèche tandis que Hib et *S. aureus* ne sont pas détectés en saison froide. *C. pneumoniae* est détectée exclusivement en saison chaude et sèche (Tableau V).

Table V: Prévalence des bactéries respiratoires chez les enfants <5 ans hospitalisés pour IRAS au Niger.

Caractéristiques	Prévalence n (%)				
	<i>C. pneumonia</i>	<i>S. aureus</i>	<i>H. influenza</i> type b	<i>S. pneumonia</i>	Toutes bactéries
Total (N=160)	4 (2.5)	18 (11.3)	20 (12.5)	90 (56.3)	102 (63.7)
Groupe d'âge	p = 0.444	p = 0.659	p = 0.117	p = 0.602	p = 0.431
<1 an (N=90)	3 (3.3)	11 (12.2)	8 (8.9)	49 (54.4)	55 (61.1)
1-4 ans (N=70)	1 (1.4)	7 (10.0)	12 (17.1)	41 (58.6)	47 (67.1)
Saisons	p = 0.450	p = 0.822	p = 0.185	p = 0.581	p = 0.780
Chaude (N=64)	3 (4.7)	8 (12.5)	7 (10.4)	38 (59.4)	42 (65.6)
Froide (N=6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (50.0)	3 (50.0)
Pluie (N=48)	0 (0.0)	5 (10.4)	4 (8.3)	29 (60.4)	32 (66.7)
Sèche (N=42)	1 (2.4)	5 (11.9)	9 (21.4)	20 (47.6)	25 (59.5)

Au moins un virus respiratoire a été détecté dans 126 (78%) d'échantillons et au moins un pathogène bactérien a été détecté dans 102 (64%) d'échantillons. Parmi les 138 échantillons positifs à différents pathogènes respiratoires, 22 (16%) sont positifs à un seul pathogène. Parmi ceux-ci, 8(36%) sont positifs à *S. pneumoniae*, 4 (18%) au VRS et 4 (18%) au RV. Les MPV, CV, PIV et Hib sont détectés individuellement pour moins de 10% des cas de mono infection. Parmi les 116 cas d'IRAS pour lesquels deux ou plusieurs pathogènes respiratoires sont détectés, 90 (78%) d'échantillons sont positifs à des infections mixtes virus – bactéries (Figure 8).



RV: rhinovirus; VRS: virus respiratoire syncytial; CV: coronavirus; PIV: parainfluenza virus; MPV: métapneumovirus; Hib: *Haemophilus influenza* type b; *S.pneumoniae*: *Streptococcus pneumoniae*.

Figure 8: Proportion des pathogènes respiratoires détectés en mono infection (N=22) chez les enfants < 5 ans hospitalisés pour IRAS au Niger.

plusieurs études qui ont rapporté que le VRS est le pathogène viral majeur des infections respiratoires surtout chez les jeunes enfants (Lassauniere *et al.*, 2010; Bezerra *et al.*, 2011; Kwofie *et al.*, 2012). C'est d'ailleurs la même tendance qui est argumentée par Cai *et al.* (2014) et par Emukule *et al.* (2014) qui ont rapporté une forte prédominance du VRS dans la transmission des IRAS chez les enfants.

D'autre part, après le VRS, le rhinovirus était le second virus le plus détecté (29%) dans notre échantillon. Contrairement au VRS, la prévalence du RV était similaire aussi bien chez les enfants de moins d'un an que chez ceux d'âge compris entre 1 et 4 ans. La parité de la prévalence du RV entre ces deux groupes d'âge de notre échantillon avait précédemment été rapportée dans des précédentes études (Enan *et al.*, 2013; Arruda *et al.*, 2014). Cependant dans d'autres études, le RV a été détecté comme étant le virus le plus prévalent chez les enfants < 5ans (Hoffmann *et al.*, 2012; Sentilhes *et al.*, 2013; Ouedraogo *et al.*, 2014). En tout état de cause, le RV n'est pas le virus le plus associé dans les cas d'IRAS chez les enfants de moins de cinq ans d'âge au Niger ($p > 0,05$). Par contre ce pathogène viral est plutôt la cause des infections bénignes comme le rhume chez les adultes (Chen *et al.*, 2015).

Parmi les PIV et CV détectés au cours de cette étude, le PIV de type 3 (79%) et le CV de type OC43 (45%) sont les sous-types viraux les plus fréquemment détectés et ceci est en accord avec les résultats des précédentes études (Bezerra *et al.*, 2011; Hoffmann *et al.*, 2012).

Quelques cas positifs aux virus influenza ont été détectés bien que nous ayons réalisé nos analyses sur des spécimens négatifs pour ce virus. Ceci pourrait s'expliquer simplement par la différence des techniques d'analyse utilisées. Néanmoins le faible taux de détection de ces virus (< 2%) nous rassure quant à la performance de notre protocole de surveillance (Protocole CDC) en termes de détection des virus influenza.

Au cours de la présente étude, nous avons aussi enregistré une prévalence élevée des pathogènes bactériens (68%). *S. pneumoniae* (56%) et Hib (12%) sont respectivement les germes bactériens les plus prévalents. Néanmoins, un taux élevé de colonisation du tractus respiratoire des enfants par ces bactéries a été longuement rapporté dans la littérature dont seulement une proportion faible provoque des infections (Adegbola *et al.*, 2014; Aydemir *et al.*, 2014)

La prévalence élevée de *S. pneumoniae* dans cette étude peut s'expliquer par le fait que cette bactérie est commensale du nasopharynx (Wolter *et al.*, 2014). Des études ont rapporté que la prévalence en portage de *S. pneumoniae* chez les enfants <5 ans est comprise entre 20% à 93% dans les pays à revenu limité (Adegbola *et al.*, 2014).

Afin de mieux appréhender la pathogénicité des organismes commensaux tel que *S. pneumoniae*, il serait préférable de réaliser des analyses sur des échantillons provenant des prélèvements stériles comme le sang ou le liquide céphalo-rachidien (LCR). L'infection invasive au pneumocoque a été démontré être faible (5 - 9%) (Socan *et al.*, 1999; Feikin *et al.*, 2012).

La forte prévalence de *S. pneumoniae* dans les spécimens nasopharyngés utilisés dans le cadre de cette étude peut s'expliquer par l'implication de cette bactérie dans les récurrentes épidémies de méningite enregistrées au Niger. En effet, une étude post vaccinale pour l'introduction du vaccin conjugué PCV 10 en 2014 a rapporté qu'à partir des analyses sur LCR, 26 sérotypes de *S. pneumoniae* étaient responsable de 12% des cas de méningite au Niger (Collard *et al.*, 2013). Ainsi cette forte prévalence pourrait aussi s'expliquer par le fait que le vaccin anti pneumocoque n'a été introduit dans le PEV au Niger qu'en 2014 donc par conséquent notre échantillon n'a bénéficié d'aucune immunisation contre ce germe.

Hib et *S.aureus* qui sont respectivement les deuxième et troisième pathogènes bactériens les plus retrouvés dans cette étude ont aussi été démontrés d'être des agents commensaux du nasopharynx, par conséquent avec un taux de portage élevé surtout chez les jeunes enfants (Adegbola *et al.*, 2014). Au Niger le vaccin anti Hib fait partie du PEV depuis 2008 et est administré en même temps que le vaccin Diphtérie-Tétanos-Pertussis (DTP). Néanmoins Hib est comme le *S. pneumoniae* un germe commensal, trouvé chez les sujets sains en portage. Ce qui explique leur prévalence importante dans les échantillons nasopharyngés utilisés au cours de cette étude.

Ainsi, des études ont rapporté que les échantillons nasopharyngés sont plus importants dans le diagnostic de certaines bactéries qui ont un faible pouvoir de colonisation du nasopharynx telles que *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae* (Verani *et al.*, 2013; Wolter *et al.*, 2014).

Au cours de notre étude, *C. pneumoniae* a été détecté à faible taux (2.5%) tandis qu'aucun cas de *M. pneumoniae* n'a été détecté. Ces bactéries dites atypiques prennent depuis quelques années une part importante dans la transmission des IRAS. Une des raisons de l'émergence de ces bactéries atypiques, est l'introduction des vaccins contre les germes bactériens dominants tels que *S. pneumoniae* et Hib. Ce qui du reste respecterait la règle « la nature a horreur du vide ». L'utilisation des méthodes sérologiques avait permis de rapporter une prévalence moyenne de *C. pneumoniae* de l'ordre de 30% dans des études précédentes (Maysaa et Goda, 2009). Cependant d'autres études ont aussi démontré une prévalence non négligeable de *M. pneumoniae* (<10%) et un faible taux de détection de *C. pneumoniae* (<1%) (Bezerra *et al.*, 2011; Caglayan *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014).

En outre, cette étude nous a permis aussi de révéler une prévalence élevée (78%) des cas de co-infection virus-bactéries telle que rapporté dans plusieurs autres études (Bezerra *et al.*, 2011; Caglayan *et al.*, 2014). Il a été prouvé que les

infections virales peuvent prédisposer à des supra-infections bactériennes en favorisant le site d'attachement des bactéries sur les cellules épithéliales du nasopharynx et à travers l'augmentation de la production du mucus qui promeut la croissance bactérienne (Caglayan *et al.*, 2014; Wolter *et al.*, 2014). En effet les co-infections impliquant le *S. pneumoniae*, VRS, et RV sont les plus fréquentes (> 50%) dans cette étude. Ceci s'explique par la prédominance de ces trois germes. Ainsi nous avons enregistré plusieurs cas de co-détections de deux à six pathogènes (bactériens et viraux) sur un même échantillon. Ceci pourrait s'expliquer non seulement par le large panel des pathogènes détectés mais aussi par la diversité des germes au niveau du site du prélèvement (nasopharynx). Des études précédentes ont en effet souligné de nombreux cas de co-infections impliquant deux à sept pathogènes (Bezerra *et al.*, 2011; Feikin R. *et al.*, 2013) et ceci démontre toute la complexité de la prise en charge des IRAS et par conséquent les rendent souvent fatal chez les jeunes enfants.

La survenue des IRAS est aussi liée à des manifestations cliniques telles que la température, la toux, la dyspnée etc. qui sont définies dans le guide de l'OMS pour les définitions des cas des IRAS chez les enfants et les adultes (Ortiz *et al.*, 2009). En effet il a été souligné que ces manifestations cliniques peuvent être influencées par l'environnement, le comportement social, la promiscuité et par conséquent avoir un impact sur la prise en charge (Ortiz *et al.*, 2009). Ainsi, les pathogènes viraux tels que les VRS, RV et PIV sont beaucoup associés à une forte température et toux/dyspnée qui sont les manifestations les plus fréquentes des IRAS chez les jeunes enfants (Hoffmann *et al.*, 2012). L'association de la fièvre aux symptômes peut souvent rendre compliquée la prise en charge des IRAS dans nos pays, qui sont endémiques pour le paludisme dont la fièvre demeure un des signes cliniques majeurs.

Néanmoins cette étude présente certaines limites qui sont :

Premièrement, la taille moyenne de l'échantillon et le temps d'étude réduisent notre capacité d'appréhender avec précision la saisonnalité liée aux différents pathogènes. Cependant nos résultats suggèrent que le VRS, PIV et MPV sont fréquemment détectés pendant la saison chaude, tandis que le RV et BV sont plus détectés en saison pluvieuse. Il n'existe pas de différence de prévalence des autres virus et bactéries au cours des différentes saisons dans cette étude

Deuxièmement, l'absence des cas contrôles au cours de l'étude limite aussi notre capacité d'évaluer l'association entre la détection des pathogènes avec la maladie. Tandis que la plupart des virus et bactéries identifiés dans cette étude ont été décrits par des études cas contrôles précédentes comme étant des agents causaux des IRAS, l'interprétation de la causalité due au taux élevé des co-infections reste un véritable challenge (Feikin *et al.*, 2012; Owusu *et al.*, 2014). En effet, des virus comme les rhinovirus peuvent généralement être détectés chez des contrôles sains et ainsi rendre l'interprétation de leur détection problématique (Esposito *et al.*, 2014). De même les bactéries telles que les *S. pneumoniae* et Hib sont aussi retrouvées en portage chez des sujets sains même après administration des vaccins surtout dans des pays où sévissent des importantes infections liées à ces germes comme la méningite (Collard *et al.*, 2013).

Troisièmement, les cas positifs aux virus influenza ont été exclus lors de la sélection de l'échantillon de l'étude et ceci limite nos connaissances sur le poids des infections mixtes dues aux virus influenza et aux autres virus respiratoires particulièrement le VRS dont une littérature claire a démontré une forte association (Ucakar *et al.*, 2013; Emukule *et al.*, 2014) .

CONCLUSION

Cette étude montre pour la première fois, la circulation des pathogènes respiratoires (virus et bactéries) chez les enfants de moins de 5 ans au Niger.

La forte prévalence de certains pathogènes viraux et bactériens nous éclaire quant à la nécessité de mettre en place un système national de surveillance des autres virus respiratoires et mieux de renforcer et redynamiser la surveillance de la grippe au Niger. Ceci permettra d'apporter des données nécessaires aux cliniciens et autorités sanitaires pour l'amélioration de la prise en charge et la riposte.

Mieux, au vue de la forte prévalence des virus respiratoires chez les enfants de moins de cinq ans hospitalisés pour IRAS au Niger, il serait intéressant de maitriser la prescription abusive des antibiotiques pour la prise en charge des infections respiratoires aiguës sévères.

Enfin, des vaccins étant maintenant disponibles contre certains pathogènes viraux comme les VRS, PIV3 etc. ; des études plus approfondies pourraient permettre de les inclure dans le programme élargi de vaccination pour l'immunisation des jeunes enfants.

II. DISCUSSION

La distribution de l'âge, du sexe et de la durée des symptômes n'a pas significativement variée parmi les enfants sélectionnés et non sélectionnés à l'étude (y compris ceux testés positifs à influenza). Néanmoins parmi les enfants sélectionnés, il y a une faible proportion significative des spécimens collectés pendant la saison froide (saison favorable à la circulation des virus influenza et par conséquent exclus de l'étude) comparé à la saison chaude. Par contre, il n'y a pas de différence statistique significative dans la proportion des spécimens collectés pendant la saison des pluies ou saison sèche comparé à la saison chaud parmi les enfants sélectionnés et non sélectionnés.

Au moment où de nombreuses populations d'Afrique subsaharienne dont celles du Niger pensent toujours que les maladies dues à l'influenza et aux autres virus respiratoires, constituent des maladies négligées, les virus respiratoires ont été détectés dans 79% des spécimens nasopharyngés collectés chez les enfants de moins de cinq ans au Niger entre 2010 et 2012. Cette prévalence élevée concorde avec celle rapportée dans une étude similaire conduite dans un pays voisin, le Burkina Faso (73%) (Ouedraogo *et al.*, 2014). Dans certains pays d'Afrique, cette prévalence a varié entre (26%) au Ghana (Kwofie *et al.*, 2012), 60% en Egypte (Shafik *et al.*, 2012) et 68% au Kenya (68%) (Feikin *et al.*, 2013). Ces écarts de prévalence peuvent être principalement attribués aux différences de conditions climatiques, des critères d'inclusion, à la définition des cas mais aussi du niveau du plateau technique des différents laboratoires. C'est peut-être pour les mêmes raisons qu'en Chine la prévalence des virus respiratoires était de 56% (Liu *et al.*, 2014) alors qu'elle avait franchi la barre de 85% au Brésil (Bezerra *et al.*, 2011).

Nos résultats ont montré que le VRS était le virus le plus prédominant dans nos spécimens issus des enfants de moins d'un an d'âge (48%) contre (17,4%) chez les enfants âgés de 1 à 4 ans ($p < 0,001$). Nos résultats corroborent ceux de

SUGGESTIONS ET PERSPECTIVES

- Nous suggérons aux cliniciens d'adhérer à la surveillance de la grippe en cours au Niger ; d'avoir recours au diagnostic de laboratoire tant que ce possible pour limiter l'utilisation abusive des antibiotiques dans la prise en charge des IRAS.
- Nous invitons les responsables du ministère en charge de la santé d'inclure les IRAS parmi les maladies à déclaration obligatoire (MDO) pour mieux assurer leur surveillance surtout chez les enfants < 5 ans.
- Le CERMES doit envisager à étendre son expertise en plus de la surveillance de la grippe aux autres virus respiratoires en renforçant son plateau technique et en coordonnant leur surveillance.
- Le CERMES se doit aussi d'envisager de mettre en place l'isolement viral pour devenir un « National influenza centre » (NIC) autrement dit un centre national de référence pour la grippe au Niger.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

1. Adegbola R.A., Deantonio R., Hill P.C., Roca A., Usuf E., Hoet B. et al., (2014). "Carriage of *Streptococcus pneumoniae* and other respiratory bacterial pathogens in low and lower-middle income countries: a systematic review and meta-analysis." PLoS One **9**(8): e103293.
2. Adegbola R.A., Falade A.G., Sam B.E., Aidoo M., Baldeh I., Hazlett D. et al., (1994). "The etiology of pneumonia in malnourished and well-nourished Gambian children." Pediatr Infect Dis J **13**(11): 975-982.
3. Arnott A., Vong S., Rith S., Naughtin M., Ly S., Guillard B. et al., (2013). "Human bocavirus amongst an all-ages population hospitalised with acute lower respiratory infections in Cambodia." Influenza and other respiratory viruses **7**(2): 201-210.
4. Arruda E., Jones M.H., Escremin De Paula F., Chong D., Bugarin G., Notario G. et al., (2014). "The burden of single virus and viral coinfections on severe lower respiratory tract infections among preterm infants: a prospective birth cohort study in Brazil." The Pediatric Infectious Disease Journal **33**(10): 997-1003.
5. Atkinson T.P., Balish M.F. et Waites K.B. (2008). "Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections." FEMS microbiology reviews **32**(6): 956-973.
6. Aubry P. (2014). "Infections respiratoires aiguës " Medecine Tropicale Diplome de Médecine Tropicale des Pays de l'Océan Indien.www.medecinetropicale.free.fr/cours/infrespi.htm. Mise à jour le 10/01/2014.
7. Aydemir O., Aydemir Y. et Ozdemir M. (2014). "The role of multiplex PCR test in identification of bacterial pathogens in lower respiratory tract infections." Pakistan journal of medical sciences **30**(5): 1011-1016.

8. Bezerra P.G., Britto M.C., Correia J.B., Duarte Mdo C., Fonceca A.M., Rose K. et al., (2011). "Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years." PLoS One **6**(4): e18928.
9. Brieu N., Guyon G., Rodiere M., Segondy M. et Foulongne V. (2008). "Human bocavirus infection in children with respiratory tract disease." The Pediatric Infectious Disease Journal **27**(11): 969-973.
10. Caglayan D., Pullukcu H., Cicek C., Sipahi O.R., Tasbakan S. et Atalay S. (2014). "Bacterial and viral etiology in hospitalized community acquired pneumonia with molecular methods and clinical evaluation." Journal of infection in developing countries **8**(4): 510-518.
11. Cai X.Y., Wang Q., Lin G.Y., Cai Z.W., Lin C.X., Chen P.Z. et al., (2014). "Respiratory virus infections among children in South China." J Med Virol **86**(7): 1249-1255.
12. Cenac A., Djibo A., Chaigneau C., Degbey H., Sueur J.M. et Orfila J. (2002). "[Chlamydia pneumoniae and acute respiratory tract infections in breast-feeding infants: simultaneous mother-child serological study in Niamey (Niger)]." Sante **12**(2): 217-221.
13. Charles R. Woods K.a.B. (2013). "Viral Infections in Children with Community-Acquired Pneumonia." Respiratory infections.
14. Chen W.J., Arnold J.C., Fairchok M.P., Danaher P.J., McDonough E.A., Blair P.J. et al., (2015). "Epidemiologic, clinical, and virologic characteristics of human rhinovirus infection among otherwise healthy children and adults: Rhinovirus among adults and children." Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology **64**: 74-82.
15. Collard J.M., Alio Sanda A.K. et Jusot J.F. (2013). "Determination of pneumococcal serotypes in meningitis cases in Niger, 2003-2011." PLoS One **8**(3): e60432.

16. Elisabeth G., Renée C Biesmans, Anton G Buiting, Charles C Obihara et Rossen J.W. (2012). "Diagnostic value of respiratory virus detection in symptomatic children using real-time PCR." Virology Journal **9**:276.
17. Emukule G.O., Khagayi S., Mcmorrow M.L., Ochola R., Otieno N., Widdowson M.A. et al., (2014). "The Burden of Influenza and RSV among Inpatients and Outpatients in Rural Western Kenya, 2009-2012." PLoS One **9**(8): e105543.
18. Enan K.A., Nabeshima T., Kubo T., Buerano C.C., El Hussein A.R., Elkhidir I.M. et al., (2013). "Survey of causative agents for acute respiratory infections among patients in Khartoum-State, Sudan, 2010-2011." Virology Journal **10**: 312.
19. Esposito S., Dacco V., Daleno C., Gambazza S., Montinaro V., Bisogno A. et al., (2014). "Human rhinovirus infection in children with cystic fibrosis." Japanese journal of infectious diseases **67**(5): 399-401.
20. Feikin D.R., Njenga M.K., Bigogo G., Aura B., Aol G., Audi A. et al., (2012). "Etiology and Incidence of viral and bacterial acute respiratory illness among older children and adults in rural western Kenya, 2007-2010." PLoS One **7**(8): e43656.
21. Feikin D.R., Njenga M.K., Bigogo G., Aura B., Aol G., Audi A. et al., (2013). "Viral and bacterial causes of severe acute respiratory illness among children aged less than 5 years in a high malaria prevalence area of western Kenya, 2007-2010." Pediatr Infect Dis J **32**(1): e14-19.
22. Feikin R., M. Kariuki Njenga et Bigogo G. (2013). "Viral and Bacterial Causes of Severe Acute Respiratory Illness Among children Aged Less Than 5 Years in a High Malaria Prevelence Area of Western Kenya. 2007-2010." The Pediatric Infectious Disease Journal **32**.
23. Feng L., Lai S., Li F., Ye X., Li S., Ren X. et al., (2014). "[Viral etiologies of hospitalized pneumonia patients aged less than five years in

- six provinces, 2009-2012]." Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi **35**(6): 646-649.
24. Feng L., Li Z., Zhao S., Nair H., Lai S., Xu W. et al., (2014). "Viral etiologies of hospitalized acute lower respiratory infection patients in China, 2009-2013." PLoS One **9**(6): e99419.
25. Gendrel D. (2002). "[Community-acquired pneumonia in children: etiology and treatment]." Arch Pédiatr
26. Heraud J.M., Njouom R., Rousset D., Kadjo H., Caro V., Ndiaye M.N. et al., (2012). "Spatiotemporal circulation of influenza viruses in 5 African countries during 2008-2009: a collaborative study of the Institut Pasteur International Network." J Infect Dis **206 Suppl 1**: S5-13.
27. Hoffmann J., Rabazanahary H., Randriamarotia M., Ratsimbaoa A., Najjar J., Vernet G. et al., (2012). "Viral and atypical bacterial etiology of acute respiratory infections in children under 5 years old living in a rural tropical area of Madagascar." PLoS One **7**(8): e43666.
28. Izadnegahdar R., Cohen A.L., Klugman K.P. et Qazi S.A. (2013). "Childhood pneumonia in developing countries." Lancet Respir Med **1**(7): 574-584.
29. Jusot J.F., Adamou L. et Collard J.M. (2012). "Influenza transmission during a one-year period (2009-2010) in a Sahelian city: low temperature plays a major role." Influenza Other Respir Viruses **6**(2): 87-89.
30. Kadioglu A., Weiser J.N., Paton J.C. et Andrew P.W. (2008). "The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease." Nature reviews. Microbiology **6**(4): 288-301.
31. Khor C.S., Sam I.C., Hooi P.S., Quek K.F. et Chan Y.F. (2012). "Epidemiology and seasonality of respiratory viral infections in hospitalized children in Kuala Lumpur, Malaysia: a retrospective study of 27 years." BMC pediatrics **12**: 32.

- 32.Kouni S., Karakitsos P., Chranioti A., Theodoridou M., Chrousos G. et Michos A. (2013). "Evaluation of viral co-infections in hospitalized and non-hospitalized children with respiratory infections using microarrays." Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases **19**(8): 772-777.
- 33.Kroll J.L. et Weinberg A. (2011). "Human metapneumovirus." Seminars in respiratory and critical care medicine **32**(4): 447-453.
- 34.Kronman M.P., Zhou C. et Mangione-Smith R. (2014). "Bacterial Prevalence and Antimicrobial Prescribing Trends for Acute Respiratory Tract Infections." Pediatrics.
- 35.Kwofie T.B., Anane Y.A., Nkrumah B., Annan A., Nguah S.B. et Owusu M. (2012). "Respiratory viruses in children hospitalized for acute lower respiratory tract infection in Ghana." Virology Journal **9**: 78.
- 36.Lassauniere R., Kresfelder T. et Venter M. (2010). "A novel multiplex real-time RT-PCR assay with FRET hybridization probes for the detection and quantitation of 13 respiratory viruses." Journal of virological methods **165**(2): 254-260.
- 37.Lekana-Douki S.E., Nkoghe D., Drosten C., Ngoungou E.B., Drexler J.F. et Leroy E.M. (2014). "Viral etiology and seasonality of influenza-like illness in Gabon, March 2010 to June 2011." BMC infectious diseases **14**: 373.
- 38.Lina, M. V. et S. F. (1996). "Surveillance of community-acquired viral infections due to respiratory viruses in Rhone-Alpes (France) during winter 1994 to 1995." J Clin Microbiol **34**:3007–11.
- 39.Liu C.Y., Xiao Y., Xie Z.D., Ren L.L., Hu Y.H., Yao Y. et al., (2013). "[Viral etiology of acute respiratory tract infection among pediatric inpatients and outpatients from 2010 to 2012 in Beijing, China]." Zhonghua er ke za zhi. Chinese journal of pediatrics **51**(4): 255-259.

40. Liu W.K., Liu Q., Chen De H., Liang H.X., Chen X.K., Chen M.X. et al., (2014). "Epidemiology of acute respiratory infections in children in guangzhou: a three-year study." PLoS One **9**(5): e96674.
41. Maysaa et Goda (2009). "Clinico-pathological study of atypical pathogens in community-acquired pneumonia: a prospective study." Journal of infection in developing countries **3**(3): 199-205.
42. Michelow I.C., Olsen K., Lozano J., Rollins N.K., Duffy L.B., Ziegler T. et al., (2004). "Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children." Pediatrics **113**(4): 701-707.
43. Nair H., Simoes E.A., Rudan I., Gessner B.D., Azziz-Baumgartner E., Zhang J.S. et al., (2013). "Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis." Lancet **381**(9875): 1380-1390.
44. Niang M.N., Diop O.M., Sarr F.D., Goudiaby D., Malou-Sompy H., Ndiaye K. et al., (2010). "Viral etiology of respiratory infections in children under 5 years old living in tropical rural areas of Senegal: The EVIRA project." J Med Virol **82**(5): 866-872.
45. Ortiz J.R., Sotomayor V., Uez O.C., Oliva O., Bettels D., Mccarron M. et al., (2009). "Strategy to enhance influenza surveillance worldwide." Emerging infectious diseases **15**(8): 1271-1278.
46. Ouedraogo S., Traore B., Nene Bi Z.A., Yonli F.T., Kima D., Bonane P. et al., (2014). "Viral etiology of respiratory tract infections in children at the pediatric hospital in ouagadougou (burkina faso)." PLoS One **9**(10): e110435.
47. Owusu M., Annan A., Corman V.M., Larbi R., Anti P., Drexler J.F. et al., (2014). "Human coronaviruses associated with upper respiratory tract infections in three rural areas of Ghana." PLoS One **9**(7): e99782.
48. Palmer S.G., Devito I., Jenkins S.G., Niewiesk S., Porotto M. et Moscona A. (2014). "Circulating clinical strains of human parainfluenza virus

- reveal the viral entry requirements for in vivo infection." Journal of virology.
49. Pavia A.T. (2011). "Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis." Clin Infect Dis **52 Suppl 4**: S284-289.
50. Pica N. et Bouvier N.M. (2012). "Environmental factors affecting the transmission of respiratory viruses." Current opinion in virology **2**(1): 90-95.
51. Pretorius M.A., Madhi S.A., Cohen C., Naidoo D., Groome M., Moyes J. et al., (2012). "Respiratory viral coinfections identified by a 10-plex real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assay in patients hospitalized with severe acute respiratory illness--South Africa, 2009-2010." J Infect Dis **206 Suppl 1**: S159-165.
52. Radin J.M., Katz M.A., Tempia S., Talla Nzussouo N., Davis R., Duque J. et al., (2012). "Influenza surveillance in 15 countries in Africa, 2006-2010." The Journal of infectious diseases **206 Suppl 1**: S14-21.
53. Sentilhes A.C., Choumlivong K., Celhay O., Sisouk T., Phonekeo D., Vongphrachanh P. et al., (2013). "Respiratory virus infections in hospitalized children and adults in Lao PDR." Influenza Other Respir Viruses **7**(6): 1070-1078.
54. Shafik C.F., Mohareb E.W., Yassin A.S., Amin M.A., El Kholy A., El-Karakasy H. et al., (2012). "Viral etiologies of lower respiratory tract infections among Egyptian children under five years of age." BMC infectious diseases **12**: 350.
55. Socan M., Marinic-Fiser N., Kraigher A., Kotnik A. et Logar M. (1999). "Microbial aetiology of community-acquired pneumonia in hospitalised patients." European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology **18**(11): 777-782.

56. Tarnagda Z., Youbare I., Ilboudo A.K., Kagone T., Sanou A.M., Cisse A. et al., (2014). "Sentinel surveillance of influenza in Burkina Faso: identification of circulating strains during 2010-2012." Influenza and other respiratory viruses **8**(5): 524-529.
57. Ucakar V., Socan M. et Trilar K.P. (2013). "The impact of influenza and respiratory syncytial virus on hospitalizations for lower respiratory tract infections in young children: Slovenia, 2006-2011." Influenza Other Respir Viruses **7**(6): 1093-1102.
58. Verani J.R., Mccracken J., Arvelo W., Estevez A., Lopez M.R., Reyes L. et al., (2013). "Surveillance for hospitalized acute respiratory infection in Guatemala." PLoS One **8**(12): e83600.
59. Verboon-Macielek M.A., Krediet T.G., Gerards L.J., De Vries L.S., Groenendaal F. et Van Loon A.M. (2008). "Severe neonatal parechovirus infection and similarity with enterovirus infection." The Pediatric Infectious Disease Journal **27**(3): 241-245.
60. Who (1988). "Rapport du programme de lutte contre les infections respiratoires aigues " **WHO/ARI/89.3**.
61. Who (2014). "Infection prevention and control of epidemic and pandemic prone acute respiratory infections." (ISBN 978 92 4 150713 4).
62. Who/Unicef (2009). "Global Action Plan for Prevention and Control of Pneumonia " **WHO/FCH/CAH/NCH/09.04**.
63. Wolter N., Tempia S., Cohen C., Madhi S.A., Venter M., Moyes J. et al., (2014). "High nasopharyngeal pneumococcal density, increased by viral coinfection, is associated with invasive pneumococcal pneumonia." The Journal of infectious diseases **210**(10): 1649-1657.
64. Zuccotti G., Dilillo D., Zappa A., Galli E., Amendola A., Martinelli M. et al., (2011). "Epidemiological and clinical features of respiratory viral infections in hospitalized children during the circulation of influenza virus A(H1N1) 2009." Influenza Other Respir Viruses **5**(6): e528-534

ANNEXES

ANNEXE 1 : Certificat de contrôle de qualité de l'OMS

	<p>Centre for Health Protection Department of Health The Government of the Hong Kong Special Administrative Region</p>
<h2>CERTIFICATE OF COMPLETION</h2>	
<p>This certificate is awarded to:</p>	
<p>Centre de Recherche Médicale et Sanitaire (CERMES), Niger</p>	
<p>In recognition of the completion of EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT PROGRAMME FOR THE DETECTION OF INFLUENZA VIRUS TYPE A BY PCR PANELS 9 AND 10 January — March 2011 and June — July 2011</p>	
<p><i>Supported by:</i> World Health Organization (WHO)</p>	
<p><i>Organized by:</i> Centre for Health Protection, Hong Kong SAR</p>	
<p>Dr Wilina Lim – CHP</p>	<p>11 October 2011</p>

ANNEXE 2 : Fiche de consultation des patients pour la surveillance de la grippe au Niger.

Questionnaire pour tout patient remplissant une des définitions de cas			
SURVEILLANCE DE LA GRIPPE et AUTRES IRA			
<i>Critère de déclaration : se référer aux définitions de cas</i> Attention, les symptômes constatés le jour de la consultation doivent dater de moins de 7 jours Ne remplissez pas le questionnaire et ne faites pas de prélèvement si début des premiers signes cliniques 7 jours et plus			
Date de la consultation : ____/____/2012		Centre de : _____	
Nom du médecin major : _____			
Numéro d'identification : sera déterminé par le CERMES		Le nom et prénom doivent être reportés sur le tube du prélèvement naso-pharyngé	
Nom : _____		Prénom : _____	
Sexe : <input type="checkbox"/> Homme <input type="checkbox"/> Femme		Date de naissance : ____/____/____ ou indiquer le mois, l'âge	
Age : ____ ans ou âge de 1 à 12 ans, âge en mois : ____ mois			
Le patient est-il hospitalisé ou doit-il être hospitalisé ? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>			
Lieu de résidence du sujet : _____			
District : _____		Commune : _____	
Quartier : _____		Contact téléphonique : _____	
Mention de séjour en dehors du Niger : _____			
Le patient a-t-il voyagé en dehors du Niger il y a moins d'un mois ? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Ne sait pas <input type="checkbox"/>			
Dans quel pays ? _____			
Combien de temps a-t-il séjourné ? _____			
Date de début des signes : ____/____/____			
Température axillaire (à l'aide d'un thermomètre) Mesurée lors de la consultation au centre ou à l'hôpital Température (≥ 37,5°) <input type="checkbox"/> Valeur : ____ °C			
suspicion			
Toux <input type="checkbox"/>		Réservé au CERMES	
Maux de gorge <input type="checkbox"/>		Grippe <input type="checkbox"/>	
Tachypnée <input type="checkbox"/>		(si un des 2 signes ci-contre en plus de la fièvre)	
Dyspnée <input type="checkbox"/>		Autres virus respiratoires <input type="checkbox"/>	
		(si au moins un des deux signes ci-contre en plus de la fièvre et toux)	
Pour les patients de 2 mois à 4 ans seulement présentant une toux ou une dyspnée tachypnée :			
Incapable de boire, allaiter <input type="checkbox"/>		Cyanose <input type="checkbox"/>	
Lethargie <input type="checkbox"/>		Battements ailes du nez <input type="checkbox"/>	
Inconscience <input type="checkbox"/>		Stridor chez enfant calme <input type="checkbox"/>	
Vomissement de tout aliment <input type="checkbox"/>		SaO ₂ < 90% <input type="checkbox"/>	
Prélèvements pour confirmation			
Prélèvement naso-pharyngé fait : Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>			
Date : ____/____/____			
Devenir du patient : guérison <input type="checkbox"/> décès <input type="checkbox"/> - Cause du décès : _____			

ANNEXE 3 : Procédure d'extraction des ARN et ADN à l'aide du kit QIAGEN.

CERMES – Unité Biologie – LNRG PROCEDURE STANDARDISEE	PS/ IRA/LNRG/--
Extraction de l'ARN et ADN viral à l'aide du kit QIAGEN.	Version 02...
	Date d'application : 01/01/2014

REDACTEUR	Vérificateur	APPROBATEUR	DESTINATAIRES
LAGARE Adamou	COLLARD Jean Marc	Chef Unité Biologie	Personnels Laboratoire national de référence pour la grippe
Visa date	Visa Date	Visa date	

I. Préparation des réactifs

a) Carrier RNA : Ajouter 310 µL du buffer AVE dans le tube contenant 310µg de carrier lyophilisé pour obtenir une solution de 1 µg/µl. Faire des Aliquots et conserver à -20°C. Ne pas congeler et décongeler plus de 3 fois.

b) Tampon AVL : Vérifier la formation de précipité , si c'est le cas , incubé à 65°C jusqu'à dissolution complète du précipité.

Calculer le volume suivant la formule suivante :

$$n \times 0.56 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 10\mu\text{l/ml} = z \mu\text{l}$$

n=le nombre d'échantillons

y=le volume du tampon AVL

z=le volume du mélange carrier/AVE à ajouter au tampon AVL.

c) Tampon de lavage AW1 : Ajouter 25 ml d'éthanol absolu au 19 ml de tampon pour obtenir 44 ml de tampon de lavage.

d) Tampon de lavage AW2 : Ajouter 30 ml d'éthanol absolu au 13 ml de tampon pour obtenir 43 ml tampon de lavage.

II. Extraction de l'ARN et ADN viral :

1. Mettre 560µL de tampon AVL + Carrier dans un tube Eppendorf
2. Ajouter 140µL de liquide biologique
3. Ajouter 3µL de contrôle interne IC
4. Mélanger au vortex pendant 30 secondes
5. Incuber 10 min à température ambiante
6. Ajouter 560µL d'éthanol 100%
7. Mélanger au vortex pendant 30 secondes
8. Mettre 630µL du mélange 1 sur la colonne Qiagen
9. Centrifuger a 6000g (8000 rpm) pendant 1 mn
10. Changer les tubes collecteurs
11. Reprendre l'étape 8 à 9
12. Placer les colonnes sur des nouveaux tubes collecteurs
13. Ajouter 500µL de tampon de lavage AW1 dans les colonnes
14. Centrifuger a 6000g (8000 rpm) pendant 1 mn
15. Changer des tubes collecteurs
16. Ajouter 500µL de tampon de lavage AW2 dans les colonnes
17. Centrifuger a 20000g (14000 rpm) pendant 3 mn
18. Changer des tubes collecteurs
19. Centrifuger a 6000g (8000 rpm) pendant 1 mn
20. Placer la colonne sur un tube Eppendorf
21. Ajouter 70µL de tampon AVE sur la membrane de silice des colonnes

22. Incuber 5 min à 65°C (bain Marie)
23. Centrifuger à 6000g (8000 rpm) pendant 1 mn
24. Récupérer l'éluât (Acides nucléiques)
25. Conservation de les acides nucléiques à -20°C