

# TABLE DES MATIERES

DEDICACE .....	i
REMERCIEMENTS .....	ii
TABLE DES MATIERES .....	iv
LISTE DES ABREVIATIONS .....	vii
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX .....	1
RESUME .....	2
<b>PREMIERE PARTIE : GENERALITES .....</b>	<b>3</b>
1. INTRODUCTION .....	4
1.1. GENERALITES SUR LES MENINGITES BACTERIENNES AIGUES .....	4
1.2. ENONCE DU PROBLEME .....	5
2. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE .....	7
2.1. DEFINITION .....	7
2.2. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES DE <i>Nm</i> , <i>Sp</i> et <i>Hi b</i> .....	8
2.2.1. <i>Neisseria meningitidis</i> .....	8
2.2.1.1. Caractères morphologiques .....	8
2.2.1.2. Caractères culturaux .....	9
2.2.1.2.1. Conditions et exigences de culture .....	9
2.2.1.2.2. Milieux et aspects des cultures .....	9
2.2.1.3. Caractères biochimiques .....	10
2.2.1.4. Caractères antigéniques .....	10
2.2.1.5. Vitalité et conservation .....	11
2.2.2. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	11
2.2.2.1. Caractères morphologiques .....	11
2.2.2.2. Caractères culturaux .....	12
2.2.2.2.1. Conditions et exigences de cultures .....	12
2.2.2.2.2. Milieux et aspects des cultures .....	12
2.2.2.3. Caractères biochimiques .....	13
2.2.2.4. Caractères antigéniques .....	13
2.2.2.5. Vitalité et conservation .....	14
2.2.3. <i>Haemophilus influenzae</i> .....	14
2.2.3.1. Caractères morphologiques .....	15
2.2.3.2. Caractères culturaux .....	15
2.2.3.3. Caractères biochimiques .....	16
2.2.3.4. Caractères antigéniques .....	16
2.2.3.5. Vitalité et conservation .....	16
2.3. EPIDEMIOLOGIE DES MENINGITES BACTERIENNES AIGUËS .....	16
2.4. PHYSIOPATHOLOGIE DES MENINGITES BACTERIENNES .....	18
2.5. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE .....	19
2.5.1. Le prélèvement .....	19
2.5.2. Les examens directs .....	20
2.5.2.1. Aspect macroscopique .....	20
2.5.2.2. Analyses cytologiques quantitatives et qualitatives .....	20

2.5.3. Recherche d'antigènes bactériens solubles .....	21
2.5.4. Examen chimique du LCR .....	21
2.5.5. Mise en culture-identification et antibiogramme.....	22
2.5.5.1. Isolement-identification de l'espèce .....	22
2.5.5.2. Antibiogramme.....	23
2.5.6. La réaction en chaîne par la polymérase .....	23
2.6. <i>PREVENTION ET TRAITEMENT</i> .....	25
2.6.1. La prévention.....	25
2.6.1.1. La vaccination.....	25
2.6.1.2. La chimioprophylaxie .....	25
2.6.1.3. Règles d'hygiène .....	26
2.6.2. Traitement .....	26
2.6.3. La surveillance microbiologique.....	27
<b>DEUXIEME PARTIE : NOTRE ETUDE.....</b>	<b>28</b>
3. OBJECTIFS DE L'ETUDE .....	29
3.1. <i>OBJECTIF GENERAL</i> .....	29
3.2. <i>OBJECTIFS SPECIFIQUES</i> .....	29
4. MATERIEL ET METHODES .....	30
4.1. <i>MATERIEL</i> .....	30
4.1.1. Site de l'étude.....	30
4.1.2. Type et période d'étude .....	30
4.1.3. Type d'échantillonnage .....	30
4.1.4. Critères de définition des cas .....	30
4.1.4.1. Critères d'inclusion de cas suspects de méningites bactériennes .....	30
4.1.4.2. Critère de laboratoire pour le diagnostic biologique .....	31
4.1.5. Collecte des données .....	31
4.1.6. Variables de l'étude .....	31
4.2. <i>METHODES</i> .....	31
4.2.1. Traitement des spécimens de LCR aux laboratoires .....	31
4.2.2. Analyses bactériologiques .....	32
4.2.2.1. Examen macroscopique .....	32
4.2.2.2. Examen cytologique .....	32
4.2.2.3. Recherche d'antigènes solubles bactériens .....	33
4.2.2.4. Mise en culture et identification .....	33
4.2.2.5. Antibiogramme.....	34
4.2.2.6. Conservation des souches .....	35
4.2.3. Analyses par PCR .....	35
4.2.4. Méthodes d'analyse des données .....	35
5. RESULTATS DE L'ETUDE.....	36
5.1. <i>REPARTITION DES CAS CONFIRMES DE MENINGITES BACTERIENNES.</i> .....	36
5.1.1. Répartition des cas de méningites bactériennes selon la classe d'âge et le sexe.....	36
5.1.2. Répartition des cas de méningites bactériennes par districts .....	36
5.1.3. Description de l'aspect macroscopique des LCR. ....	37
5.2. <i>DISTRIBUTION DES ESPECES BACTERIENNES DE L'ETUDE</i> .....	37
5.2.1. Répartition des espèces bactériennes identifiées au Gram.....	37
5.2.2. Répartition des espèces bactériennes détectées au Latex.....	38
5.2.3. Répartition des espèces bactériennes isolées à la culture. ....	38
5.2.4. Répartition des espèces bactériennes identifiées à la PCR .....	39

<b>5.3. RESULTATS DES DIFFERENTES METHODES D'ANALYSES VIS-A-VIS DE LA CULTURE .....</b>	<b>39</b>
5.3.1. Résultats de la culture et de l'examen direct (Gram).....	40
5.3.2. Résultats de la culture et du latex.....	40
5.3.3. Résultats de la culture et de la PCR .....	41
<b>5.4. SENSIBILITE DES GERMES ISOLES AUX ANTIBIOTIQUES TESTES .....</b>	<b>41</b>
<b>6. DISCUSSION .....</b>	<b>42</b>
6.1. LIMITES DE NOTRE ETUDE .....	42
6.2. COMMENTAIRES .....	42
<b>7. PERSPECTIVES .....</b>	<b>49</b>
<b>8. CONCLUSION .....</b>	<b>50</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>52</b>
<b>ANNEXE I: COLORATION DE MAY-GRUNWALD-GIEMSA (MGG).....</b>	<b>I</b>
<b>ANNEXE II : COLORATION DE GRAM.....</b>	<b>I</b>
<b>ANNEXE III : RECHERCHE DES ANTIGENES SOLUBLES .....</b>	<b>II</b>
<b>ANNEXE IV : TEST DE L'OXYDASE DE KOVACS .....</b>	<b>IV</b>
<b>ANNEXE V : GALERIE <i>Api Neisseria Haemophilus (NH)</i>.....</b>	<b>IV</b>
<b>ANNEXE VI : PROCEDURE TECHNIQUE DU LABORATOIRE DE PCR .....</b>	<b>V</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ADN:</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AMP:</b>	Agence de Médecine Préventive
<b>C3G:</b>	Céphalosporine de troisième génération
<b>CM:</b>	Centre MURAZ
<b>CO<sub>2</sub>:</b>	Dioxyde de carbone
<b>CTA:</b>	Gélose Cystine trypticase
<b>dNTP:</b>	désoxyriboNucléoside Triphosphate
<b>GA:</b>	Gélose à l'ascite
<b>GC:</b>	Gélose chocolat
<b>GSC:</b>	Gélose au sang cuit
<b>GSF:</b>	Gélose au sang frais
<b>H.i:</b>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<b>H<sub>2</sub>S:</b>	Sulfure d'hydrogène
<b>LCR:</b>	Liquide céphalorachidien
<b>MGG:</b>	May-Grunwald-Giemsa
<b>MH:</b>	Mueller Hinton
<b>N.m:</b>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<b>NaCl:</b>	Chlorure de Sodium
<b>NAD:</b>	Nicotinamide-Adénine-Dinucléotide
<b>NH:</b>	<i>Neisseria Haemophilus</i>
<b>ODC:</b>	Ornityl décarboxylase
<b>OMS:</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>ONPG:</b>	Ortho-nitrophenyl-β-galactoside
<b>PBS:</b>	Phosphate Buffered Saline=Tampon phosphate
<b>PCR:</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>Péni G:</b>	Pénicilline G
<b>PLP:</b>	Protéine liant les pénicillines
<b>PRP:</b>	Polyribosylribitol phosphate
<b>PSDP:</b>	Pneumocoque de sensibilité diminué à la pénicilline
<b>PVX:</b>	PolyViteX
<b>S.p:</b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<b>SMX-TMP:</b>	Sulfaméthoxazole-Trimétoprime
<b>Taq:</b>	Termus aquaticus
<b>T-I:</b>	Trans-Isolate

# **LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX**

## **FIGURES**

Figure 1: *N. meningitidis*, ensemencement en stries et aspect des colonies sur gélose au sang.

Figure 2: Les réactions d'acidification à partir des glucides en gélose cystine-trypticase (CTA).

Figure 3: *S. pneumoniae*, ensemencement en stries et aspect des colonies sur gélose au sang.

Figure 4: Représentation schématique de la structure et de la localisation des composants de surface d'un pneumocoque encapsulé.

Figure 5: *H. influenzae*, ensemencement en stries et aspect des colonies sur gélose chocolat

Figure 6: Détermination des espèces bactériennes responsables de méningites par PCR:

Figures 7: Répartition des germes identifiés au Gram.

Figure 8: Répartition des germes détectés au latex.

Figure 9: Fréquence des germes isolés à la culture.

Figure 10: Fréquence des germes identifiés à la PCR.

## **TABLEAUX**

Tableau I: Répartition des cas de méningites bactériennes selon le sexe et l'âge.

Tableau II: Répartition des méningites bactériennes par districts.

Tableau III: Description de l'aspect des LCR.

Tableau IV: Les résultats globaux des différentes techniques d'analyses

Tableaux V: Résultats de la culture et de l'examen direct.

Tableau VI: Résultats de la culture et du latex

Tableau VII: Résultats de la culture et de la PCR

Tableau VIII: Sensibilité des germes isolés aux antibiotiques

## **RESUME**

**Objectif:** Etudier les profils bactériologiques et moléculaires des méningites bactériennes aiguës.

**Matériel et méthodes:** Ont été inclus dans l'étude, tous les cas de méningites bactériennes confirmés par les méthodes classiques de bactériologie (Gram, latex et culture) et de biologie moléculaire (PCR) entre 2007 et 2008. Les LCR provenaient des sept districts de la région sanitaire des Hauts Bassins (Burkina Faso) et analysés au laboratoire de bactériologie du Centre Muraz et au laboratoire mixte de PCR Centre Muraz/AMP.

**Résultats:** 198 cas de méningites bactériennes ont été retenus. Les bactéries identifiées ont été principalement *N. meningitidis* (78% au Gram et au latex, 80% à la PCR et 82% à la culture), *S. pneumoniae* (17% à la culture, 18% au latex et à la PCR, 21% au Gram), *H. influenzae* (1%). La sensibilité des différentes méthodes vis-à-vis de la culture ont été de 94,5% pour le Gram, 96,3% pour le latex et de 93,4% pour la PCR. Selon l'âge, 77,4% des cas ont été diagnostiqués chez les moins de 15 ans avec une prédominance de *N. meningitidis* et *S. pneumoniae* chez les enfants de 5 à 14 ans, soit 52%. Vis-à- vis des antibiotiques testés, les souches présentaient une bonne sensibilité pour la ceftriaxone, l'ampicilline, le chloramphénicol (sauf le *Sp* qui présentaient 66,7% pour cette molécule) et de sensibilité variable pour la pénicilline G/Oxacilline.

**Conclusion :** Le couplage des méthodes bactériologiques et moléculaire s'impose dans la surveillance microbiologique dans les laboratoires nationaux de référence afin d'identifier les souches circulant et de suivre leur sensibilité moléculaire vis-à-vis des antibiotiques efficaces et accessibles.

**Mots clés :** Méningites bactériennes/Agents étiologiques/Bactériologie/PCR/Hauts Bassins.

**PREMIERE PARTIE :**  
**GENERALITES**

Rapport  
Gadzuit.com

# 1. INTRODUCTION

## 1.1. GENERALITES SUR LES MENINGITES BACTERIENNES AIGUES

La méningite est une inflammation des membranes (méninges) cérébrales et médullaires dans lesquelles circule le liquide céphalorachidien. Cette infection est généralement causée par des bactéries, parfois des virus, des parasites ou des champignons microscopiques.

Les méningites purulentes sont les plus fréquentes. Elles sont causées par les bactéries et leur transmission se fait d'homme à homme par les sécrétions respiratoires. Elles sont également la cause majeure d'importantes morbidités et de mortalité dans le monde. L'OMS estime à plus d'un million de cas de méningites épidémiques qui sont survenus dans la « ceinture de la méningite » de LAPEYSONNIE au cours des 20 dernières années (1986-2006) et ont provoqué près de 90000 décès (1).

Dans le monde, plusieurs types de bactéries sont responsables des méningites dont les principales sont *Neisseria meningitidis* (*Nm*) ou méningocoque, *Streptococcus pneumoniae* (*Sp*) ou pneumocoque et *Haemophilus influenzae* type b (*Hi b*).

*N. meningitidis* est le germe susceptible de provoquer des épidémies importantes. *S. pneumoniae* est la principale cause des méningites endémiques (2, 3).

En Afrique subsaharienne, les épidémies de méningites bactériennes aiguës récurrentes demeurent un problème majeur de santé publique. Ces épidémies saisonnières dont la létalité atteint 10 à 15% sont favorisées par l'effet de l'harmattan (4). Elles touchent tous les âges, du nourrisson à la personne âgée, en passant par les enfants et les adultes jeunes au cours des épidémies. Les taux d'attaque sont fonction de l'agent étiologique isolé et de l'âge (3, 5, 6, 7).

Le diagnostic des méningites bactériennes est une urgence médicale. Il importe donc de connaître l'étiologie des méningites afin de mettre en œuvre rapidement l'antibiothérapie la mieux adaptée. C'est pourquoi les approches de diagnostic direct par la recherche de bactéries et/ou de leurs constituants ont connu des développements. Nonobstant leur importance, les techniques bactériologiques classiques ont des limites en matière de

diagnostic dans les pays de la ceinture africaine de la méningite. L'émergence récente au Burkina Faso et au Niger du *NmW135* (8, 9, 10, 11, 12), et le nombre de cas important dus à *Sp* ont rendu nécessaire le renforcement de la surveillance microbiologique depuis 2002 (13, 14).

## **1.2. ENONCE DU PROBLEME**

Les épidémies de méningites bactériennes sévissent de manière cyclique à intervalle plus ou moins régulier en Afrique Subsaharienne dans la région définie par la ceinture de la méningite de Lapeyssonie (15). Dans la ceinture de la méningite en Afrique, l'importance des méningites bactériennes aiguës endémiques n'est pas aussi bien établie que celle des épidémies sporadiques de méningite à méningocoque (2). Dans cette région, *Nm*, *Sp* et *Hi b* sont les principales espèces responsables des méningites bactériennes aiguës.

Les méningites à méningocoques restent l'une des premières causes d'épidémies en Afrique Subsaharienne (2, 4, 15, 16). Toutefois, il ya des variations de sérogroupe prédominants comme l'émergence du W135 en 2001-2002 au Burkina Faso et au Niger (11, 16), l'émergence du *Nm X* en 2006 au Niger (données CERMES/MS 2006).

Les méningites à pneumocoque et à *Hi b* ont manifestement un impact majeur sur la santé publique. Des études réalisées au Burkina Faso et au Niger de 1980 à 1990, et des études récentes ont permis de mettre en évidence l'importance de *Sp* et *Hi b* dans les épidémies (2, 17).

Les récentes études conduites dans la région de Bobo-Dioulasso en 2002-2003 et 2004-2005 (années non épidémiques) ont confirmé l'importance de *Sp* (14, 18). La souche de *Sp* représente 44% des méningites bactériennes (35% chez les enfants de moins de 5 ans et 51% chez les plus de 5 ans). Ces études ont permis aussi de mettre en évidence la saisonnalité de *Sp* avec 76% des cas confirmés en période sèche (décembre-avril). Le taux global de létalité associé à *Sp* est de 46%. Ce taux varie peu avec les classes d'âge des.

*Hi b*, endémique est la principale cause des méningites bactériennes chez les enfants de moins d'un an (2, 19). Il représente plus d'un tiers des cas de méningites bactériennes aiguës chez les moins de cinq ans. L'étude de 2002-2005 a montré que *Hi b*, l'une des

principales étiologies des méningites bactériennes, est associé à une létalité de l'ordre de 25% (17).

La surveillance microbiologique des méningites bactériennes, nécessaire à l'orientation des stratégies de vaccination et au développement de nouveaux vaccins exige des techniques rigoureuses de diagnostic, sensibles et spécifiques.

Les techniques d'analyse du LCR pour la confirmation étiologique des cas suspects de méningites bactériennes font appel à des méthodes bactériologiques conventionnelles. D'abord les prélèvements sont testés par agglutination de particules au latex pour la recherche d'antigènes solubles, ensuite ils sont mis en culture pour isolement du germe (20). La première technique permet l'identification précise du germe et du sérogroupe de méningocoque en cause. Mais son prix constitue un réel problème à son utilisation systématique dans les pays de la ceinture méningitique. Aussi la fragilité des germes (*N.m*, *Sp* et *Hi* b) et l'accessibilité limitée des laboratoires de bactériologie en Afrique ne permettent pas, en dehors des villes, la mise en culture systématique des LCR. Pour pallier ces difficultés de diagnostic et dans un souci d'analyser le maximum de LCR, un transfert de technologie PCR, technique de biologie moléculaire basée sur l'identification de l'ADN bactérien des germes (21), a été réalisé au Centre Muraz à Bobo-Dioulasso. Ce laboratoire qui est opérationnel depuis Juillet 2002 a fait ses preuves dans la surveillance étiologique longitudinale des germes responsables de méningites bactériennes (9, 14, 23).

Afin de connaître la fréquence, la distribution et la sensibilité aux antibiotiques des agents étiologiques isolés des LCR au cours des méningites, cette étude fait un récapitulatif de deux années d'analyses bactériologiques et moléculaires des LCR au laboratoire de bactériologie du Centre Muraz et au laboratoire mixte AMP/Centre MURAZ de Bobo, au Burkina Faso.

## 2. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

### 2.1. DEFINITION

La méningite est une inflammation des méninges, le plus souvent d'origine infectieuse. Elle se caractérise par l'inflammation de fines membranes de la cavité cérébrale et du canal médullaire dans lesquelles circule le liquide céphalorachidien.

La méningite est une urgence médicale qui nécessite un diagnostic bactériologique et un traitement précoce. Selon les germes en cause, elle n'a pas le même caractère de gravité. Dans 80% des cas les méningites sont d'origine virale. Ces méningites sont bénignes et se rétablissent le plus souvent de manière spontanée. Dans 20 à 25% des cas, les méningites sont d'origine bactérienne. Ces infections sont particulièrement graves et peuvent être fatales. Elles le sont surtout en l'absence des traitements antibiotiques précoce et adaptés. Dans moins de 5% des cas, les méningites sont causées par des bactéries non pyogènes, des parasites et par des processus néoplasiques.

Les méningites bactériennes aiguës demeurent des affections fréquentes et graves. Elles surviennent à tout âge avec une prédominance chez les adultes jeunes. Elles sont préoccupantes du fait de leur gravité spontanée, des décès et des séquelles qu'elles engendrent quand le diagnostic est fait tardivement et le traitement mal conduit. Selon le contexte de survenue, les méningites sont reparties en trois catégories :

- Les méningites primitives surviennent chez les sujets qui ont plus de 2 mois. Elles sont très souvent causées par *Nm*, *Sp* et *Hi b*.
- Les méningites néonatales surviennent chez les sujets de moins d'un mois. Elles sont surtout causées par les entérobactéries (*Escherichia coli*, *klebsiella*, *salmonella*, *serratia*, etc.), *Listeria monocytogenes*, streptocoque B et *staphylococcus aureus*.
- Les méningites suppurées (purulentes) secondaires qui résultent d'une otite, d'une sinusite, d'une infection orbitaire, d'un foyer infectieux à distance, d'un traumatisme crânien et /ou d'une intervention neurochirurgicale.

Les méningites bactériennes sévissent essentiellement sous deux formes :

- La forme endémo-sporadique qui survient partout dans le monde avec une étiologie variable. Elle est plus fréquente dans les zones tropicales.
- La forme épidémique dont l'étiologie principale est le méningocoque, sévit dans «la ceinture africaine de la méningite » de LAPEYSONNIE.

## **2.2. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES DE *Nm*, *Sp* et *Hi b*.**

### **2.2.1. *Neisseria meningitidis***

*Nm* est de la famille des *Neisseriaceae* et du genre *Neisseria*. Il a été découvert en 1887 par Weichselbaum qui le nomma d'abord *Diplokokkus intracellularis*. Son nom actuel *Neisseria meningitidis* a été proposé par Albrecht et Ghon puis Murray en 1929 (52)

Il est la cause de méningite purulente aiguë, de la méningite cérébrospinale (MCS) qui est habituellement épidémique dans la ceinture africaine de la méningite. Il est aussi responsable de bactériémie gravissime.

Il se distingue en 13 sérogroupes dont le plus fréquent en Afrique et au Burkina Faso est le sérogroupe A.

#### **2.2.1.1. Caractères morphologiques**

Les *Neisseria* se présentent sous l'aspect de coques à Gram négatif «réniformes» ou en «grains de café» avec une face plane groupés deux à deux en diplocoques. Ils sont très souvent encapsulés.

Les *Neisseria* observés à partir d'un frottis de LCR sont généralement intracellulaires (2 à 4, voire 8 diplocoques par leucocyte). Leur aspect morphologique est variable dans les cultures (24).

## **2.2.1.2. Caractères culturaux**

### **2.2.1.2.1. Conditions et exigences de culture**

Les méningocoques sont des bactéries aérobies strictes. Ces bactéries très exigeantes ne cultivent que sur des milieux enrichis en produits biologiques, plus rapidement (18 à 24 heures), entre 30°C et 38,5°C, avec une atmosphère humidifiée et enrichie à 10% de CO<sub>2</sub>, et même sans supplément. Il se cultive aussi sur gélose Muller Hinton en subculture.

Ces bactéries sont très sensibles aux variations de températures et de pH. Les milieux contenant les méningocoques doivent être constamment conservés à l'étuve bactériologique (20, 24).

### **2.2.1.2.2. Milieux et aspects des cultures**

Les observations sont faites après 24 à 48 heures de culture :

- Sur gélose chocolat (GC) ou gélose au sang cuit (GSC): on observe de petites colonies (1 à 2mm de diamètre) lisses, bombées, luisantes, non pigmentées et transparentes. Elles sont parfois muqueuses.
- Sur gélose au sang frais de mouton (GSF): on observe une culture sans halo d'hémolyse.
- Sur gélose à l'ascite (GA): on observe des colonies très petites, transparentes, bleutées à bord régulier.
- Sur gélose Muller Hinton (MH) en subculture: on observe de petites colonies arrondies, transparentes du type S, présentant un léger reflet gris bleuté.
- En bouillon ascite: on observe un trouble avec un dépôt floconneux dans le fond du tube et un voile très fin à la surface.



Figure 1: *Nm*, ensemencement en stries et aspect des colonies sur gélose au sang (OMS).

#### 2.2.1.3. Caractères biochimiques

Le test de l'oxydase de Kovacs permet la mise en évidence d'un cytochrome oxydase. Les méningocoques possèdent une activité catalase, mais ne possèdent pas de nitrate réductase. Les réactions d'acidification à partir des glucides en gélose cystine–trypticase (CTA) permettent de distinguer *Nm* des autres *Neisseria*. Ainsi *Nm* oxyde le glucose et le maltose, mais pas le lactose ni le saccharose. La recherche de l'ONPG doit être faite afin de différencier *Nm* (ONPG négatif) de *N. lactamica* (non pathogène) qui est ONPG positif (20, 24).



Glu (+) Mal (+) Lac(-) Sac (-)

Figure 2: Les réactions d'acidification à partir des glucides en CTA (OMS).

#### 2.2.1.4. Caractères antigéniques

La mise en évidence de ces caractères antigéniques permet de compléter le diagnostic bactériologique. Ainsi, les marqueurs du méningocoque sont principalement représentés

par les pili (facteurs d'adhérences aux cellules endothéliales/épithéliales), les polyosides capsulaires (spécifiques de sérogroupes), les protéines de la membrane externe (PorB spécifique de sérotypes et le PorA spécifiques de sous types), les immuno-spécificités des lipooligosaccharides (spécifiques des immunotypes) et les isoenzymes de la membrane interne (34).

Les antigènes capsulaires, polysaccharidiques sont les plus importants. Ils permettent de distinguer 13 sérogroupes de méningocoques: A, B, C, 29E, H, I, K, L, M, W135, X, Y, Z. Parmi ces sérogroupes, 3 sérogroupes (A, C, W135) ont été à l'origine de grandes épidémies en Afrique (3).

#### **2.2.1.5. Vitalité et conservation**

*Nm* est très sensible aux variations de température (surtout au froid), de pH et à la dessiccation. À la température ambiante, *Nm* est détruit en moins d'une heure. Il doit être conservé par lyophilisation ou congélation à -80°C.

#### **2.2.2. *Streptococcus pneumoniae***

*Sp* ou pneumocoque est de la famille des *Streptococcaceae* et du genre des *Streptococcus*. Il a été observé pour la première fois en 1881 par Pasteur dans la salive d'un jeune enfant mort de rage. Il fut par la suite décrit en 1886 par Fränkel et Weichselbaum. (27). Il est responsable des affections locorégionales (bronchites, otites, pneumonies...) et des affections à distance (méningites, péricardite, arthrites...). C'est un redoutable agent de méningites purulentes aiguës au Burkina Faso. Les infections pneumococciques peuvent être prévenues par la vaccination et l'antibiothérapie efficace permet de traiter les infections établies.

##### **2.2.2.1. Caractères morphologiques**

Ils dépendent du milieu dans lequel les pneumocoques seront étudiés :

Dans les produits pathologiques, les pneumocoques se présentent sous la forme d'un diplocoque à Gram positif lancéolé en flamme de bougie, dont les deux cocci sont opposés par leur pointe, donnant à l'ensemble la forme d'un huit. Ils sont groupés en courtes chainettes de 4 à 6 éléments.

En culture, ils se présentent en cocci ou en chainettes et sans leur capsule.

### 2.2.2.2. Caractères culturaux

#### 2.2.2.2.1. Conditions et exigences de cultures

*Sp* est un germe aéro-anaérobiose facultatif qui cultive entre 35°-37°C (accepte les variations de température entre 24 à 42°C), en milieux enrichis (sang, sérum, glucose, ascite...), en anaérobiose et dans une atmosphère enrichie 5 à 10% de CO<sub>2</sub>. Il ne cultive pas sur milieux ordinaires (24).

Les milieux peuvent être rendus sélectifs par ajout d'acide nalidixique ou de gentamicine, si le prélèvement est polymicrobien.

#### 2.2.2.2.2. Milieux et aspects des cultures

- En bouillon enrichi (ascite ou sérum) et après 24 heures, on observe un trouble léger avec un dépôt discret. Le trouble a tendance à s'éclaircir par autolyse des pneumocoques.
- Sur gélose enrichie, on observe après 24 heures des colonies très petites, mieux visibles à la loupe, lisses, bombées, à bord régulier, transparentes, en gouttes de rosée. Les colonies sont entourées par une zone verdâtre d'hémolyse alpha sur gélose au sang et présentent une hémolyse en jaune d'œuf sur gélose chocolat et sur gélose au sang cuit.

Le sérotype 3 donne des colonies muqueuses comme les *Klebsiella*.



Figure 3: *Sp*, ensemencement en stries et aspect des colonies sur gélose au sang (OMS,).

#### **2.2.2.3. Caractères biochimiques**

Comme tous les streptocoques, le pneumocoque est un germe à métabolisme anaérobie mais aérobie tolérant. Il fermente le glucose, le lévulose, le maltose et le saccharose. Il ne possède pas de catalase, ni de cytochrome oxydase. De plus, il est nitrate(-), gélatine(-), acidifie et coagule le lait tournsolé.

L'adjonction de tensio-actifs (bile, sels biliaires) à une culture de pneumocoque en bouillon entraîne la lyse des capsules du pneumocoque et l'éclaircissement immédiat du bouillon (phénomène de NEUFELD). A l'inverse des autres streptocoques, le pneumocoque est sensible à un sel de cuivre, l'éthyl-hydrocupréine (optochine). Cette propriété est utilisée pour l'identification du pneumocoque au laboratoire (20)

#### **2.2.2.4. Caractères antigéniques**

On distingue chez le pneumocoque deux types d'antigènes : des antigènes capsulaires et des antigènes somatiques.

- Les antigènes capsulaires : Le pneumocoque est caractérisé par la présence d'une capsule de nature polysaccharidique complexe avec des aminoacides et de la choline. En contact avec un anticorps spécifique, le polysaccharide forme un complexe antigène-anticorps qui se traduit, à l'examen microscopique, par le phénomène du gonflement de la capsule. Ce phénomène permet le typage sérologique des pneumocoques et a un grand intérêt épidémiologique. Ces antigènes sont spécifiques de types et permettent de classer les pneumocoques en plus de 90 types (27).
- Les antigènes somatiques : Ils sont composés d'un polyoside C (spécifique de groupes), de protéines M (spécifiques de types) et de protéines R, masquée par la capsule.

Les streptocoques produisent des toxines qui sont pour la plupart antigéniques. Ce sont essentiellement :

- La pneumolysine liée au corps bactérien est libérée lors de la lyse bactérienne.
- La neuraminidase intervient dans l'invasion par la bactérie.
- L'hyaluronidase.

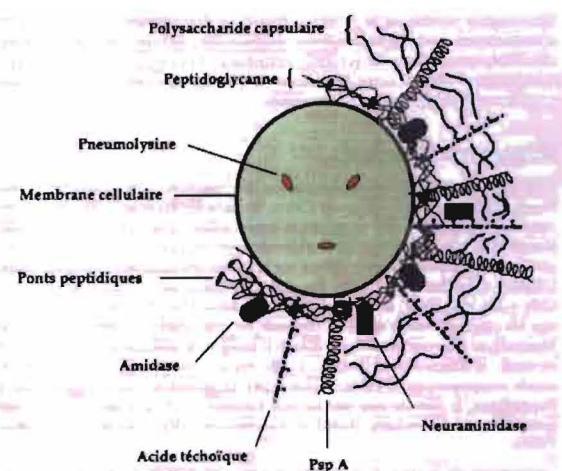


Figure 4: Représentation schématique de la structure et de la localisation des composants de surface d'un pneumocoque encapsulé (d'après Gray, 1996).

*PspA* = *Pneumococcal surface protein A*.

#### 2.2.2.5. Vitalité et conservation

Les pneumocoques sont sensibles à l'acidification des milieux de culture et aux températures très élevées. Ils peuvent être conservés par congélation à -80°C ou par lyophilisation (4°C ou à -20°C).

#### 2.2.3. *Haemophilus influenzae*.

*Hi* est de la famille des *Pasteurellaceae* du genre des *Haemophilus*. Il a été découvert par Pfeiffer dans les expectorations d'un grippé. La forme capsulée de type b, la plus

pathogène, pourrait être parasite strict de l'espèce humaine et transmise par voie respiratoire. *Hi* b est responsable de la grande majorité des pathologies invasives chez l'enfant (méningites, épiglottites, arthrites, septicémies) (24).

Les différents antigènes capsulaires de *Hi* furent identifiés en 1930 par Margaret Pittman et le premier vaccin anti-*Hi* b fut élaboré vers les années 1980 (27).

### 2.2.3.1. Caractères morphologiques

Dans les produits pathologiques, *Hi* se présente sous la forme de petits bacilles à Gram négatif, d'aspect coccobacillaire polymorphe, groupés en amas, en courtes chainettes. Les souches virulentes sont capsulées (24).

### 2.2.3.2. Caractères culturaux

*Hi* exige pour sa croissance en aérobiose, la présence d'hémine (facteur de croissance X) et du NAD (facteur de croissance V) dans la gélose au sang cuit ou dans la gélose ordinaire additionnée d'extraits globulaires. Certaines souches ne poussent qu'en atmosphère enrichie de 10% de CO<sub>2</sub>. Les colonies apparaissent grises ou avec une légère teinte jaunâtre en 24-48 heures. Les souches capsulées (*Hi* b) sont muqueuses et de taille plus grande (20, 34).

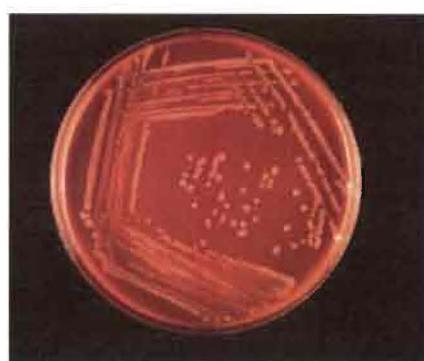


Figure 5: *H. influenzae*, ensemencement en stries et aspect des colonies sur gélose chocolat (OMS).

### **2.2.3.3. Caractères biochimiques**

La totalité des espèces d'*Hi* ont la capacité de fermenter le glucose avec ou sans production de H<sub>2</sub>S. L'utilisation de la xylose et du ribose est un bon facteur de différenciation des caractères de chaque souche. *Hi* possède une nitrate réductase, un cytochrome oxydase, une catalase et une activité phosphatase alcaline. Trois caractères biochimiques l'ODC, l'uréase et l'indole ont permis de scinder les espèces de *Hi* en six biotypes (I à VI). Le biotype I est presque le seul responsable des méningites et des infections généralisées.

### **2.2.3.4. Caractères antigéniques**

Lorsque *Hi* est capsulé, la capsule est de nature polysaccharidique. Ainsi, en fonction de la structure antigénique, Pittman a décrit six types sérologiques: a, b, c, d, e, f (24). La spécificité de type dépend de la composition en polysaccharide de la capsule. Le polysaccharide de type b constitué de PRP, est le seul à avoir une structure composée de deux ribose . Le PRP, facteur de virulence du type b, est l'antigène essentiel à la mise au point du vaccin anti-*Hi* b (27).

### **2.2.3.5. Vitalité et conservation**

Tout comme les méningocoques et les streptocoques, les *Hi* sont des bactéries fragiles. Ils peuvent être conservés par congélation ou par lyophilisation.

## **2.3. EPIDEMIOLOGIE DES MENINGITES BACTERIENNES AIGUËS**

Les méningites bactériennes, la plus fréquente des infections suppurées intracrâniennes, représentent un important problème de santé publique, en particulier chez les enfants. Les agents étiologiques des méningites bactériennes varient en fonction de l'âge du sujet et l'état d'immunité du sujet. Passée la période périnatale, trois agents bactériens, dont la transmission se fait d'homme à homme par les sécrétions respiratoires sont les principales causes de la majorité des méningites bactériennes (*Nm*, *Sp* et *Hi* b).

Dans le monde, l'apparition de foyers infectieux avec le risque d'épidémies reste un problème d'actualité. Aussi, malgré les progrès thérapeutiques, la létalité ainsi que les

séquelles demeurent éléver. L'OMS estime à un million le nombre de cas de méningites survenant dans le monde avec 200000 cas fatals, un taux de létalité variant classiquement entre 3% à 9% dans les pays développés et 37% à 60% dans les pays en voies de développement. Ce taux est fonction de l'âge du patient et de la bactérie en cause. Des séquelles intégrant surdité, retard mental et autres séquelles neurologiques touchent jusqu'à 54% des survivants (20).

La survenue des méningites bactériennes varie considérablement d'un pays à l'autre, selon le développement du pays, l'âge des patients, la faible pluviométrie, et de nombreux autres facteurs (15, 25). Des épidémies de méningites dues aux méningocoques surviennent partout dans le monde, mais c'est l'Afrique subsaharienne qui est la plus touchée. Dans cette zone les épidémies à méningocoques sévissent de façon endémique saisonnière, avec de grandes épidémies périodiques. Pendant ces périodes d'épidémies, les enfants et les jeunes adultes sont généralement les plus touchés (2, 6, 26,).

Treize sérogroupes de méningocoques ont été identifiés, mais trois sérogroupes majeurs A, B et C sont la cause de plus de 90% de cas de méningites cérébro-spinales dans le monde (20, 27). Habituellement, leur pouvoir pathogène ainsi que leur répartition géographique sont différents. Le séro groupe A, primordial en Afrique, en particulier dans la ceinture africaine de la méningite, est plus épidémiogène que le séro groupe C. Ce dernier est l'agent causal de la majorité des méningites à méningocoques en Amérique. Le séro groupe B est dominant en Europe (27).

Cependant en 2000, la souche *Nm* W135 a été responsable d'épidémie en Arabie Saoudite. Elle a émergé ensuite dans la ceinture de la méningite, avec une grande épidémie au Burkina Faso en 2002 (9, 11, 16). La souche *Nm* X a aussi été incriminée dans les épidémies survenues au Soudan, au Kenya et en Ouganda (1). En 2006, il a été l'agent causal prédominant lors des épidémies au Niger, ainsi qu'au Kenya et en Ouganda (28).

*Sp* et *Hi* b peuvent également être responsables de méningites. Ainsi les méningites des âges extrêmes de la vie (nourrisson, jeune enfant et la personne âgée) sont habituellement dues à *Sp*. Le pneumocoque, endémique dans les pays de la ceinture africaine de la méningite, est responsable d'une fraction importante des cas de méningites survenant en

dehors des épidémies ; mais il peut aussi être la cause d'épidémies (3). En effet entre 2000 et 2003, le Ghana a enregistré une très forte incidence de méningites dues aux pneumocoques dans le Nord du pays. Ces épidémies ont présenté les mêmes caractéristiques épidémiologiques que les épidémies de méningites dues aux méningocoques. Le taux de décès par les épidémies de méningites à pneumocoque est proche de 45% (3, 29).

*Hi b* est l'un des principaux agents responsables des méningites bactériennes de l'enfant (surtout chez les moins de 5ans) dans les pays où la vaccination anti-*Hi b* n'a pas été généralisée (23, 57). Depuis la vaccination contre *Hi b*, l'épidémiologie des méningites causées par ce germe a considérablement diminué (27).

Les vaccins ont un rôle important dans la lutte contre les méningites bactériennes. La disponibilité des vaccins A/C, A/C/W135/Y, pneumococciques et *Hi b* sur le marché a permis de baisser les données épidémiologiques. (27, 31, 32)

#### **2.4. PHYSIOPATHOLOGIE DES MENINGITES BACTERIENNES.**

La survenue d'une méningite suppose que l'agent pathogène soit capable de franchir de façon sélective la barrière hémato-méningée, d'envahir l'espace sous-arachnoïdien et d'y produire une inflammation. Les bactéries le plus souvent mise en cause dans la plupart des méningites bactériennes gagnent les méninges, à partir du rhino-pharynx par voie (34):

- hématogène sous forme d'une simple bactériémie ou d'une septicémie ;
- lymphatique et péri-nerveuse trans-éthmoïdale (lame criblée).

Quatre étapes conditionnent le développement d'une méningite bactérienne et déterminent les stratégies thérapeutiques et prophylactiques:

- porte d'entrée des bactéries : les agents pathogènes responsables de la plupart des méningites purulentes sont des saprophytes du rhinopharynx ;
- phase d'implantation muqueuse : les bactéries adhèrent à des récepteurs de l'épithélium rhinopharyngé et colonisent cette surface. Ces facteurs aident au passage des bactéries dans le sang circulant ;

- phase bactériémique: les bactéries adhèrent aux cellules épithéliales, franchissent la barrière muqueuse et passent dans le sang. Elles se disséminent, prolifèrent et s'autolysent. Ainsi elles libèrent leurs médiateurs inflammatoires, toxiques et activent le recrutement des polynucléaires (production d'interleukine 8, secondaire à l'activation de la production d'interleukine 1 dans les cellules endothéliales). La bactériémie peut passer inaperçue ou provoquer le *purpura fulminans* et des formes disséminées (articulation, poumons, peau ...) ;
- phase méningée: les bactéries franchissent la barrière hémato-méningée par endocytose et se multiplient dans les méninges.

Les symptômes cliniques dépendent de la sécrétion par les cellules hématopoïétiques, de cytokines (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , Inter Leukine 1) dans le LCR en réponse à l'infection bactérienne. Il existe un lien direct entre la concentration sérique du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF $\alpha$ ) et la mortalité.

## **2.5. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE**

Seules les approches de diagnostic direct par recherche de bactéries et/ou de leurs constituants ont connu des développements. Le diagnostic indirect par la mise en évidence d'anticorps (sérodiagnostic) est peu performant et est peu compatible avec l'urgence des méningites bactériennes.

### **2.5.1. Le prélèvement**

L'examen cytobactériologique du LCR est l'urgence bactériologique face à un syndrome méningé. Le LCR est obtenue par ponction lombaire, réalisée avec une asepsie rigoureuse entre les apophyses L4-L5 ou L5-S1 (25).

L'analyse microbiologique du LCR et du sang restent les premiers examens de confirmation de méningites réalisée avec asepsie. En plus du LCR et du sang, on peut utiliser les prélèvements rhinopharyngé, urétral... pour diagnostiquer les méningites.

La quantité moyenne de LCR nécessaire pour effectuer la majorité des analyses indispensables est d'au moins 3 ml. Le prélèvement est recueilli dans trois tubes stériles, destinés à l'examen biochimique, microbiologique et la cytologique (20). Le transport du LCR vers le laboratoire se fait sans délai (moins d'une heure) à cause de la lyse rapide des polynucléaires (jusqu'à 50% en 2 heures). Le LCR doit être protégé du froid, de la dessiccation et des fortes températures à cause de la fragilité de certaines bactéries, en particulier les méningocoques. Si l'examen n'est pas immédiat, le LCR doit être gardé à 37°C dans une étuve bactériologique. Aussi, si l'acheminement du LCR au laboratoire n'est pas possible le jour même du prélèvement, le LCR sera inoculé aseptiquement dans un milieu de transport, le T-I incubé à 35°C. C'est un milieu diphasique qui peut servir de milieu de culture (primo culture), de conservation et de transport (20)

### **2.5.2.. Les examens directs**

#### **2.5.2.1. Aspect macroscopique.**

Le LCR normal ou sain, examiné à l'œil nu a un aspect de «l'eau de roche» ; mais en cas de pathologie, il se présente sous différents aspects (33):

- Rouge, hémorragique, xanthochromique en cas d'hémorragie ou de traumatisme,
- Jaune-citrin en cas d'ictère,
- Trouble, purulent, «eau de riz».

Un LCR clair ou «eau de roche» n'exclut pas le diagnostic de méningites (cas des méningites décapitées ou en phase de début).

#### **2.5.2.2. Analyses cytologiques quantitatives et qualitatives.**

Le LCR est utilisé directement, après agitation douce, pour la numération des éléments. Cette numération est effectuée à la cellule de comptage telle la cellule de Nageotte ou de Malassez.

L'établissement de la formule leucocytaire (réalisée à plus de 20 éléments/mm<sup>3</sup>) est effectué après centrifugation ou cytocentrifugation (environ 800 trs/min, pendant 10

minutes) et après coloration de May-Grunwald-Giemsa (MGG) ou à l'éosine bleu de méthylène (33).

La coloration de Gram, étape essentielle et rapide, est réalisée sur une préparation obtenue par centrifugation ou par cytocentrifugation . Ses performances dépendent de la densité des bactéries, elle-même variable selon l'espèce en cause, la durée d'évolution de la méningite, l'existence d'une antibiothérapie préalable. L'examen après la coloration de Gram permet d'observer les caractères morphologiques de la bactérie responsable de la maladie (33).

L'examen microscopique à l'état frais en présence d'encre de chine permet de mettre en évidence des micro-organismes capsulés (pneumocoque, cryptocoque).

#### **2.5.3. Recherche d'antigènes bactériens solubles**

La recherche d'antigènes solubles permet la mise en évidence des polysaccharides capsulaires de différentes bactéries libérées dans les liquides biologiques au cours des infections. C'est un test de diagnostic très rapide et fiable, malgré l'existence de communautés antigéniques. Cette recherche d'antigènes polyosidiques spécifiques du germe est basée sur des tests d'agglutination de particules de latex sensibilisées. Cette technique est la plus utilisée dans la détection des antigènes solubles dans le diagnostic des infections à *Nm* (A, B, C, Y, W135), *Sp*, *Hi b*, Streptocoque B et *E coli* K1.

Une technique immunochromatographique, reposant sur la mise en évidence de polysaccharide C des pneumocoques a été développée et paraît plus sensible (Binax NOW *Streptococcus pneumoniae*).

Au Burkina Faso, la technique utilisée est la coagglutination par particules de latex (Kit Pastorex) sensibilisées aux *Nm* A, B, C, W135/Y, *Hi b*, *Sp*, Streptocoque B, *E coli* K1.

#### **2.5.4. Examen chimique du LCR**

Cet examen direct est basé sur la mesure du taux de glucose (glycorachie), de protéine (proteinorachie) et de chlorure (chlorurorachie) dans le LCR. Les valeurs de référence de ces différents éléments sont respectivement de 2,2-3 mmol/l, 0,15-0,5 g/l et 120 mmol/l.

La glycorachie doit toujours être interprétée en fonction de la glycémie. Ces valeurs sont toujours perturbées face à un syndrome méningé, en particulier la glycorachie et la proteinorachie. Ainsi, en cas de méningites purulentes, on assiste à une baisse du taux de glucose dans 70% des cas et à une augmentation du taux de protéine (25). La chlorurorachie est en général normale et a très peu d'intérêt.

## 2.5.5. Mise en culture-identification et antibiogramme

### 2.5.5.1. Isolement-identification de l'espèce

Le LCR estensemencé sur des milieux adaptés permettant la croissance des bactéries exigeantes responsables de méningites purulentes. Le choix des milieux est fonction des caractères morphologiques de germe suspecté à l'examen de Gram :

- la gélose chocolat (GC) ou la gélose au sang cuit (GSC), supplémentée en facteurs de croissance, incubée à 37°C sous une atmosphère de 5 à 10% de CO<sub>2</sub> ;
- la gélose au sang frais, incubée à 37°C sous une atmosphère de 5 à 10% de CO<sub>2</sub>.

Ces milieux sont observés quotidiennement et incubés 48 heures au maximum. L'observation de l'aspect des colonies, l'examen du Gram, la réalisation des tests d'oxydase et de la catalase permettent d'orienter le diagnostic. Ainsi, l'isolement et l'identification complète du germe se fera à partir des caractères culturaux, biochimiques et/ou antigéniques.

Une hémoculture peut être utilisée pour identifier le germe dans des contextes cliniques particuliers (purpura, septicémie...) et souvent pour des germes peu fréquents comme, *Streptococcus agalactiae* (streptocoque du groupe B), *Staphylococcus aureus* et les entérobactéries. Les flacons d'hémocultures sontensemencés directement avec le sang et incubés à 35°C-37°C. Les flacons sont examinés après 14-17 heures d'incubation, puis gardés pendant 10 jours. Un trouble ou une hémolyse peuvent être les témoins d'un développement et le repiquage sur des milieux appropriés doit être immédiat pour l'obtention de souches pures (20).

### **2.5.5.2. Antibiogramme**

L'isolement en culture permet non seulement l'identification de l'agent étiologique mais aussi l'étude de sa sensibilité aux antibiotiques à partir de souches pures isolées. Il est indispensable de tester la sensibilité aux antimicrobiens des différents germes incriminés dans les méningites bactériennes. Il existe des méthodes par la dilution aux antibiotiques et la méthode de diffusion en gélose à partir des disques d'antibiotiques. Cette dernière, la plus utilisée est basée sur l'utilisation des disques de papiers buvards imprégnés des différents antibiotiques à tester. Une gélose MH estensemencée par écouvillonnage ou par inondation à partir d'une suspension préalablement préparée selon les recommandations en vigueur. Les disques sont ensuite déposés à la surface de la gélose. Les boîtes d'antibiogramme sont gardées 15 à 30 minutes à température ambiante avant de les incuber dans l'étuve bactériologique. Après 18-24 heures d'incubation à 35°C-37°C et à des conditions spécifiques au germe, chaque antibiotique diffuse dans la gélose déterminant ainsi des zones d'inhibition. La mesure du diamètre des zones d'inhibition permet de déterminer les antibiotiques les plus actifs : sensibilité importante, intermédiaire ou résistance du germe à l'antibiotique. Cet antibiogramme permet le choix des antibiotiques pour lutter contre les germes en cause des infections de méningites.

### **2.5.6. La réaction en chaîne par la polymérase**

La PCR (Polymerase Chain Reaction = réaction en chaîne par la polymérase) est une technique de la biologie moléculaire. Elle fut inventée par Kary MULLIS 1983 et brevetée en 1985 (50). C'est une technique d'amplification génique qui est directement réalisée sur le LCR, voire sur le sérum ou sur des lésions purpuriques. Elle permet la recherche de gènes spécifiques de nombreux agents pathogènes dont des bactéries (*Nm*, *Sp*, *Hi*, etc.) des virus, etc. Cette technique spécifique et rapide est utile lorsque la culture, l'examen direct et la recherche des antigènes solubles sont négatifs, ou en cas de méningites décapitées.

Le principe de la PCR repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase, il s'agit d'une réPLICATION *in vitro* de séquences spécifiques d'ADN. Cette technique permet de générer à des dizaines de milliards d'exemplaires un fragment d'ADN particulier (la séquence d'intérêt, ADN d'intérêt ou ADN cible) à partir d'un extrait d'ADN (ADN matriciel). La

PCR est donc une technique de purification ou de clonage. Elle est réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend l'extrait d'ADN, la Taq polymérase, les amorces et les quatre dNTP en excès dans une solution tampon. Les tubes contenant le mélange réactionnel sont soumis à des cycles de températures réitérés plusieurs dizaines de fois dans le bloc chauffant d'un thermocycleur (appareil comportant une enceinte dans laquelle la température peut varier très rapidement et précisément, de 0 à 100°C par effet Peltier). Le thermocycleur permet la programmation de la durée et de la succession des cycles de palier de température. Chaque cycle comprend trois périodes de quelques dizaines de seconde (50):

- la dénaturation de l'ADN matriciel : à 94°C ;
- l'hybridation des amorces : 40-70°C ;
- l'elongation : à 72°C ; la Taq polymérase se lie aux ADN monocaténaires amorcés et catalyse la réPLICATION en utilisant les dNTP présents dans le mélange réactionnel.

Les applications de la PCR sont multiples. Elle représente aujourd'hui un fabuleux outil de diagnostic. Elle est performante et présente plusieurs avantages dans l'identification d'agents étiologiques des méningites bactériennes par rapport à la culture. Selon la spécificité des amorces utilisées, c'est une technique qui peut produire des résultats très fiables et rapides à partir d'échantillons biologiques infimes dans lesquels la présence du pathogène n'est pas toujours décelable par les autres techniques. L'utilisation de cette technique contribue à l'organisation des ripostes vaccinales ciblées (13, 14).

Cependant, dans la prise en charge des méningites bactériennes aigues, l'une des principales limites de la PCR reste encore son incapacité à fournir des profils étendus de sensibilité des souches aux antibiotiques.

## **2.6. PREVENTION ET TRAITEMENT**

### **2.6.1. La prévention**

#### **2.6.1.1. La vaccination**

Les structures polyosidiques de la surface de nombreux agents pathogènes constituent des facteurs majeurs de virulence et induisent une réponse immunitaire qui en fait des molécules candidates à l'élaboration de vaccins.

Dans les cas de méningites à méningocoques, des vaccins polysaccharidiques contre les sérotypes A, C, Y et W135 sous formes monovalentes (A, C), bivalentes (A+C) et tétravalentes (A+C+Y+W135) sont disponibles (27). Mais il n'existe pas encore de vaccin efficace contre le sérototype B. La réponse immunitaire est fonction de l'âge (adulte >> enfant), du sérogroupe (A>C) et du type de vaccin (conjugué > polysaccharidique).

Dans les cas de méningites purulentes à *Hi* b, la vaccination anti-*Hi* b à l'âge de 3 à 5 ans a permis de diminuer la fréquence de ce germe dans de nombreux pays où elle a été utilisée, notamment dans les pays développés (27).

Dans les cas de méningites à pneumocoques, des vaccins polysaccharidiques (à 23 valences) et conjugués (polysaccharide + protéine immunogène) sont utilisés chez les sujets à risque. Les premiers assurent une couverture des infections pneumococciques avec un taux de protection estimé à 80% mais l'immunogénicité est faible avant l'âge de 2 ans, après 80 ans, et chez les sujets immunodéprimés. Ils sont administrés par voie sous cutanée ou intramusculaire une seule fois avec un rappel de 5 ans. Ce vaccin est relativement bien toléré et a fait ces preuves dans certains pays (27, 31). Le second à une immunogénicité dès 2 mois avec une efficacité d'environ 94% pour les infections graves invasives. Il est administré en intramusculaire (27).

#### **2.6.1.2. La chimioprophylaxie**

Elle s'adresse aux individus susceptibles de développer une méningite grave à méningocoque. Elle a pour but de prévenir les cas secondaires en éliminant le portage nasopharyngé, par utilisation des antibiotiques systématiques dans les 2 jours qui suivent

le diagnostic. L'antibiotique de choix est la rifampicine, active sur les méningocoques et les *Hi*. La ciprofloxacine et la ceftriaxone sont des alternatives efficaces.

La chimioprophylaxie, bien qu'active dans la prévention, se heurte à plusieurs limitations dans l'évolution d'une épidémie. Elle n'est pas une mesure efficace pour enrayer une épidémie.

#### **2.6.1.3. Règles d'hygiène**

Il faut éviter les irritations, les desséchements du rhinopharynx.

#### **2.6.2. Traitement**

Le traitement antibiotique nécessaire doit être combiné au traitement symptomatique. Il permet de stériliser, le plus rapidement possible, le foyer infectieux et réduit le risque de mortalité et séquelles neurologiques et sensorielles. Il doit être bactéricide et instauré le plus rapidement possible, après la ponction lombaire et réadapté en fonction des résultats de l'examen bactériologique du LCR (antibiogramme). Le choix de l'antibiotique est fonction du germe et de sa sensibilité, la diffusion de l'antibiotique au niveau du site infectieux, l'état du malade, la disponibilité et le cout de l'antibiotique. Il s'effectue par voie intraveineuse et est poursuivi habituellement pendant 10 jours. L'antibiothérapie est basée sur l'utilisation des antibiotiques suivant :

- les bétalactamines : Pénicilline G, Aminopénicillines (amoxicilline, ampicilline), céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (ceftriaxone, cefotaxime).
- le chloramphénicol.

Le traitement symptomatique est basé sur la surveillance de l'équilibre hydro-électrolytique et l'assurance d'un apport liquidiens. Les produits les plus fréquemment utilisés sont les anticonvulsivants (diazépam), les antipyrrétiques (acide salicylique) et les corticoïdes (hydrocortisones, dexaméthasones,...). Ils sont administrés par voie appropriée (sonde nasogastrique) à cause de l'impossibilité de la voie intraveineuse.

### **2.6.3. La surveillance microbiologique**

La surveillance épidémiologique a pour but principal d'alerter les autorités sanitaires nationales de la survenue d'une épidémie. Elle leur fournit les informations nécessaires afin qu'ils prennent des mesures d'urgences. A plus long terme, les investigations épidémiques devraient permettre d'anticiper les risques d'épidémies et de prévoir leur diffusion. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) préconise une stratégie basée sur :

- Une surveillance des principales souches associées aux méningites épidémiques et endémiques associant une surveillance longitudinale (sur toute la durée de l'épidémie) et une surveillance transversale.
- Une surveillance de la variabilité de la sensibilité des germes vis-à-vis des antibiotiques.

**DEUXIEME PARTIE :**  
**NOTRE ETUDE**

### **3. OBJECTIFS DE L'ETUDE**

#### ***3.1. OBJECTIF GENERAL***

Etudier les profils bactériologiques et moléculaires des méningites bactériennes aigues de 2007 à 2008 dans la région sanitaire des Hauts Bassins.

#### ***3.2. OBJECTIFS SPECIFIQUES***

- Déterminer la fréquence des espèces bactériennes identifiées par la bactériologie,
- Déterminer la fréquence des espèces bactériennes identifiées par la PCR,
- Etudier la répartition des différentes espèces bactériennes par tranche d'âge,
- Etudier la répartition des différentes espèces bactériennes par districts sanitaires,
- Comparer la sensibilité des différentes techniques de diagnostic biologique,
- Etudier la sensibilité aux antibiotiques des principales espèces bactériennes identifiées.

## **4. MATERIEL ET MÉTHODES**

### **4.1. MATERIEL**

#### **4.1.1. Site de l'étude**

Notre étude s'est effectuée à Bobo-Dioulasso, chef lieu de la région des Hauts Bassins. La ville de Bobo-Dioulasso, deuxième grande agglomération et capitale économique du Burkina Faso compte à elle seule près de 53% de la population de la région soit environ 856962 habitants. La région sanitaire des Hauts Bassins est subdivisée en sept districts que sont les districts sanitaires de Do, de Dafra, de Léna, de Karangasso Vigué, de Dandé, de Houndé et celui d'Orodara. Chaque district renferme un certain nombre de formations sanitaires. Notre étude a concerné les sept districts de la région. Le matériel biologique (LCR) a été analysé au laboratoire de bactériologie du Centre MURAZ, et au laboratoire mixte de PCR Centre MURAZ/AMP.

#### **4.1.2. Type et période d'étude**

Il s'agit d'une étude longitudinale, rétrospective de surveillance microbiologique des méningites bactériennes aigues dans la région sanitaire des Hauts Bassins. Elle s'est étalée sur une période de deux années, allant du 1<sup>er</sup> janvier 2007 au 31 décembre 2008.

#### **4.1.3. Type d'échantillonnage**

Tous les matériaux biologiques provenant des districts sanitaires inclus dans l'étude et analysés au laboratoire de bactériologie du Centre MURAZ, et au laboratoire mixte de PCR Centre MURAZ/AMP ont été pris en compte.

#### **4.1.4. Critères de définition des cas**

##### **4.1.4.1. Critères d'inclusion de cas suspects de méningites bactériennes**

Tous les LCR provenant des districts d'étude et analysés au laboratoire de bactériologie du Centre MURAZ et au laboratoire mixte de PCR Centre MURAZ/AMP.

#### **4.1.4.2. Critère de laboratoire pour le diagnostic biologique**

Un cas de méningites bactériennes a été défini par la présence d'au moins un des critères suivants:

- Présence dans le LCR d'antigènes spécifiques de *Nm*, *Sp* et de *Hi b*, par agglutination au latex;
- Présence à l'examen direct de bactéries à Gram positif (DGP) et de bactéries à Gram négatifs (DGN et BGN);
- Isolement et identification à partir du LCR de *Nm*, *Sp* et de *Hi b*;
- Détection dans le LCR d'ADN spécifiques de *Nm*, *Sp* et de *Hi b*;
- La mise en évidence dans le LCR d'un nombre de leucocytes > 100 éléments/ ml de LCR.

#### **4.1.5. Collecte des données**

Les registres de laboratoires du CM et de l'AMP ont été la source des données de cette étude. Nous avons disposé pour chacun des spécimens de données sur les caractéristiques démographiques des patients et l'analyse du LCR.

#### **4.1.6. Variables de l'étude**

L'âge, le district sanitaire de provenance, le sexe, l'aspect macroscopique du LCR, les résultats de la coloration de Gram, la recherche d'antigène soluble dans le LCR, la culture, la PCR et la sensibilité des germes isolés aux antibiotiques.

### **4.2. METHODES**

#### **4.2.1. Traitement des spécimens de LCR aux laboratoires**

Les échantillons de LCR ont été recueillis dans deux tubes qui se distinguaient par la couleur de leur bouchon. Cette différentiation des couleurs a permis de les soumettre à deux types de diagnostics :

- Tubes à bouchon rouge pour la bactériologie ;

- Tubes à bouchon vert pour la PCR ;

En général, si un seul tube parvenait au laboratoire, les analyses bactériologiques (coloration de Gram, latex, cytologie et éventuellement la culture) ont été priorisées. Si le volume de LCR restant était suffisant, un aliquote était constitué et transmis au laboratoire de PCR. Dans la majorité des cas, le spécimen réceptionné était accompagné d'un minimum de renseignements cliniques essentiels : âge et sexe du malade, la présomption diagnostique, les traitements antibiotiques antérieurs reçus par le malade, etc.

#### **4.2.2. Analyses bactériologiques**

##### **4.2.2.1. Examen macroscopique**

Le LCR réceptionné au laboratoire de bactériologie était soumis à une observation macroscopique indiquant son aspect (clair, trouble, citrin, purulent, hématique, xanthochromatique, louche). Ces résultats ont été consignés sur la fiche accompagnant le spécimen et dans le registre par le technicien en charge de la réception.

##### **4.2.2.2. Examen cytologique**

Le LCR réceptionné était systématiquement soumis à la cytologie et à un examen microscopique de frottis.

- La numération leucocytaire a été effectuée directement, après agitation douce du LCR total, à la cellule de comptage de Nageotte ou de Malassez au microscope à l'objectif  $\times 40$ . Les hématies ont été aussi dénombrées. Les comptages se sont fait en éléments cellulaires par  $\text{mm}^3$  de LCR.
- La formule leucocytaire a été réalisée (si le nombre d'éléments cellulaires était  $> 20$  éléments/  $\text{mm}^3$ ), après centrifugation (3000 tours/min pendant 5 minutes) du LCR dans un tube conique stérile ; et coloration de MGG (annexe I) ou éosine-bleu de méthylène. Le pourcentage de polynucléaires et de lymphocytes a été évalué par observation du frottis au microscope à l'objectif  $\times 100$ , en immersion.
- La coloration de Gram a été réalisée sur le culot de centrifugation du LCR, lorsque le LCR n'était pas franchement purulent. Un frottis a été réalisé sur une lame, puis

coloré par le Gram (annexe II). Après coloration, le frottis a été examiné au microscope à l'objectif  $\times 100$ , en immersion. Ainsi, en cas de présomption de méningites bactériennes, les bactéries en cause (*Nm*, *Sp*, *Hi* etc.) ont été identifiées en fonction de leur caractère morphologique microscopique (DGN, BGN et DGP).

#### **4.2.2.3. Recherche d'antigènes solubles bactériens**

La recherche d'antigènes solubles des bactéries a été basée sur la technique d'agglutination de particules de latex sensibilisées (Kit Pastorex Méningites ; Bio-Rad) spécifiques de *Nm* des sérogroupes A, B, C, Y/W135, de *Hi* b, de *Sp*, de Streptocoque de groupe B et *E.coli* K1.

Les tests d'agglutination ont été effectués conformément aux recommandations du fabricant (annexe III).

Comme la coloration de Gram, si ce test était positif, les résultats étaient transmis immédiatement aux cliniciens ou à son mandataire. Par conséquent, un résultat positif avec l'un des deux tests ou les deux a été la preuve d'une infection.

#### **4.2.2.4. Mise en culture et identification**

Dans tous les cas la mise en culture a été systématique et le choix des milieux a été basé sur les résultats de la coloration de Gram. Ainsi, les milieux de culture ont été la gélose chocolat, additionnés ou non de mélange polyvitaminique (Polyvitex ou Isovitalex) et le bouillon cœur cervelle(BCC). Les milieux gélosés ensemencés, incubés à 37°C dans une cloche à bougie sous une atmosphère humide enrichie en CO<sub>2</sub>, ont été observés 24 à 48 heures. Ensuite la pureté des cultures a été vérifiée avec l'aspect des colonies et confirmée par la coloration de Gram. Si la culture n'était pas pure, nous avons procédé aux repiquages afin d'obtenir une culture pure. Enfin, l'examen des colonies, les caractères morphologiques microscopiques, les tests de l'oxydase, de catalase et de la sensibilité à optochine (pour les pneumocoques) ont permis l'identification présumptive de:

- *Nm*, aérobie stricte et oxydase positive (annexe IV), a présenté sur GC de petites colonies rondes, lisses, luisantes, bombées, humides et transparentes, souvent muqueuses.

- *Sp*, aéro-anaérobie facultative et oxydase négative, a présenté de très petites colonies en gouttes de rosée entourées d'une hémolyse α, sur GSF ou d'une zone en jaune d'œuf sur GC ou GSC. Observées à la loupe, elles montraient un aspect bombé avec un bord régulier. De plus, l'identification présumptive des pneumocoques a consisté à l'examen de leur sensibilité à l'optochine. Les souches alpha-hémolytiques présentant une zone d'inhibition supérieure à 12-15mm ont été des pneumocoques.
- *Hi*, aéro-anaérobie facultative et oxydase positive, a présenté des colonies rondes, lisses, transparentes ou grisâtres, parfois muqueuses (avec dégagement d'une odeur d'amine) sur la GC. Son aspect sur cette gélose a été comparable à celui de *Nm*.

Ces différents examens ont permis de préciser l'orientation diagnostique qui a déterminé le choix de la galerie d'identification àensemencer et la détermination du sérogroupe de *Nm*. La Galerie Api NH fut utilisée selon les recommandations du fabricant (annexe V).

#### **4.2.2.5. Antibiogramme**

Les souches isolées au laboratoire et identifiées selon les caractères biochimiques (oxydase+ et catalase+ pour *Nm* et *Hi*, catalase- et oxydase- pour *Sp*) et métaboliques ont été testées aux antibiotiques choisis (Pénicilline G/Oxacilline, Ampicilline, Chloramphénicol, Ceftriaxone, Sulfamethoxazole-Triméthoprime). Des antibiogrammes ont été réalisés selon la méthode standard de diffusion en gélose.

A partir des colonies isolées d'une culture de 18 à 24 heures sur GC+PVX ou GSF, une suspension bactérienne (dilution au 1/10 pour *Sp* et *Hi*) en PBS (pour *Nm*) et en solution saline 0,9% de Na Cl (pour *Sp* et *Hi*) de turbidité équivalente au standard McFarland 0,5 a été préparée (51). Ensuite par écouvillonnage, une gélose MH2+5% de sang de mouton (*Nm*), une GC+PVX (*Hi*) ou une GS (*Sp*) a été ensemencée; puis des disques ont été déposés stérilement. Les boites d'antibiogrammes en position inversée ont été gardées à la température ambiante 15 à 30 min puis incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C sous CO<sub>2</sub> (51). Enfin les diamètres d'inhibition ont été lus après 18-24 heures d'incubation à 37°C sous CO<sub>2</sub>. Les zones d'inhibition autour du disque d'antibiotique ont permis de déterminer la sensibilité de la souche étudiée.

#### **4.2.2.6. Conservation des souches**

Les souches isolées ont été conservées dans du bouillon cœur cervelle plus glycérol à 30-60%. Les suspensions ainsi préparées dans des cryotubes (bouchons à vis externe) ont été conservées sur place à -80°C. Les copies des souches contrôlées et conditionnées ont été expédiées vers l'Europe pour la détermination des sérotypes et génotypes de *Nm*, *Sp* et *Hi* isolés.

#### **4.2.3. Analyses par PCR**

Tous les LCR collectés dans le laboratoire de PCR ont été traités selon le référentiel technique mis en place au laboratoire mixte de PCR CM/AMP (Annexe VI).

#### **4.2.4. Méthodes d'analyse des données**

Les données de notre étude ont été analysées par les logiciels Epi-info version 6.04fr et Excel 2003.

## 5. RESULTATS DE L'ETUDE

### 5.1. REPARTITION DES CAS CONFIRMES DE MENINGITES BACTERIENNES.

Durant cette période de deux années, nous avons diagnostiqué 198 cas de méningites sur 340 LCR reçus. 112 des cas confirmés (56,6%) sur 186 (54,7%) LCR reçus étaient de l'année 2007 et 86 des cas confirmés (43,4%) sur 154 (45,3%) LCR reçus étaient de l'année 2008.

#### 5.1.1. Répartition des cas de méningites bactériennes selon la classe d'âge et le sexe.

Sur les 198 cas, l'âge n'était pas renseigné chez 3 cas (2 Hommes et 1 femme).

**Tableau I: Répartition des cas de méningites bactériennes selon le sexe et l'âge.**

Classe d'âge (années)	Hommes (%)	Femmes (%)
< 1	4 (3,6)	2 (2,3)
1 – 4	21 (19,1)	23 (27,1)
5 – 9	24 (21,8)	34 (40)
10 – 14	30 (27,3)	13 (15,3)
15 – 19	11 (10)	5 (5,9)
20 – 34	14 (12,7)	6 (7,1)
> 34	6 (5,5)	2 (2,3)
Total	110 (56,4)	85 (43,6)

#### 5.1.2. Répartition des cas de méningites bactériennes par districts

Le district sanitaire de Houndé a été le moins représenté avec 3% de cas de méningites. Les districts les plus touchés ont été respectivement le district de Do (30,3%), de Dandé (24,7%), et de Dafra (20,2%) (Confère tableau II).

**Tableau II : Répartition des cas de méningites bactériennes par districts.**

District	Dafra	Do	K.Vigué	Léna	Dandé	Orodara	Houndé	Total
Nombre	40	60	21	8	49	14	6	198
Proportion	20,2%	30,3%	10,6%	4%	24,7%	7,1%	3%	100%

### 5.1.3. Description de l'aspect macroscopique des LCR.

L'examen macroscopique porté sur 194 spécimens des cas de méningites a permis d'obtenir les résultats qui sont consignés dans le tableau III.

**Tableau III : description de l'aspect des LCR.**

Aspect	Trouble	Clair	Louche	Hématifque	Citrin	Purulent	Total
Nombre	142	17	15	13	6	1	194
Proportion	73,2%	8,8%	7,7%	6,7%	3,1%	0,1%	100%

## 5.2. DISTRIBUTION DES ESPECES BACTERIENNES DE L'ETUDE

### 5.2.1. Répartition des espèces bactériennes identifiées au Gram

L'examen direct au Gram a montré 112 diplocoques Gram négatif soit 78%, 31 diplocoques Gram positif soit 21% et 2 bacilles Gram négatif soit 1%.

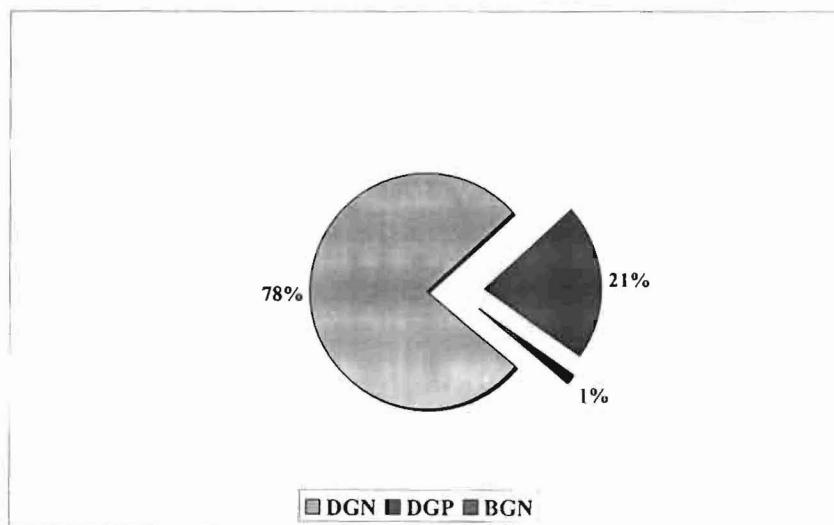


Figure 6 : Répartition des germes identifiés au Gram.

### 5.2.2. Répartition des espèces bactériennes détectées au Latex

La détection de l'antigène bactérien soluble dans les LCR a permis d'identifier 114 (78%) *Nm A*, 27 (18%) *Sp*, 2 (1%) *Hi b*, 1 (1%) streptocoque du groupe B et 3 (2%) souches poly agglutinables.

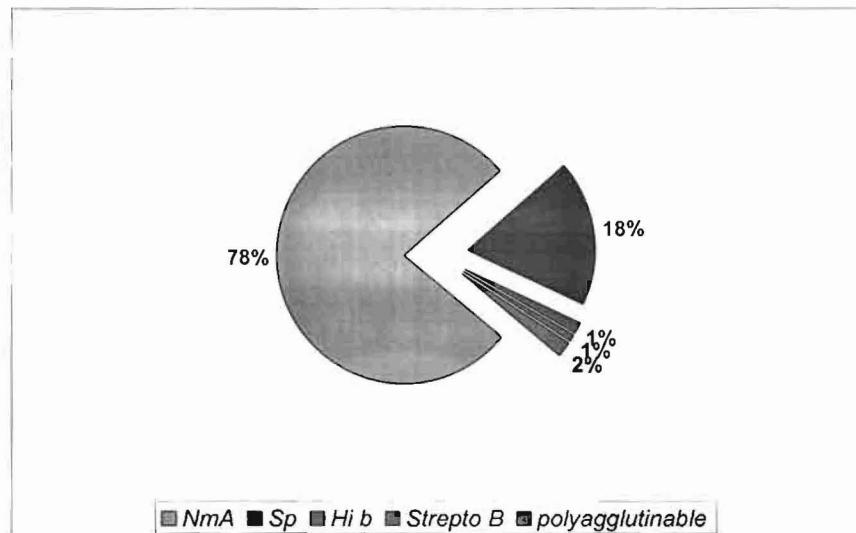


Figure 7 : Répartition des germes détectés au Latex

### 5.2.3. Répartition des espèces bactériennes isolées à la culture.

La culture à 48 heures faite sur 197 LCR a permis d'isoler 109 germes avec 89 (82%) *Nm*, 19 (17%) *Sp* et 1 (1%) *Hi*.

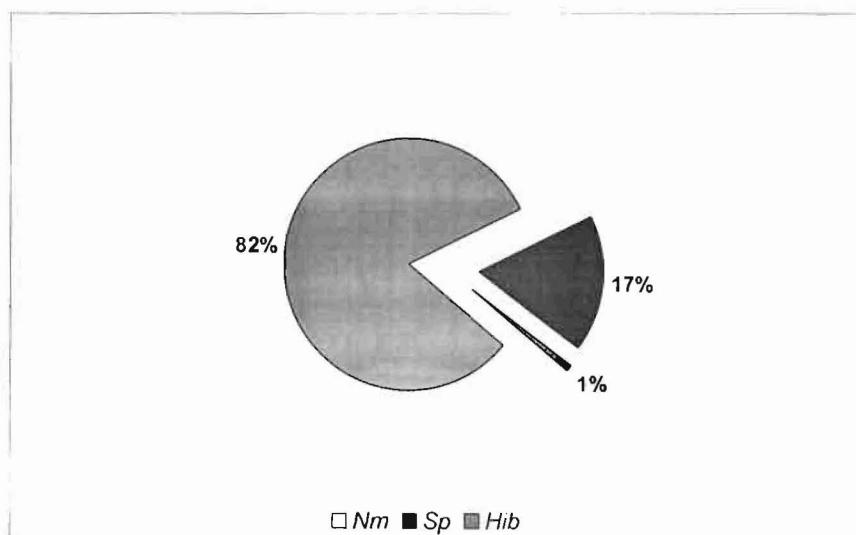


Figure 8 : Fréquence des germes isolés à la culture

#### 5.2.4. Répartition des espèces bactériennes identifiées à la PCR

La PCR faite sur 189 LCR a révélé le génome bactérien 167 fois avec 129 *Nm A* (77%) ; 1 *Nm X* (1%) ; 4 *Nm* Indéterminés (2%) ; 30 *Sp* (18%) ; 2 *Hi b* (1%) et 1 *Hi non b* (1%)

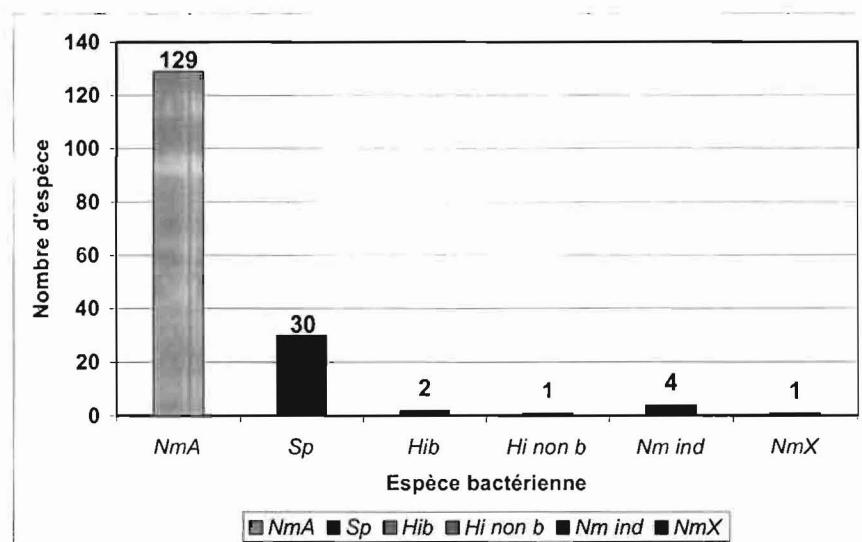


Figure 9 : Fréquence des germes identifiés à la PCR.

#### 5.3. RESULTATS DES DIFFERENTES METHODES D'ANALYSES VIS-A-VIS DE LA CULTURE

Les résultats globaux des différentes méthodes sont consignés dans le tableau IV.

Tableau IV : les résultats globaux des différentes techniques d'analyses

Résultats	Gram	Latex	Culture	PCR
Négatifs	53 (26,8%)	43 (22,8%)	88 (44,7%)	22 (11,6%)
Positifs	145 (73,2%)	146 (77,2%)	109 (55,3%)	167 (88,4%)
Total	198 (100%)	189 (100%)	197 (100%)	189 (100%)

### **5.3.1. Résultats de la culture et de l'examen direct (Gram)**

Les résultats de la culture et du Gram sont croisés dans le tableau suivant.

**Tableau V : Résultats de l'examen direct et ceux de la culture**

	Culture positive (n = 109)	Culture négative (n = 88)	
Examen direct positif (n=144)	103	41	VPP = 71,5%
Examen direct négatif (n=53)	6	47	VPN = 88,7%
	Se = 94,5%	Sp = 53,4%	

### **5.3.2. Résultats de la culture et du latex**

Les résultats du latex et de la culture sont consignés dans le tableau suivant :

**Tableau VI : Résultats de la culture et du latex**

	Culture positive (n = 107)	Culture négative (n = 81)	
Latex positif (n = 145)	103	42	VPP = 71%
Latex négatif (n = 43)	4	39	VPN = 90,7%
	Se = 96,3%	Sp = 48%	

### 5.3.3. Résultats de la culture et de la PCR

Le tableau ci-dessous indique le résultat obtenu à la culture et à la PCR.

**Tableau VII : Résultats de la culture et de la PCR**

	Culture positive (n = 106)	Culture négative (n = 83)	
PCR positive (n = 167)	99	68	VPP = 59,3%
PCR négative (n = 22)	7	15	VPN = 68,2%
	Se = 93,4%	Sp = 18%	

### 5.4. SENSIBILITE DES GERMES ISOLES AUX ANTIBIOTIQUES TESTES

Le tableau suivant indique la sensibilité aux antibiotiques des principaux agents de méningites bactériens.

**Tableau VIII : Sensibilité des germes isolés aux antibiotiques :**

ATB	<i>N. meningitidis</i> (n=70)			<i>S. pneumoniae</i> (n=18)			<i>H. influenzae</i> (n=1)		
	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)
Péni G	44 (62,9)	5 (7,1)	19 (27,1)	14 (77,7)	1 (5,6)	2 (11,1)	-	-	1 (100)
Ox	23 (32,9)	47 (67,1)	-	11 (61,1)	7 (38,9)	-	-	1 (100)	-
Ampi	68 (97,1)	2 (2,9)	-	17 (94,4)	1 (5,6)	-	1 (100)	-	-
Ceftr	70 (100)	-	-	18 (100)	-	-	1 (100)	-	-
CMP.	63 (90)	3 (4,3)	4 (5,7)	12 (66,7)	3 (16,7)	3 (16,7)	1 (100)	-	-
SXT	14 (20)	39 (55,7)	10 (14,3)	1 (5,6)	11 (61,1)	2 (11,1)	1 (100)	-	-

NB: Ox (oxacilline), Ampi (Ampicilline), CMP (chloramphénicol), ceftr (ceftriaxone), SXT=SMX-TMP (sulfométhoxazole triméthoprime). Péni G (pénicilline G).

## **6. DISCUSSION**

### ***6.1. LIMITES DE NOTRE ETUDE***

Les limites et contraintes observées lors de notre étude longitudinale ont été :

- Le remplissage incomplet des registres de laboratoires, surtout concernant les aspects des LCR et les âges des patients. Ce qui a réduit la taille de l'échantillon.
- Au niveau du laboratoire de bactériologique la rupture de certains réactifs pour la coloration de Gram et/ou les kits d'agglutination aux particules de latex a limité l'identification des agents étiologiques par ces techniques de diagnostic. Certains échantillons n'auraient pas été transportés dans les bonnes conditions, donc leur mise en culture n'a pas été réalisée, ce qui a diminué le nombre de souches isolées.
- Au niveau du laboratoire mixte de PCR, le non acheminement et les quantités insuffisantes des LCR ont été la cause majeure de la baisse du nombre de germes identifiés.
- La perte des souches identifiées et la rupture de certains disques d'antibiotiques ont influencé le nombre d'antibiogramme réalisé, ce qui a limité l'étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.

### ***6.2. COMMENTAIRES***

Les données rétrospectives de ces deux années confirment la prédominance des principaux agents étiologiques de méningites bactériennes qui étaient dans l'ordre d'importance *Nm*, *Sp* et *Hi*. Ce sont également les trois principaux germes retrouvés dans la littérature ; seule la fréquence relative varie d'un pays à l'autre (27).

En Afrique subsaharienne, même si le méningocoque du sérogroupe C peut être associé à des épidémies, le sérogroupe A reste prédominant (3, 34). D'autres sérogroupes de méningogocques circulent, plus récemment les sérogroupes W135 et X ont été associés à des épidémies en Afrique (3, 10, 28). La forte incidence du sérogroupe A dans la ceinture africaine de la méningite pourrait s'expliquer par des facteurs environnementaux et socio-économiques (saison sèche, pauvreté des populations, forte agglomération,...) (25, 34).

*Sp* a occupé la deuxième place dans notre étude. Faye en Côte d'Ivoire a noté la prédominance de *Sp* lors d'une étude réalisée entre 1995 et 2000 (35). Le pneumocoque, endémique dans les pays de la ceinture africaine de la méningite survenant en dehors des épidémies, a été associé à des épidémies au Ghana (3). Dans la littérature, la fréquence de cette bactérie a été soulignée à tous les âges avec une prédominance chez les enfants de moins d'un an et chez les personnes âgées (5, 30, 36).

La méningite à *Hi* n'a été trouvée que dans deux cas. Dans la littérature, de nombreux auteurs ont souligné sa place importante dans les méningites survenant avant l'âge de 5 ans (2, 5, 14, 23, 30, 35, 37). La forte attaque de cette frange de la population pourrait s'expliquer par la fragilité des systèmes immunitaires des enfants ainsi que l'insuffisance des anticorps maternels (35, 38). Au Burkina Faso la méningite à *Hi* a été la cause prédominante des méningites bactériennes chez les enfants comme l'a rapporté Yaro lors des études réalisées à Bobo dans trois districts de la région sanitaire des Hauts Bassins (23). Dans notre étude, il n'a pas été représentatif. Il a été responsable de méningite chez les enfants âgés de moins de 5 ans. Cette faible fréquence pourrait s'expliquer soit par l'introduction du vaccin anti-*Hi* b dans le programme vaccinal des enfants au Burkina depuis 2006, soit par les limites de la performance de la culture à isoler ce germe exigeant. De nombreuses études réalisées à cet effet en Tunisie, à Madagascar et dans de nombreux pays de la ceinture africaine de la méningite ont montré l'importance de la vaccination anti-*Hi* b dans la lutte contre les méningites à *Hi* b (17, 27, 30, 34, 35). Ainsi dans plusieurs pays où la vaccination de routine contre *Hi* b a été appliquée aux jeunes enfants, la méningite à *Hi* b a été pratiquement éliminée (34).

D'une manière générale les méningites bactériennes intéressent tous les âges mais les enfants sont généralement les plus touchés. Dans la littérature, plus de 50% des méningites bactériennes surviennent chez les enfants (2, 37). Dans notre étude, l'âge moyen était de 11 ans avec des extrêmes allant de 0 à 65 ans. L'âge était connu pour 195 cas soit 98,5%. Parmi ces cas, 77,4% avaient moins de 15 ans. Ces résultats sont proches de ceux de Campagne (76,2%) au Niger (2) et de Maalej (74,5%) en Tunisie (5). Cependant, le profil bactériologique des méningites bactériennes du grand enfant et l'adulte est nettement dominé dans la littérature par *Nm* et *Sp* (5, 6, 26.). Dans notre contexte ces deux germes ont été associés à près de 52% de cas de méningites survenus

chez les enfants de 5 à 14 ans. L'âge est un facteur de risque qui détermine l'incidence des méningites bactériennes pour chaque type de germes (27). Les variations saisonnières et les conditions socio-économiques ont été aussi soulignées. Ces trois principaux germes ont des incidences maximales chez l'enfant (*H. b* surtout) et chez les grands enfants et adultes (*Nm A, S p*).

Les méningites bactériennes ont été plus fréquentes chez les patients de sexe masculin que chez les patients de sexe féminin (112 (56,6%) contre 86 (43,4%)). La prédominance masculine trouvée dans cette étude (sex-ratio = 1,3) a été signalée par d'autres auteurs (2, 7).

Au plan diagnostic, la combinaison de l'examen direct, de la culture, du latex et de la PCR permet d'optimiser les résultats microbiologiques. Par conséquent les tests au latex et la PCR permettent de corriger des diagnostics négatifs après culture comme cela a été rapporté dans la littérature (14, 23, 39). Ainsi, 68 et 42 cas négatifs à la culture ont été confirmés positifs respectivement à la PCR et au latex, dans notre étude. Ces techniques ont fait leur preuve dans de nombreux pays, surtout dans les pays de la ceinture africaine de la méningite où les conditions de transport et de conservation du LCR limitent les résultats de la culture. Elles augmentent de ce fait la rentabilité de l'examen microbiologique (14, 39).

L'examen direct a permis de mettre en évidence l'agent étiologique à la culture 103 fois sur 109 soit 94,5% des cas. La sensibilité de la microscopie toutes cultures confondues est de 94,5% et de spécificité de 53,4%. Ainsi un cas positif à la microscopie a été confirmé positif à la culture dans 71,5% (VPP). Nos résultats étaient différents de ceux de Tchoua au Gabon qui trouvait 82% de sensibilité, 58% de spécificité et 64% de VPP (41). La performance de la microscopie a été rapportée par d'autres auteurs (43, 44). La sensibilité de la microscopie est liée soit à la technique de coloration (vitesse de centrifugation ou cytocentrifugation,...), soit à la densité bactérienne qui est souvent influencée par l'évolution de la méningite et par une antibiothérapie préalable (43, 44). Dans notre étude ce fort taux pourrait s'expliquer par l'absence d'antibiothérapie précoce.

L'examen direct apparaît comme un outil de diagnostic rapide des méningites bactériennes surtout dans le contexte de l'Afrique subsaharienne. Seulement, il ne permet

pas l'identification des espèces de bactéries responsables de méningites bactériennes aiguës. Il ne donne qu'une orientation diagnostique.

La recherche d'antigènes solubles des germes a été performante sur un total de 188 LCR. Le test a été positif dans 145 (77,1%) cas, en raison de 73,2% de l'ensemble des 198 cas confirmés de méningites. Sur les 88 cultures négatives dans notre étude, le latex a été performant sur 81 LCR dans lesquels 42 (51,9%) ont été positifs. Le latex positif a été confirmé comme positif à la culture dans 71% (VPP). La sensibilité du latex toutes cultures confondues est de 96,3% et de spécificité de 48,1%. Nos résultats sont proches de ceux de Mani qui a trouvé 49,6% de cas positifs au latex et qui étaient négatifs à la culture (43) ; Tchoua avait trouvé au Gabon que 76% des cas positifs au latex étaient négatifs à la culture (39). Ces différences de détermination des faux positifs peuvent être liées aux différents sérogroupes notamment pour *Nm*. Pour ce dernier des auteurs ont rapporté une meilleure détection du groupe A par rapport au groupe C (43, 44). La détection des antigènes bactériens dans le LCR, en complément de la culture du LCR peut être rapidement réalisée en moins d'une heure. Ce qui augmente la rentabilité de l'examen bactériologique.

De part sa rapidité, sa fiabilité et sa facilité d'exécution, l'intérêt du latex dans le diagnostic bactériologique a été constamment soulignés (3, 23, 43). Il permet de dépister des méningites décapitées par un traitement antibiotique précoce.

La culture et la PCR ont été positives dans 59,3% de cas confirmés de méningites. Sur 83 cas négatifs à la culture, la PCR a été positive dans 68 cas (82%). La sensibilité de la PCR toutes cultures confondues a été de 93,4%. Cette haute sensibilité de la technique de PCR a été soulignée par de nombreux auteurs (21, 22, 43). La PCR est une méthode rapide et performante qui permet de diagnostiquer des cas de méningites négatifs à la culture; de diagnostiquer des sérotypes des espèces notamment les méningocoques (11, 28). Elle pourrait aussi être utilisée comme la base de production de vaccins spécifiques d'espèces afin de prévenir des épidémies, à la détermination des résistances moléculaires des germes notamment chez les pneumocoques. Elle a été transférée au Burkina Faso en 2002, et depuis elle ne cesse de faire ces preuves dans la surveillance microbiologique des méningites bactériennes aigues (13). Cependant dans la prise en charge des méningites

bactériennes aigues, l'une des principales limites de la PCR reste encore son incapacité à fournir des profils étendus de sensibilité des souches aux antibiotiques.

Malgré la bonne sensibilité et la bonne spécificité de la PCR et la bonne performance du latex, la culture reste la méthode de référence dans le diagnostic des méningites bactériennes. Elle permet d'effectuer l'antibiogramme, d'obtenir de souches pures pour d'éventuelles investigations (phénotypage et génotypage des souches par exemple).

Nous avons étudié la sensibilité de 89 (81,7%) souches sur 109 souches isolées.

❖ *Neisseria meningitidis* :

Dans notre contexte, l'étude de la sensibilité des 70 souches de méningocoques testées aux antibiotiques a montré une résistance à l'oxacilline à 67,1%, au SMX-TMP à 55,7%, à la Péni G à 7,1% et au chloramphénicol à 4,3%. Elles ont présenté une sensibilité intermédiaire à la pénicilline à 27,1% et au chloramphénicol à 5,7%. Elles ont été toutes sensibles à la ceftriaxone et ont présenté une très bonne sensibilité à l'ampicilline (97,1%) et au chloramphénicol (90%).

Le méningocoque est resté pendant longtemps très sensible aux bétalactamines qui sont des antibiotiques de choix pour le traitement des infections à méningocoques. Cependant, l'événement majeur de ces dernières années est le développement de la résistance aux bétalactamines. La résistance des méningocoques à la PéniG et aux Aminopénicillines résulte généralement de la diminution de l'affinité de PLP-2 (5, 45). Les C3G restent actives. L'incidence de la résistance à la PéniG a été soulignée par certains auteurs (5, 39, 46, 47). Ainsi Tchoua rapportait 25% de méningocoques résistants à la PéniG au Gabon (39); Anna a fait cas de 10% de méningocoques résistants à la PéniG en Pologne (46) et Akoua-Koffi rapportait 28,6% en Côte d'Ivoire (6). Nos résultats ont été supérieurs à ceux d'Anna et avoisinaient ceux de Tchoua et d'Akoua-Koffi. Ces différences pourraient s'expliquer par la variabilité de l'incidence de la résistance à la PéniG de cet agent qui diffère d'un pays à l'autre et de l'année; elle peut atteindre 10% des souches (5, 45).

En 1996, Dabernat trouvait que les souches de méningocoques étaient sensibles au chloramphénicol et au ceftriaxone (45) ainsi que dans notre étude. Dans la littérature, le

chloramphénicol est la thérapie standard dans les pays en voie de développement, surtout dans la ceinture de la méningite africaine en période d'épidémie (3, 47). Son efficacité est supérieure à 90%, mais il est contre-indiqué chez les femmes enceintes et chez les enfants de moins d'un an (3).

La rifampicine qui n'a pas été testé dans notre étude, reste un antibiotique recommandé en première intention pour la chimio prophylaxie antiméningococcique. Comme certains auteurs l'ont signalé, il reste efficace sur le méningocoque (45, 46).

#### ❖ *Streptococcus pneumoniae*

Dans notre série, l'étude de la sensibilité des 17 sur les 18 souches de pneumocoques aux antibiotiques a montré une sensibilité à la ceftriaxone à 100%, à l'ampicilline à 94,4%, à la PéniG à 77,7%, au chloramphénicol à 66,7%, à l'oxacilline à 61,1% et au SMX-TMP à 5,6%.

Le taux de résistance du pneumocoque aux bétalactamines est variable selon les régions. En France, 59,2% des souches de pneumocoques isolées en 2004 étaient de sensibilité diminuée à la PéniG (48) Entre 2004-2005, le taux de la France était de 49,2%, en Grèce 57,1% des souches étaient résistantes à la PéniG, en Espagne le taux était de 40,1% et en Slovaquie il était de 52,3% (49). En Tunisie 27,2% étaient PSDP et au Gabon 15% des souches étaient résistantes à la pénicilline (5, 39). Dans notre contexte, 17,7% des souches ont été résistantes dont 5,6% de haut niveau. Dans d'autres pays tels que la côte d'Ivoire (6), le Cameroun (26), la fréquence de PSDP était inférieure à 10%.

Les souches de *Sp* isolées dans notre étude étaient toutes sensibles à la ceftriaxone et 17 sur 18 étaient sensibles à l'ampicilline. Akoua-Koffi en Côte d'Ivoire trouvait 100% de sensibilités de cet agent vis-à-vis de ces antibiotiques (6). Le pourcentage de résistance des pneumocoques en 2004 à la Réunion en France pour les C3G était de 8,7% pour la céfotaxime et de 10,5% pour la ceftriaxone (48).

La résistance à la PéniG des souches de *Sp* pourrait devenir préoccupante au plan thérapeutique et devrait être l'objet d'une surveillance afin d'éviter une probable grave menace pour le futur (39). La sensibilité diminuée du pneumocoque à la PéniG implique

une sensibilité diminuée aux autres bétalactamines; mais la ceftriaxone, la céfotaxime et les carbapénems sont moins affectés et restent plus généralement actifs sur cet agent (47).

Concernant le chloramphénicol, 16,7% de nos souches ont été résistantes et 16,7% présentaient une sensibilité intermédiaire. Dans la littérature la résistance au chloramphénicol du *Sp* a été soulignée par certains auteurs: 19,6% en Pologne (46), 15% au Gabon (41), 28,8% en 1998 et 8,8% en 2004 en France (48).

En somme, bien que la ceftriaxone et l'ampicilline ont été les molécules les plus actives sur *Nm* et *Sp*, les phénicolés particulièrement le chloramphénicol ont aussi été performant pour le méningocoque, dans notre contexte. Dans la littérature, certains auteurs ont noté la performance des C3G pour ces germes, les performances non négligées des Aminopénicillines pour le *Sp* et les phénicolés pour le méningocoque (6, 39).

#### ❖ *Haemophilus influenzae*

Une seule souche a été isolée à la culture et l'étude de sa sensibilité vis-à-vis des antibiotiques a montré une bonne sensibilité à la ceftriaxone, à l'ampicilline, au chloramphénicol et au SMX-TMP. Elle a présenté une sensibilité diminuée à la PéniG. *Hi* est une espèce bactérienne sensible à de nombreuses familles d'antibiotiques (45); mais comme de nombreuses espèces bactériennes, il n'a pas été épargné par l'évolution de la résistance aux antibiotiques (2, 5, 30, 46, 47). Les C3G restent toujours performantes pour les *Hi* (26, 47) ainsi que dans notre contexte. Le choix d'antibiotique de première intention dans le traitement des méningites à *Hi* doit être une C3G qui a une sensibilité à près de 100% (5, 30, 40, 46). Vu le faible taux de résistance du chloramphénicol (5, 40, 45) et de sa bonne diffusion méningée, il pourrait être une bonne alternative dans les pays pauvres.

Concernant la sensibilité des souches aux antibiotiques usuels, le choix d'une molécule en première intention devrait tenir compte des niveaux de résistance à la Péni G (bétalactamines de groupe G) pour le *Sp* et le *Nm* et l'ampicilline (bétalactamines de groupe A) pour *Hi*. Les Aminopénicillines et les C3G restent les molécules les mieux adaptées dans le traitement des méningites communautaires. Ces trois principaux germes conservent une sensibilité au dessus de 90% vis-à-vis de ces antibiotiques (6).

## **7. PERSPECTIVES.**

- Une étude prospective longitudinale avec le séquençage des souches de méningites résistantes aux bétalactamines (*Sp* surtout), permettrait de suivre les infections et une prise en charge efficace.
- Aussi une étude longitudinale avec l'identification des sérotypes des germes associés à des méningites bactériennes (*Nm* et *Sp*) qui circulent en Afrique subsaharienne permettrait de mieux adapter les nouvelles générations de vaccins et rendrait efficace la surveillance microbiologique.
- Enfin une étude prospective d'une corrélation entre la clinique et la surveillance microbiologique permettrait de mieux évaluer l'antibiothérapie et de faire face à cette résistance bactérienne.

## 8. CONCLUSION

Les 198 cas confirmés de méningites bactériennes dans notre étude ont été dominées par *Nm* suivi de *Sp* et de *Hi*. Au Burkina Faso et dans de nombreux d'autres pays, depuis l'introduction du vaccin *Hi b* dans le programme élargie de vaccination de routine chez les enfants, *Nm* se partage avec *Sp* la responsabilité de la grande majorité des méningites purulentes. Le principal problème posé par ces deux bactéries est la résistance acquise aux molécules de Pénicilline qui induit la diminution de la sensibilité aux autres bétalactamines.

Dans notre étude, la survenue de cas de méningites bactériennes a été plus observée dans la population masculine. L'âge moyen était de 11 ans et la frange de la population, tous les sexes confondus qui avaient moins de 15 ans ont été les plus touchés.

Au plan diagnostic, la combinaison des techniques bactériologiques et de la PCR a permis d'optimiser les résultats de la surveillance microbiologique et pourrait permettre de répondre efficacement aux épidémies ainsi qu'aux endémies. Cette combinaison permettrait par:

- l'emploi d'une méthode bactériologique fiable qui se révèle indiscutable pour le diagnostic de méningites bactériennes dans l'objectif de guider une antibiothérapie adaptée. Cela assurerait un contrôle du comportement des germes vis-à-vis des antibiotiques ;
- l'emploi de la PCR qui s'avère nécessaire pour porter le diagnostic d'une proportion importante de cas de méningite bactérienne négatif à la culture. De plus elle permettrait de contrôler l'émergence des souches résistantes à la Pénicilline du point de vue moléculaire, plus particulièrement les *Sp* qui ont présenté durant ces dernières années des résistances accrues aux bétalactamines

Dans la surveillance microbiologique des méningites bactériennes, les analyses bactériologiques doivent être couplées à celle de la PCR dans les laboratoires nationaux de référence. Cela devrait s'accompagner d'un effort continu d'assurance qualité dans les laboratoires qui bénéficieront de ce transfert de technique. Ainsi, la surveillance des méningites bactériennes serait renforcée et les différentes souches qui circulent d'une

épidémie à l'autre, d'un pays à un autre seraient mieux décrites. Aussi, elle pourrait être un tremplin pour l'introduction de nouveaux vaccins à cours terme dans la ceinture africaine de la méningite de Lapeyssonie.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Organisation mondiale de la santé**, 2007. Le point sur les épidémies. *Relevé épidémiologique hebdomadaire N° 5 (82)*: 33-40.
2. **Campagne G, Schuchat A, Djibo S, Ousseini A, Cissé L, Chippaux J P**, 1991. Epidemiology of bacterial meningitis in Niamey, Niger, 1981-1996. *Bull WHO* 77 (6):499-508.
3. **Alonso J M, Bertherat E, Perea W, Borrow R, Chanteau S, Cohet C, Dodet B, Greenwood B, Laforce F M, Muros-Le Rouzic E, Teyssou R, Ouédraogo-Traoré R, Sow I**, 2006. Compte rendus de congrès. Ceinture africaine de la méningite: de la génomique aux stratégies de surveillance, de lutte et de prévention. *Bull Soc Pathol Exot* 99 (5): 404-408
4. **Organisation Mondiale de la Santé**, 2005. Surveillance renforcée de la méningite à méningocoques en Afrique: trois années d'expérience. *Relevé hebdomadaire N° 37(80)* 313-320.
5. **Mezghani M S, Mahloubi R F, Damak J, Hammami A.**, 2006. Bacteriology of community acquired meningitis in Sfax, Tunisia (1993-2001). *Med Mal Infect* 36: 105-110.
6. **Akoua-Koffi C, Anghui H, Faye-Ketté H, Eholié S, Timité M, Dosso M, Kadio A**, 2001. Aspects bactériologiques des méningites purulentes au CHU de Yopougon, 1995-1998. *Méd. Mal Infect* 31: 475-81.
7. **Van Driel JJ, Bekker V, Spanjaard L, Van der Ende A, and Kuijpers T W**, 2008. Epidemiologic and Microbiologic Characteristics of Recurrent Bacterial and Fungal Meningitis in Netherlands, 1988-2005. *Clin Infect Dis* 47: e 42-51.
8. **Bertherat E, Yada A, Djingarey MH, Koumaré B, en collaboration avec le Ministère de la Santé et la Représentation OMS au Burkina Faso**, 2002. Première épidémie de grande ampleur provoquée par *Neisseria meningitidis* W135 en Afrique. *Med trop* 62: 301-304.
9. **Traore Y, Njanpop-Lafourcade BM, Adjogble KSL, Lourd M, Yaro S, Nacro B, Drabo A, Parent du Chatelet I, Mueller JE, Taha MK, Borrow R, Pierre Nicolas, Alonso JM, Gessner BD**, 2006. Rise and Fall of Epidemic *Neisseria meningitidis* Serogroup W135 Meningitis in Burkina Faso, 2002-2005. *Clin Infect Dis* 43: 817-22.
10. **Parent du Chatelet I, Alonso JM, Taha MK**, 2002. Clonal expansion of *Neisseria meningitidis* W135. Epidemiological implications for the African meningitis belt. *Bull Soc Pathol Exot* 95 (5): 323-325.
11. **Taha MK; Parent du Chatelet I, Martin. S, Sanou I, Djibo S, Francois de Chabalier, Alonso JM**, 2002. *Neisseria meningitidis* Serogroup W135 and A Were Equally Prevalent among Meningitis Cases Occurring at the End of the 2001 Epidemics in Burkina Faso and Niger. *J. Clin. Microbiol, Mar.* 40: p. 1083-1084.

12. **Von Gottberg A, Mignon du Plessis, Cohen C, Prentice E, Schrag S, Linda de Gouveia, Coulson G, Gillian de Jong, Klugman K, for the Group for Enteric, Respiratory and Meningeal Disease Surveillance in South Africa**, 2008. Emergence of Endemic Serogroup W135 Meningococcal Disease Associated with a High Mortality Rate in South Africa. *Clin Infect Dis* 46: 377-86.
13. **Njanpop-Lafourcade BM, Traoré Y, Aguilera JF, Sanou O, Lourd M, Giorgino D, Da Silva A, B Gessner BD, Taha MK**, avril 2005. Contribution of PCR to surveillance of acute bacterial meningitis in Africa: report on a successful experience of technological transfer to Centre MURAZ laboratory, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Rev Fr Lab* 372.
14. **Parent du Chatelet I, Traoré Y, Gessner BD, Antignac, Nacro B, Njanpop-Lafourcade BM, Ouédraogo MS, Tiendrebeogo SR, Varon E, Taha MK**, 2005. Bacterial Meningitis in Burkina Faso: Surveillance Using Field-Based Polymerase Chain Reaction Testing. *Clin Infect Dis* 40: 17-25.
15. **Garcia V, Morel B, Wadack MA, Bangui M, Moulia-Pelat JP & Richard V**, 2004. Outbreak of Meningitis in the province of Logone occidental (Chad): Descriptive study using health ministry data from 1998 to 2001. *Bull Soc Pathol Exot* 97 (3) 183-188.
16. **Chippaux JP, Debois H, Saliou P**, 2002. A critical review of control strategies with regard to meningococcal meningitis epidemics in Sub-Saharan African countries. *Bull Soc Pathol Exot* 94 (1): 37-44.
17. **Tall FR, Elola A, Prazuck T, Traoré A, Nacro B, Ballerau VF**, 1992. Méningites à *Haemophilus influenzae* à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). *Med Mal Infect* 22: 1173-7.
18. **Yaro S, Lourd M, Traore Y, Njanpop-Lafourcade BM, Sawadogo A, Sangare L, Hien A, Ouedraogo MS, Sanou O, Parent du Chatelet I, Koeck JL, and Gessner BD**, 2006. Epidemiological and molecular characteristics of highly lethal epidemic pneumococcal meningitis in Burkina Faso. *Clin Infect Dis* 43: 693-700.
19. **Report WHO African Region**, july 2003. Communicable Diseases Epidemiological: Surveillance of *Haemophilus influenzae* type b: Paediatric Bacterial Meningitis Surveillance Network in the African Region.: p1-3.
20. **Organisation Mondiale de la Santé**. Techniques de Laboratoire pour le Diagnostic des Méningites à *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*. WHO/CDS/CSR/EDC/99.7
21. **Deutch S, Möller JK, Ostergaard L**, 2008. Combined assay for two-hour identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* and concomitant detection of 16S ribosomal DNA in cerebrospinal fluid by real-time PCR. *Scand.J. Infect. Dis* 40: 607-614.
22. **Boisier P, Djibo S, Sidikou F, Mindadou H, Kairo KK, Djibo A, Goumbi K and Chanteau S**, may 2005. Epidemiological patterns of meningococcal meningitis in

Niger in 2003 and 2004: under the threat of *N. meningitidis* serogroup W135. *Trol Med Int Health* 10 (5):435–443.

23. **Yaro S, Lourd M, Nacro B, Njanpop-Lafourcade BM, Hien A, Ouedraogo MS, Traoré Y, Schouls LM, Parent du Chatelet I, and Gessner BD**, 2006. The Epidemiology of *Haemophilus influenzae* Type b Meningitis in Burkina Faso. *Pediatr Infect Dis J* 25: 415–419.
24. **Université PARIS-VI Pierre et Marie Curie Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière**, 2003. Les streptocoques, entérocoques et pneumocoques, p 42-45 ; les *Neisseria*, p 47-49 ; les bacilles à Gram négatif hémophiles ou exigeants, p 87-89. In: *Bactériologie DCEMI 2002-2003 service de Bactériologie*.
25. **Lapeysonnie L**, 1963. La méningite cérébro-spinale en Afrique. *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé* 28 Suppl: 1-110.
26. **Fonkoua MC, Cunin P, Sorlin P, Musi J & Martin PMV**, 2001. Les méningites d'étiologie bactérienne à Yaoundé (Cameroun) en 1999-2000. *Bull Soc Pathol Exot* 94 (4) 300-303
27. **Expertise collective INSERM**. Méningites bactériennes: Stratégies de traitement et de prévention [en ligne]. URL: <http://ist.inserm.fr/basisrapports/meningite.html> (page consultée le 10 juillet 2009).
28. **Boisier P, Nicolas P, Djibo S, Taha MK, Jeanne I, Mainassara HB, Tenebray B, Kairo KK, Giorgini D, and Chanteau S**, 2007. Meningococcal Meningitis: Unprecedented Incidence of Serogroup X-Related Cases in 2006 in Niger. *Clin Infect Dis* 44:657–63.
29. **Leimkugel J, Forgor AA, Gagneux S, Pfluger V, Flierl C, Awine E, Naegeli M, Dangy JP, Smith T, Hodgson A, and Pluschke G**, 2005. An Outbreak of Serotype 1 *Streptococcus pneumoniae* Meningitis in Northern Ghana with Features That Are Characteristic of *Neisseria meningitidis* Meningitis Epidemics. *J. Infect Dis* 192:192–9.
30. **Razafindralambo M, Ravelomanana N, Randriamiharisoa FA, Migliani R, Clouzeau J, Raobijaona H, Rasamoelisoa J & Pfister P.**, 2004. *Haemophilus influenzae*, deuxième cause des méningites bactériennes de l'enfant à Madagascar. *Bull Soc Pathol Exot* 97 (2): 100-103.
31. **Aguiar SI, Serrano I, Pinto FR, Melo-Cristino J and Ramirez M**, 2008. Changes in *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing invasive disease with non-universal vaccination coverage of the seven-valent conjugate Vaccine. *Clin Microbiol Infect* 14: 835–843
32. **Mueller JE, Yaro S, Traoré Y, Sangaré L, Tarnagda Z, Njanpop-Lafourcade BM, Borrow R, and Gessner BD**, 2006. *Neisseria meningitidis* Serogroups A and W-135: Carriage and Immunity in Burkina Faso, 2003. *J Infect Dis* 193:812–20.
33. **Société Française de Microbiologie**, 2004: Examen cytochimique et bactériologique du liquide céphalorachidien. In: Rémic 2<sup>e</sup> édition : par le groupe de la

Société Française de Microbiologie (Ed). **Référentiel en microbiologie médicale (bactériologie et mycologie)**. 2M2-Demande du RéMIC 7, rue Bastienne 95160 Montmorency. P: 57-60.

34. **Organisation mondiale de la Santé**. Lutte contre les épidémies de méningite à méningocoque : Guide pratique OMS. *WHO/EMC/BAC/98.3*.
35. **Faye-Ketté H, Doukou ES, Boni C, Akoua-Koffi C, Diallo-Touré K, Kacou-N'Douba K, Bouzid S, Dosso M & Timité-Konan M**, 2003. Agents des méningites purulentes communautaires de l'enfant : tendance épidémiologique à Abidjan, Côte d'Ivoire, de 1995 à l'an 2000. *Bull Soc Pathol Exot* 96 (4) 313-316.
36. **Berg S; Trollfors B; Claesson BA; Alestig K; Gothe fors L; Hugosson S; Lindquist L; Per Olcén; Romanus V; Strangert K**, 1996. Incidence and Prognosis of Meningitis due to *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* in Sweden. *Scand J Infect Dis* 28: 247-252.
37. **Sile Mefo H, Sile H, Mbonda E, Fezeu R, Fonkoua MC**, 1999. Les méningites purulentes de l'enfant au nord Cameroun: aspects cliniques, bactériologiques et thérapeutiques. *Méd Afr Noire* 46 (1).
38. **Tall FR, Elola A, Traoré A, Sanou I, Nacro B, Nagalo K, Ballereau VF, Prazuuck T**. 2004. Méningites à *Haemophilus* et immunité naturelle anti-*Haemophilus influenzae* (*Hib*) chez l'enfant au Burkina Faso. *Mali Médical T XIX N° 3&4*
39. **Tchoua R, Oulabou R, Vemba A, Hage S, Okome M, Mankey G, Pr. Ngaka**, 1997. Contribution of a bacteriology laboratory in choosing of antibiotic treatment in adults bacterial meningitis. *Méd Afr Noire* 44 (7).
40. **Koko J, Batsidili S, Dufillot D, Kani F, Gahouma D, Moussavou A**, 2000. Bacterial meningitis in children in Libreville, Gabon. Epidemiologic, therapeutic and prognostic features. *Méd Mal Infect* 30: 50-6.
41. **Seydi M, Soumaré M, Sow AI, Ndour CT, Dia NM, Manga NM, Senghor CS, Diop BM, Sow PS, Faye/Niang MA, Faye O, Badiane S**, 2002. Aspects cliniques, bactériologiques et thérapeutiques des meningitis cérébro-spinales à Dakar en 1999. *Med Trop* 62: 137-140.
42. **Kouakou MO & Loembe PM**, 1999. Les méningites bactériennes de l'adulte. Etude de 85 cas observés dans l'unité des maladies infectieuses de la Fondation Jeanne Ebori (F. J. E), Libreville, Gabon. *Bact. p 1-4*.
43. **Mani R, Pradhan S, Nagarathna S, Wasiulla R, Chandramuki A**, 2007. Bacteriological profile of community acquired acute bacterial meningitis: a ten-year retrospective study in a tertiary neurocare centre in south india. *Ind J. Med Microbiol* 25 (2):108-14.
44. **Denis F, Ploy M.C., Martin C**, 1996. Apport des données microbiologiques dans le diagnostic étiologique bactérien des meningitis purulentes. *Méd Mal Infect*. 26: 1060-7.

45. **Dabernat H**, 1996. Données épidémiologiques de la résistance aux antibiotiques des *Haemophilus*, méningocoques et *listeria*. *Méd Mal Infect.* 26 : 1006-15.
46. **SKOCZYNSKA A, PKRIZ P, KONRADSEN HB, HRYNIEWICZ W**, 2000. Characteristics of the Major Etiologic Agents of Bacterial Meningitis Isolated in Poland in 1997–1998. *Microbial Drug Resistance* 6, Number 2: 147-154.
47. **Tzanakaki G, Mastrandio P**, 2007. Aetiology of bacterial meningitis and resistance to antibiotics of causative pathogens in Europe and in the Mediterranean region. *Int J. Antimicrob. Agents* 29: 621-629.
48. **Simac C, Picot S, Farny K, Michault A**, 2006. Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in the Reunion Island during 2004. *Méd Mal Infect.* 36: 47-51.
49. **Riedel S, Beekmann SE, Heilmann KP, Richter SS, Lomas JG, Ferech M, Goosens H ,Doern GV**, 2007. Antimicrobial use in Europe and antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 26:485–490.
50. **La réaction de polymérisation en chaîne (PCR): principe et application** [en ligne]. URL: <http://www.congres-des-sciences.be/archives/2006/DOC-siatka.pdf> (page consultée le 9 juillet 2009).
51. **Société Française de Microbiologique (SFM)**. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de microbiologie (CASFM). *Recommandations 2008 (édition de janvier 2008)*.
52. **Nicoli J, Bideau J, Nicoli RM, Vanderkerkove M, and Faucon R**, April 1970. Taxométrie et biologie moléculaire: une revue taxonomique actuelle de *Neisseria meningitidis*. *Int J. Systematic Bact.* 20 (2) : 119-131.

## **ANNEXE I: COLORATION DE MAY-GRUNWALD-GIEMSA (MGG).**

### ➤ **Technique de coloration**

- Recouvrir le frottis de colorant de May Grunwald
- Laisser agir 5 minutes
- Rejeter le May Grunwald
- Recouvrir le frottis de Giemsa dilué au 1/10
- Laisser agir 15 minutes
- Rincer à l'eau jusqu'à ce que la différenciation soit complète : les lames seront colorées en rose
- Laisser sécher
- Lire à l'objectif 100 à immersion

### ➤ **Résultats**

- Les polynucléaires neutrophiles sont munis de noyaux bi ou multi lobés
- Les lymphocytes sont munis de gros noyau qui occupent presque toute la cellule.

## **ANNEXE II : COLORATION DE GRAM**

### ➤ **Préparation du Frottis**

- Centrifugation (3000trs/minute pendant 5 minutes)
- Préparer un frottis avec 1 ou 2 gouttes du culot déposé sur une lame préalablement nettoyée
- Sécher la lame dans un poste de sécurité microbiologique si possible et fixer à l'alcool à 95°C

### ➤ **Coloration de Gram**

- Recouvrir le frottis avec du violet de Gentiane pendant 1 minute
- Rincer délicatement à l'eau du robinet

- Recouvrir le frottis avec du Lugol pendant 1 minute
  - Rincer délicatement à l'eau de robinet
  - Différencier à l'alcool à 95°C, 5 à 10 secondes ou à la fuschine phéniquée jusqu'à ce que le mélange n'entraîne plus de colorant
  - Colorer le fond à la Safranine diluée pendant 20 à 30 secondes
  - Rincer la lame sous le robinet et sécher au buvard.
- **Observation et interprétation : Examiner le frottis au microscope à l'objectif x100 à Immersion.**
- **Diplocoques Gram négatif :** forme Grain de café intra ou extracellulaires ; Suspicion de *N. meningitidis*.
  - **Diplocoques Gram positif :** formes lancéolées, capsulés parfois en chaînette ; Suspicion de *S. pneumoniae*.
  - **Bacilles Gram négatif :** forme de coccobacilles avec arrangement quelconque ou de petits bacilles polymorphes ; Suspicion de *H. influenzae*.

### **ANNEXE III : RECHERCHE DES ANTIGENES SOLUBLES**

Kit Pastorex Meningitis Biorad réf 61718 : Mise en évidence de *Nm A*, *Nm B/E. coli K1*, *Nm C*, *Y/W135*, *H. influenzae b*, *S. pneumoniae* (83 types) et Streptocoque du groupe B.

Bien agiter les flacons de latex avant utilisation.

Si réaction différée, stocker les échantillons à +4°C pour un délai court, ou le surnageant à -20°C pour un délai plus long.

Les suspensions de latex doivent être conservés entre +4°C et +8°C, mais jamais congelé.

➤ **Préparation du LCR**

- Chauffer le LCR 5 à 10 minutes dans l'eau bouillante
- Centrifuger le LCR 5 minutes à 3000g/minute
- Recueillir le surnageant dans un tube propre.

## ➤ Technique

- Sur une lame de verre, ou carte jetable,
- Déposer une goutte de chaque réactif du Kit Pastorex et parallèlement une goutte d'eau physiologique
- A chaque goutte, ajouter une goutte (0,5 ml) du surnageant de LCR.
- Mélanger l'ensemble à l'aide d'un bâtonnet, en prenant soin de changer de bâtonnet à chaque réactif.
- Placer la carte sur un agitateur basculant s'il en existe
- Dans le cas contraire,
- Prendre la carte jetable ou la lame de verre entre les mains et effectuer un léger mouvement de rotation dans un sens et dans l'autre pendant 1 à 2 minutes

## ➤ Interprétation :

- Réaction négative : suspension homogène
- Réaction positive : agglutination (moins de 10 minutes) ; contrôler les résultats avec les témoins positifs et négatifs du Kit.

Trois cas de réaction positive :

- Agglutination avec un seul réactif qui détermine le sérogroupe recherché ;
- Agglutination dans plusieurs réactifs différents mais pas réaction en eau physiologique : **Souche poly-agglutinable** ;
- Agglutination dans plusieurs réactifs différents et réaction en eau physiologique : **Souche auto-agglutinable**.

La réaction est non interprétable si :

- ❖ La souche est poly-agglutinable ou auto-agglutinable
- ❖ La souche agglutine avec le latex témoin négatif. Dans ce cas,
  - Retraiter l'échantillon après chauffage au bain-marie 5 minutes à 100°C
  - Noter le résultat comme précédemment.

## **ANNEXE IV : TEST DE L'OXYDASE DE KOVACS**

Le test de l'oxydase permet de mettre en évidence une cytochrome oxydase. Le chlorhydrate de tétraméthyl-p-phénylène diamine est oxydé en un composé violet par les bactéries qui possèdent le système cytochrome C dans leur chaîne respiratoire.

### **Mode opératoire**

Disques d'oxydase Biorad Réf 53832

- Imprégnier les disques de la solution d'oxalate de diméthyl paraphénylène diamine qui donne un composé violet lorsqu'il est oxydé par le système cytochrome C.
- Etaler sur un disque oxydase une colonie issue d'une culture de 18 à 24 heures de la bactérie à tester.
- L'apparition d'une couleur allant de violet à pourpre dans les 10 à 20 secondes suivantes, indique un test positif.

## **ANNEXE V : GALERIE *Api Neisseria Haemophilus (NH)***

BioMérieux Réf 10400

Vérifier l'appartenance des souches à étudier aux genres *Neisseria* (Diplocoques Gram négatif) ou aux germes *Haemophilus* (petits bacilles Gram négatif).

Ces bactéries sont ensemencées sur gélose chocolat enrichi au polyvitex puis incubées à 37°C en atmosphère enrichi au CO<sub>2</sub>.

### **➤ Préparation de l'inoculum**

- A l'aide d'un écouvillon stérile, prélever plusieurs colonies bien isolées
- Réaliser une suspension bien homogène d'opacité égale à celle de l'étalon 4 de McFarland dans du NaCl à 0,85% (fourni dans le Kit)
- La suspension doit être utilisée immédiatement après sa préparation.

➤ **Inoculation de la galerie :**

- Répartir les suspensions bactériennes dans les cupules en évitant la formation de bulles
- Remplir seulement la partie tube des 7 premiers micros tubes (PEN à URE) : 50µl
- Remplir tube et cupules des 3 derniers micro tubes (LIP/ProA, PAL/GGT, βGAL/ND) : 150µl environ
- Recouvrir les 7 premiers tests (PEN, URE) d'huile de paraffine
- Refermer la boite d'incubation
- Inoculer 2 heures à 35-37°C en atmosphère aérobie.

➤ **Lecture**

Lire les réactions spontanées et les noter + ou – sur la fiche résultats.

**NB :** Les trois derniers micros tubes sont lus en deux temps : lecture de la réaction spontanée et lecture après addition de réactif.

## **ANNEXE VI : PROCEDURE TECHNIQUE DU LABORATOIRE DE PCR**

### **1. Préparation des échantillons et témoins positifs**

#### ***1.1. PREPARATION DES ECHANTILLONS***

##### **1.1.1. Aspect macroscopique des prélèvements de LCR**

Pour chaque échantillon de LCR, noter :

- ✓ l'aspect du liquide (clair, trouble ou hématique)
- ✓ les commentaires éventuels (conditionnement, état du tube à l'arrivée...)

Ces observations sont rentrées dans la base de données « méningites » (en complément des données bactériologiques).

##### **1.1.2. Préparation et traitement des échantillons**

- ✓ Aliquer 1.5 à 2 ml du LCR dans un tube Eppendorf (Safe lock) de 2 ml.
- ✓ Après la prise de 1.5 à 2 ml d'échantillon pour l'extraction, conserver le reliquat, s'il en reste gardé entre -20°C et -40°C.

### **1.1.3. Extraction de l'ADN bactérien :**

- Mettre le tube au congélateur à -20°C ou dans la glace carbonique.
- Ranger les Safe-lock sur un portoir flottant.
- Porter le portoir flottant au bain marie bouillant pendant 5 min.
- Centrifuger à 12.000 trs/min pendant 10 min.
- Recueillir le surnageant dans un deuxième safelock de 1.5 ou 2 ml.
- L'échantillon ainsi prêt peut être testé immédiatement ou être conservé à -20°C.
- Prévoir 2 témoins qui permettent de valider la PCR : un témoin positif de chaque espèce ou sérogroupe, ou sérotypage du germe recherché et un témoin négatif.

### **1.2. PREPARATION DES TEMOINS POSITIFS**

ADN témoin positif : à partir de souche de référence cultivée sur boîte de Pétri, 16 à 24H sur gélose chocolat pour Nm et Hi et sur gélose au sang frais pour Sp :

- *Neisseria meningitidis* (Nm A)
- *Streptococcus pneumoniae*,
- *Haemophilus influenzae* sérotype b
- *Nm* sérogroupe A,
- *Nm* sérogroupe X,
- *Nm* sérogroupe W135,
- *Nm* sérogroupe B,
- *Nm* sérogroupe C,
- *Nm* sérogroupe Y.

Les souches de référence sont des souches issues de vos laboratoires ou d'un laboratoire du réseau, mais qui ont été envoyées dans un laboratoire de référence international pour caractérisation

Technique :

- Avec une ose stérile, prélever le maximum de colonies isolées de manière à constituer une suspension dense d'environ  $10^6$  cfu/ml (tube 0.5 de McFarland)
- Congeler à -20°C

- Bouillir au bain marie 5 min à 100°C. Centrifuger 10 min à 12.000 trs/min
- Décanter le surnageant et le diluer 100 fois dans de l'eau pure stérile.
- Utiliser environ 1  $\mu$ L par réaction
- Après préparation de l'ADN :
  - préparer plusieurs aliquots de 40  $\mu$ L,
  - conserver à -20°C et les utiliser au fur et à mesure.

## **2. Préparation du mélange réactionnel ou mix et ajout de l'ADN**

### **2.1. PREPARATION DU MIX**

Avant la préparation :

- Sortir du congélateur les oligos, les dNTP le tampon PCR 10x et le Chlorure de Magnésium
- Allumer et régler la lampe UV de la hotte Biocap pour 15 mn

#### **2.1.1. Préparation du pool de dNTP**

- Concentration mère de chaque dNTP :  $C_{mère} = 100 \text{ mM}$
- Concentration de chaque dNTP dans le pool :  $C_{pool} = 5 \text{ mM}$
- Soit une dilution au 1/20<sup>ème</sup>

Pour un volume final :  $V_{pool} = 1 \text{ ml}$

- Volume de chaque dNTP :  $V_{dNTP} = 50 \mu\text{l}$  soit  $4 \times 50 \mu\text{l}$
- $V_{H_2O} = 800 \mu\text{l}$
- Vortexer et centrifuger brièvement à vitesse maximale
- Le pool de dNTP est stocké à -20°C en salle mix.

#### **2.1.2. Dilution des amores**

Les amores sont diluées dans des tubes safe-lock 0,5 ml avec de l'eau qualité biologie moléculaire, à partir des solutions mères fournies par Sigma-proligo ;

**NB :** les concentrations varient en fonction des lots donc des commandes, donc faire attention lors de la dilution de regarder la concentration indiquée sur le tube d'Oligo du fournisseur.

➤ Concentration amorce diluée :  $C_{diluée} = 100 \text{ pM}/\mu\text{l}$

$$\text{- Selon la formule de base : } \frac{C(mère)}{V(amorce)} = \frac{C(diluée)}{V(final solution diluée)}$$

$$\text{- Pour chaque amorce } \rightarrow V(final) = \frac{[C(mère) \times V(amorce)]}{C(diluée)}$$

➤ Définir le volume d'amorce à prélever (ex : 10  $\mu\text{l}$ )

$$V(\text{H}_2\text{O}) = V(\text{final}) - V(\text{amorce})$$

### 2.1.3. Préparation du mix

Il est préparé à chaque lancement de PCR et utilisé aussitôt. Le volume à préparer dépend du nombre d'échantillons à tester plus les **2 témoins** positif et négatif. Le volume préparé étant trop juste, il faut rajouter le volume de 2 à 3 tubes supplémentaires.

**Un test** = 39.7  $\mu\text{l}$  de mix de travail + 0.3  $\mu\text{l}$  de Taq polymerase en microtubes (0.2 ml) soit un volume total de 40  $\mu\text{l}$  (cf. tableau ci-dessous).

Réactifs	Volume par échantillon
Eau pure stérile	Qsp 40 $\mu\text{l}$
PCR Buffer (pH 8,8) 10X	5 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	5 $\mu\text{l}$
DMSO	1 $\mu\text{l}$
dNTP 5mM (pool)	5 $\mu\text{l}$
Amorces 100 pM / $\mu\text{l}$	0,15 $\mu\text{l}$ par amorce
Taq polymérase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0,3 $\mu\text{l}$

Si on utilise 2 ou 3 paires d'amorces, réduire d'autant le volume d'eau pure stérile

Après avoir préparé et réparti les mix :

- Remettre les réactifs au congélateur

- Allumer la lampe UV du Biocap pendant 10 mn
- Refermer la salle
- Rejoindre la salle ADN pour l'ajout de l'ADN des échantillons.

**NB :** En période d'affluence de prélèvements de LCR, il est recommandé de préparer le mix stock pour une semaine de travail. Ce mix est alors conservé à -20°C.

## **2.2. ADDITION DE L'ECHANTILLON, TEMOIN POSITIF ET TEMOIN NEGATIF**

- Ajouter 10 µl d'ADN de chaque échantillon aux 40 µl du mix : Vol total = 50µL

Par série et par type de réaction PCR

- 40 µL de mix pour le témoin négatif + 10µl d'eau distillée
- Ajouter 10 µL d'ADN témoin positif aux 40 µL de mix

L'ADN témoin positif, selon la réaction, est composée de :

- *PCR multiplex espèce* : mélange ADN *Nm-Sp-Hib*
- *PCR Nm sérogroupe* : mélange ADN *Nm A, X, W135* ou ADN *Nm B, C, Y*
- *PCR sérotype Hib* : ADN *Hib*
- Pour chaque *PCR simplex de confirmation*: ADN de l'espèce ou du sérogroupe testé.

## **2.3. DILUTION DES OLIGO AMORCES A 100pm / µl**

Primers à 100pM/µl chacun (cf. calcul de dilution ci dessous). Pour les calculs de dilution, appliquer la formule  $C_1V_1 = C_2V_2$  où :

- $C_1$  = concentration de l'oligo qui est connu (écrit sur l'étiquette)
- $V_1$  = 1µl du volume de l'oligo à diluer (de concentration connue)
- $C_2$  = concentration finale c'est à dire 100 pmol/µl
- $V_2$  = le volume d'eau distillée à calculer pour avoir 100pmol/µl ( $V_2$  est inconnu)

$$\text{Donc } V_2 = C_1V_1/C_2$$

### 3. Amplification et détection des produits de PCR

#### 3.1. AMPLIFICATION

**IMPORTANT :** Vérifier que les tubes PCR sont correctement fermés. En effet, si les bouchons ne sont pas correctement enfoncés, il y a risque d'évaporation des amplicons et par conséquent contamination du thermocycleur.

Vortexer et centrifuger brièvement à vitesse maximale avant de placer les tubes dans l'appareil.

L'amplification des différents gènes se fait selon les programmes ci-dessous en accord avec les températures d'annealing des amores des différents gènes à amplifier :

Méningo (gène <i>crgA</i> )	58°C
Sérogroupes Nm (mynB, siaD, <i>Xcba</i> )	58°C
Pneumocoque (gène <i>lytA</i> )	58°C
Haemophilus influenzae (gène <i>bexA</i> )	58°C
Sérototype b influenzae (cap)	51°C

➤ PCR détermination de l'espèce (multiplex ou simplex de confirmation de l'espèce)

Phase Dénaturation	Cycle d'Amplification		Phase d'Extension finale
1 x 3 min à 94°C	35 x	40 s à 92°C	1 x 10 min à 72°C
		30 s à 58°C	
		30 s à 72°C	

➤ PCR sérogrupe *N. meningitidis* et sérototype *H. influenza* (multiplex ou simplex)

Phase Dénaturation	Cycle d'Amplification		Phase d'Extension finale
1 x 3 min à 94°C	35 x	40 s à 92°C	1 x 10 min à 72°C
		30 s à 51°C	
		30 s à 72°C	

**IMPORTANT:** A la fin du cycle, centrifuger au moins 10s les produits de PCR pour faire retomber les aérosols.

Les amplicons ne doivent en aucun cas retourner dans les autres salles PCR

### **3.2. ELECTROPHORESE ET DETECTION**

#### **3.2.1. Electrophorèse**

**Remarque :** Après quelques jours de conservation, des cristaux se forment dans les puits des gels. Avant le dépôt des échantillons, éliminer les cristaux par lavage des puits au TBE 1X à l'aide d'une micropipette 1000 µL

Technique :

- Centrifuger les tubes PCR au moins 10s avant de les ouvrir
- Ajouter **10 µL** de tampon de charge dans chaque tube d'échantillon
- Placer les tubes sur un portoir flottant
- Chauffer **3 min** au bain marie à **65°C** (séparation des brins ADN)
- Placer le gel dans une cuve contenant du tampon **TBE 1X**
- Déposer **2,5 µL** de marqueur de poids moléculaire dans le **1<sup>er</sup>** puits
- Déposer **10 µL** de témoin négatif et **10 µL** de témoin positif PCR successivement dans le **2<sup>ème</sup>** et **3<sup>ème</sup>** puits.
- Déposer **10 µL** de chaque tube PCR contenant les échantillons dans les puits suivants
- Fermer la cuve et brancher au générateur réglé sur 120 Volt
- Laisser migrer pendant 30 min à 45 min.

#### **3.2.2. Détection et interprétation**

- Déposer le gel sur le plateau du trans-illuminateur UV (mettre des gants !)
- Allumer le trans-illuminateur, le bouton noir sur 70% (la lecture s'effectue à 70% de rayonnement UV)
- Rincer, si nécessaire, le gel dans l'eau distillée pendant 15 min afin de faire disparaître le surplus de bleu du tampon de charge
- Prendre la photo en réglant le trans-illuminateur sur 100% de rayonnement UV
- Vérifier le témoin négatif
- et le témoin positif avec le marqueur de poids moléculaire
- Interpréter les résultats en comparant la taille des bandes des échantillons avec le marqueur de poids moléculaire.