

**Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique.**

République du Mali
Un Peuple—Un But—Une Foi



Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie (FMPOS)

Année Universitaire 2009- 2010

Thèse N°/P

TITRE

**FREQUENCE D'ISOLEMENT DE Hib AU LABORATOIRE
DU CHU GABRIEL TOURE AVANT ET APRES
L'INTRODUCTION DU VACCIN PENTAVALENT DANS LE
PEV.**

THESE

présentée et soutenue publiquement le **12/12/ 2009** devant la Faculté de Médecine, de
Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie (F.M.P.O.S.)
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'Etat)

par
M. KY Blaise Pascal

JURY

Président

Professeur Soukalo DAO

Juges

Docteur Nouhoum KONE

Docteur Broulaye TRAORE

Co- directeur de thèse

Docteur Souleymane DIALLO

Directeur de thèse

Professeur Flabou BOUGOUDOGO

Je dédie ce travail

- A mon créateur, Dieu le Tout Puissant

Père très haut «...que ta volonté soit faite sur la terre comme au ciel... »

Tu as voulu que je sois pharmacien rien n'a pu l'empêcher !

Aujourd'hui encore et demain, je laisse entre tes mains ma vie et ma carrière.

«...Epargne mes pensées, ma bouche, et mes mains de tout ce qui peut faire mal à la créature... »

«... Fais que je sois modéré dans tout..., mais insatiable de connaissances qui peuvent soulager ton peuple... »

«... Donne moi la force et le courage de résister à tout ce qui peut sur mon chemin me dévier de mon serment... », car c'est à toi qu'appartiennent le règne, la puissance et la gloire pour les siècles des siècles.

Amen !

- A feu mon grand- père Pierre D KY

Très cher grand-père qui m'a appris à être humaniste et à accepter les gens tels qu'ils sont, tu nous a montré le chemin de l'honneur, du respect de soi même et d'autrui. Ta rigueur dans l'éducation a toujours guidé nos pas. Tu nous a toujours appris que le salut d'une personne réside dans son travail bien fait, dans son honnêteté. Que ton âme repose en paix.

- A feu ma grand- mère Catherine GOLANE

Très chère grand-mère, qui m'a prouvé qu'une mère n'est pas seulement celle qui met au monde un enfant. J'aurai aimé que tu sois là aujourd'hui pour apprécier et jouir de tes efforts mais hélas ! Je ne cesserai jamais de te remercier pour ta sagesse, ton honnêteté et ta grande générosité. Ce travail est également le fruit de ton encouragement et de tes nombreuses prières et bénédictions. Ton dévouement et ton soutien efficace de tous les jours ont permis d'atteindre notre objectif. Puisse le bon Dieu t'accueillir dans son paradis.

- A mon père Laurent KY

Vous qui m'avez toujours supporté et soutenu, sachez que ce travail est également le vôtre et veuillez recevoir cher père, vous ainsi que votre famille, toute ma reconnaissance.

- A mon père Jean de Dieu KY

Ton amour, tes encouragements constants ainsi que tes prières et bénédictions ne m'ont jamais fait défaut. Ce travail est le modeste témoignage de toute mon affection et de mon profond respect. Que Dieu le tout puissant te garde encore très longtemps auprès de nous.

Amen!

- A ma mère Doussou KANTE

Les mots me manquent vraiment pour te témoigner toute ma reconnaissance. Tout simplement merci pour tout ce que tu as fait pour moi pendant toutes ces années.

- A ma mère Henriette FOROT

Vos prières et bénédictions m'ont toujours accompagné tout au long de mon évolution. Que l'Eternel vous garde encore longtemps auprès de nous, vos enfants et que vous puissiez profiter du fruit de nos efforts qui sont en réalité les vôtres. Trouvez dans ce modeste travail la récompense de vos nombreux sacrifices.

- A ma mère Masseta DOUANTE

Je n'ai pas grandi auprès de toi, mais tous nos moments de rencontre m'ont toujours permis de me rendre compte de l'immense espoir que tu places en moi. C'est cela associé à toutes tes prières qui m'ont permis de progresser. Je souhaite que ce travail annonce l'apogée de toutes les souffrances que tu endures pour tous tes enfants.

- A mes frères et sœurs

La fraternité n'a pas de prix dit-on. J'espère qu'elle restera toujours un lien sacré entre nous. Trouvez tous ici l'expression de mon fraternel amour. Ce travail est le vôtre.

- A mon pays le Mali

Par ce travail, j'espère apporter ma pierre à ta reconstruction et à ta prospérité !

- A mon village Kolongo-Tomo

Je remercie le tout puissant **ALLAH** de m'avoir donné la chance de réaliser ce travail.

Mes remerciements vont également :

- A mes tantes paternelles et maternelles

Vous avez toujours fait preuve de bonne volonté et d'une grande affection dont un neveu peut vouloir. Vos bénédictions ne m'ont jamais fait défaut. Trouvez ici l'expression de mes meilleurs souvenirs et de ma reconnaissance à votre égard.

-A mes tontons paternels et maternels

Merci pour vos multiples encouragements.

- A mes cousins et cousines

Je ne saurais oublier ce lien d'amitié de fraternité et de grande complicité qui nous unit.

Le fait de vous avoir été une source d'inspiration pour moi et je considère cela comme une chance énorme. Votre soutien inconditionnel m'a accompagné tout au long de ce travail. Je ne peux que vous rassurer que je serai toujours là pour vous. Je vous souhaite plein succès dans tout ce que vous entreprendrez, et courage pour le reste du trajet si épineux. Je suis fier de vous. Que Dieu consolide cette cohésion entre nous.

- A mes amis

Comme on a l'habitude de le dire: c'est dans les moments difficiles qu'on reconnaît ses vrais amis. Sachez qu'en aucun instant je n'ai regretté votre compagnie. Merci pour votre affection et pour votre sincère fidélité.

Que Dieu renforce d'avantage ce lien si sacré qui nous unit.

- A mes camarades de promotion de la FMPOS

Ensemble on a su regrouper nos forces afin de s'aider mutuellement pour franchir les différents obstacles de la vie estudiantine.

Je vous dis encore merci pour votre courage et votre persévérance et surtout pour vos soutiens dans les peines partagées.

- A mes aînés du laboratoire du CHU Gabriel Touré

Drs Aliou Touré, Mariam Samaké, Ténin Samaké, Nia Kadidia Samaké, Cheick Fanta Mady Diabaté, Modibo Sadessi, Makandjan Dembélé, Hamadoun Cissé dit Alphady, Samba A Sangaré, Modibo Konaté, Boubacar O Cissé, Abdoul Aziz Maïga et j'en passe.

Vous avez tous contribué à la belle réalisation de ce travail et merci sincèrement pour tout.

- A tout le personnel du CHU Gabriel Touré, principalement celui du laboratoire.

Merci pour vos encouragements et vos soutiens inconditionnels.

- A mes condisciples : Fatoumata Daou, Mariam Koné, youssouf Timbiné, Ousmane Madani Traoré, Mohamed Sarmoye Traoré.

La complicité partagée durant ces moments me rassure que nous ne serons pas seulement collègues, mais aussi frères. Ce travail porte également vos empreintes.

- A l'équipe du CVD-Baltimore

- Je remercie tous ceux ou celles qui ont cru en moi, qui m'ont aidé de près ou de loin, qu'ils soient vivants ou morts.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DU JURY

Professeur Sounkalo DAO

- **Maître de Conférences à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie (FMPOS)**
- **Président de la Société Malienne de Pathologie infectieuse (SOMAPiT)**
- **Membre de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue française (SPILF)**
- **Investigateur Clinique au CeReFo sur la tuberculose /VIH**

Cher maître vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos multiples occupations. Votre simplicité et votre modestie font de vous un homme admirable. Dès nos premiers pas dans cette Faculté nous avons été impressionnés par votre sens élevé de la personnalité humaine. Votre disponibilité, votre rigueur dans le travail et vos qualités d'homme de science, de culture, de chercheur aguerri font de vous un exemple à suivre.

Veillez accepter cher Maître, nos sentiments d'estime et de profond respect.

A NOTRE MAÎTRE ET JUGE

Docteur Nouhoum KONE

- **Médecin en santé publique**
- **Membre de l'équipe régionale de plaidoyer sur le modèle AIM sur le VIH/SIDA dans la région de Ségou**
- **Directeur du Centre National d'Immunisation (CNI)**

Honorable Maître, c'est un grand plaisir pour nous de vous compter parmi les membres de ce jury.

Votre disponibilité et votre grande simplicité ont toujours un grand apport pour la nouvelle génération.

Veillez accepter cher Maître, nos sentiments d'estime et de profond respect.

A NOTRE MAÎTRE ET JUGE

Docteur Broulaye TRAORE

- **Chef de service de la pédiatrie du CHU Gabriel TOURE**
- **Président de l'Association Malienne de lutte contre les Déficiences Mentales chez l'Enfant (AMALDEME)**
- **Chargé des cours de pédiatrie à l'Institut National de Formation en Sciences de la Santé de Bamako (INFSS)**

Cher Maître, vous nous avez fait un grand honneur en jugeant ce travail.

Homme aux qualités scientifiques importantes, nous avons été séduits par la simplicité, la clarté et la rigueur de vos enseignements.

En plus de vos connaissances scientifiques, votre sens social de la vie mérite le respect.

A NOTRE MAITRE ET CO- DIRECTEUR DE THESE

Docteur Souleymane DIALLO

- **Pharmacien Biologiste, Colonel des forces armées du Mali**
- **Chef de service du laboratoire d'Analyses Médicales du CHU Gabriel Touré**
- **Maître Assistant en Bactériologie et Virologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie**

Cher Maître, nous ne cesserons jamais de vous remercier pour la confiance que vous avez placée en nous pour effectuer ce travail. Les mots me manquent pour vous exprimer combien cela fut un plaisir de travailler avec vous. Je peux d'ailleurs affirmer que j'ai fait mes premières initiations dans le monde de la microbiologie à vos côtés. Votre simplicité, votre compétence et surtout votre rigueur scientifique sont des atouts qui nous ont fasciné et dont nous avons bénéficié tout au long de notre formation. Vous n'avez ménagé aucun effort pour la belle réalisation de ce travail qui, également, est le vôtre.

Cher Maître, trouvez ici l'expression de notre profonde gratitude et de nos sincères reconnaissances.

A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE

Professeur Flabou BOUGOUDOGO

- **Maître de conférence agrégé en Bactériologie et Virologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie**
- **Directeur Général de l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP)**
- **Responsable des cours de Bactériologie et Virologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie**
- **Chevalier de l'Ordre du Mérite de la Santé**

Cher Maître, vous nous avez fait honneur en acceptant la réalisation de cette thèse dans le service de laboratoire d'Analyses Médicales du CHU Gabriel Touré. En plus de statut de chercheur confirmé et aguerri, nous avons vite apprécié vos immenses qualités humaines et scientifiques. Vos remarques et suggestions ont sans doute contribué à l'amélioration de ce travail.

Votre simplicité et votre disponibilité font de vous un maître respecté et admiré de tous.

Soyez assuré, cher maître, de notre sincère admiration et de notre profonde gratitude. Nous vous réitérons tous nos remerciements.

PLAN

1. Introduction

2. Généralités sur *Haemophilus influenzae* type b

3. Méthodologie

4. Résultats

5. Commentaires et Discussions

6. Conclusion

7. Annexes

8. Références bibliographiques

Table des matières

1. Introduction et Objectifs.....	1
2. Généralités sur Haemophilus influenzae type b	3
2.1. Définition.....	3
2.2. Historique.....	3
2.3. Habitat.....	4
2.4. Réservoir et transmission de la maladie.....	5
2.5. Taxonomie et Nomenclature.....	5
2.6. Caractères bactériologiques.....	7
2.7. Caractères antigéniques.....	15
2.8. Caractères biochimiques	18
2.9. Sensibilité et résistance aux antibiotiques	21
2.10. Epidémiologie	22
2.11. Physiopathologie.....	25
2.12. Manifestations cliniques.....	28
2.13. Diagnostic microbiologique	29
2.14. Traitement	30
2.15. Prophylaxie	31
3. Méthodologie.....	36
3.1. Cadre d'étude	36
3.2. Etude.....	37
3.3. Méthode de traitement et d'analyse des données.....	38
3.4. Aspect éthique de l'étude.....	38
3.5. Réception des prélèvements au Laboratoire.....	39
3.6. Hémocultures.....	40
3.7. LCR.....	47
3.8. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries.....	50

3.9. Test de Sensibilité des antibiotiques : Méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon Kirby- Bauer.....	57
3.10. Conservation des cultures pures.....	58
4. Résultats.....	60
4.1. Données concernant les hémocultures.....	61
4.2. Données concernant les LCR.....	76
5. Commentaires et discussions	91
5.1. Du point de vue de la méthodologie.....	91
5.1. Du point de vue des résultats.....	92
6. Conclusion et recommandations.....	96
6.1. Conclusion.....	96
6.2. Recommandations.....	96
7. Références.....	97
8. Annexes.....	100
8.1. Annexe I	100
8.2. Annexe II	100
8.3. Annexe III.....	101

Abréviations et Sigles

ATCC: American Type Culture Collection

B : Acte de Biologie

βGAL : Bêta- Galactosidase

BGP : Bacille Gram Positif

BGN : Bacille Gram Négatif

CGPch : Cocci Gram Positif en chaînette

CGPgr : Cocci Gram Positif en grappe

CGPpr : Cocci Gram Positif en paire

CIE : Contre- Immuno- Electrophorèse

CoccoBGN : Cocco Bacille Gram Négatif

CVD : Centre pour le Développement des Vaccins

DCGN : Diplocoque Gram Négatif

Hib : *Haemophilus influenzae* type b

INRSP : Institut National de Recherche en Santé Publique

MPE = OMP : Membrane de Protéine Externe

NCTC: National Collection of Type Culture

TSA: "Trypticase Soja Agar"

PEV : Programme Elargi de Vaccination

PRP : PolyRibosyl- Ribitol Phosphate

PRP- D : PolyRibosyl- Ribitol Phosphate couplé à l'anatoxine Diphtérique

PRP- HbOC : PolyRibosyl- Ribitol Phosphate couplé à une toxine diphtérique mutante non toxique.

PRP- OMP : PolyRibosyl- Ribitol Phosphate couplé à une Protéine de la Membrane Externe du méningocoque B.

PRP- T : PolyRibosyl- Ribitol Phosphate couplé à l'anatoxine Tétanique

Liste des figures

Figure 1: Coloration de Gram d'un LCR positif à *Haemophilus influenzae*.

Figure 2: Coloration de Gram d'hémoculture positive à *Haemophilus influenzae*.

Figure 3: Test des facteurs de croissance pour Hib sur gélose Muller Hinton.

Figure 4: Aspect des Colonies de *Haemophilus influenzae* type b sur gélose au sang.

Figure 5: Aspect des colonies de *Haemophilus influenzae* sur gélose chocolat.

Figure 6: Modèle d'invasivité de *Haemophilus influenzae* type b, modifications structurelles de bactérie (capsule, pili, fibrilles) en fonction de sa localisation.

Figure 7: Physiopathologie des infections à *Haemophilus influenzae*.

Figure 8: BACTEC® 9050.

Figure 9: Le flacon BD Bactec™ PEDS PLUS /F.

Figure 10: Galerie pour l'identification des entérobactéries et autres BGN.

Figure 11: Représentation graphique des fréquences d'isolement annuelles de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures.

Figure 12: Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2003.

Figure 13: Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2004.

Figure 14: Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2005.

Figure 15: Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2006.

Figure 16: Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2007.

Figure 17: Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2008.

Figure 18: Représentation graphique des fréquences d'isolement annuelles de l'*Haemophilus influenzae* et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR.

Figure 19: Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2003.

Figure 20: Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2004.

Figure 21: Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2005.

Figure 22: Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2006.

Figure 23: Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2007.

Figure 24: Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2008.

Liste des tableaux

Tableau I: Facteurs de croissance et caractères biochimiques des *Haemophilus*.

Tableau II: Biotypes de *Haemophilus influenzae*.

Tableau III: Caractères biochimiques des *Haemophilus influenzae* chez l'Homme.

Tableau IV: Portage oropharyngé et pathogénicité de *Haemophilus influenzae*.

Tableau V: Résultat global des hémocultures de 2003 à 2008.

Tableau VI: Fréquences d'isolement de Hib dans les hémocultures avant et après l'introduction du pentavalent dans le PEV

Tableau VII : Evolution de l'isolement de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures selon les années de l'étude.

Tableau VIII: Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2003.

Tableau IX: Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* les hémocultures. Cas de 2004.

Tableau X: Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2005.

Tableau XI: Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2006.

Tableau XII: Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2007.

Tableau XIII: Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2008.

Tableau XIV: Résultat des LCR de 2003 à 2008.

Tableau XV: Fréquences d'isolement de Hib dans les LCR avant et après l'introduction du pentavalent dans le PEV. Tableau XVI : Fréquences

d'isolement de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR selon les années de l'étude.

Tableau XVII: Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2003.

Tableau XVIII: Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2004.

Tableau XIX: Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2005.

Tableau XX: Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2006.

Tableau XXI: Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2007.

Tableau XXII: Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2008.

1. Introduction et Objectifs

La triade constituée par *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b (Hib) et *Streptococcus pneumoniae*, représente la principale cause des méningites purulentes chez l'enfant. [1]

Ces pathogènes sont responsables d'infections invasives comme les septicémies, les pneumonies, les méningites, les otites et autres avec une morbidité et une mortalité importantes chez l'enfant de moins de 5ans en Afrique. [2]

Haemophilus influenzae type b, ou Hib, est une bactérie responsable, selon les estimations, de quelque 3 millions de cas de maladies graves et d'environ 386 000 décès par an, principalement dus à des méningites et à des pneumonies. Les victimes sont presque toutes des enfants de moins de cinq ans, les nourrissons âgés de 4 à 18 mois étant particulièrement vulnérables. Dans les pays en développement, où se produisent la grande majorité des décès dus à Hib, la pneumonie est responsable d'un plus grand nombre de décès que la méningite. Toutefois, la méningite à Hib constitue également un problème grave dans ces pays, où son taux de mortalité est considérablement plus élevé que celui observé dans les pays développés ; elle laisse 15 à 35 % des enfants qui lui survivent avec des incapacités permanentes telles que l'arriération mentale ou la surdité. [3]

La fréquence et la gravité des méningites à *Haemophilus influenzae* type b chez l'enfant justifient l'usage d'un vaccin, composé de la fraction polysaccharidique du Hib (PRP : Polyribosyl-Ribitol Phosphate) conjugué à l'anatoxine tétanique, utilisé depuis 1993 en France. [4]

Au Mali l'étude du Centre pour le Développement des Vaccins (CVD- Mali) menée dans le service de pédiatrie de l'hôpital Gabriel Touré entre 2002 et 2003 a estimé le taux d'incidence des infections à *Haemophilus influenzae* type b à 158,4 pour 100 000 chez les enfants de moins de 1 an à Bamako et un taux de létalité de 10 %. [5]

Ainsi, ce centre a mis en place une étude de surveillance des Suspensions d'Infections Bactériennes Invasives (SIBI) en milieu pédiatrique, en collaboration avec le "Center for Vaccine Development" de l'Université de Maryland- Baltimore aux USA.

Les résultats de cette étude du CVD-Mali sont une contribution à l'estimation des méningites à *Haemophilus influenzae* type b (Hib) et ont contribué aux arguments pour plaider en faveur de l'introduction de la vaccination anti- Hib comme neuvième vaccin dans le Programme Elargi de Vaccination (PEV) au Mali en 2005.

Cette thèse rapporte les résultats des examens bactériologiques effectués au laboratoire de bactériologie CVD à l'Hôpital Gabriel Touré où le diagnostic bactériologique est confirmé par la mise en évidence du Hib.

Objectif principal

Etudier la fréquence d'isolement de *Haemophilus influenzae* type b au laboratoire du CHU Gabriel Touré avant et après l'introduction du vaccin pentavalent.

Objectifs secondaires

1. Déterminer les fréquences d'isolement de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* avant l'introduction du vaccin.
2. Déterminer les fréquences d'isolement de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* après l'introduction du vaccin.
3. Comparer les fréquences d'isolement de l'*Haemophilus influenzae* type b à celles de *Streptococcus pneumoniae* avant et après l'introduction du vaccin.
4. Déterminer la saisonnalité de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae*.

2. Généralités sur *Haemophilus influenzae* type b

2.1. Définition

Le genre *Haemophilus* appartient à la famille des Pasteurellaceae, bacille à Gram- négatif, aéro- anaérobie facultatif. *Haemophilus influenzae* est l'espèce type du genre qui comporte plus de 20 espèces d'origines animale et humaine dont quelques unes seulement sont pathogènes pour l'homme. [8]

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

- le facteur X : c'est l'hémine, coenzyme de nombreux enzymes de la chaîne respiratoire (cytochromes, catalases, peroxydases) ;
- le facteur V : NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) qui entre dans la composition de nombreux déshydrogénases. [9]

2.2 Historique

Haemophilus influenzae a été isolé pour la première fois par Koch en 1883, quand il décrivait de petits bacilles dans le pus des patients ayant une conjonctivite. Jusqu'en 1933, date de la découverte du virus de la grippe, *Haemophilus influenzae* était considéré comme l'agent étiologique de la grippe, en raison de l'observation par Pfeiffer de bacilles dans les crachats de sujets atteints de la grippe, lors de la pandémie de 1889 à 1892. [10]

En effet Pfeiffer, bactériologiste allemand, isola du nasopharynx de la plupart des malades, un petit bacille à gram négatif, capsulé. Devant la fréquence de ce genre chez les malades, par rapport à celle observée chez les sujets bien portants, Pfeiffer pensa que cette bactérie était l'agent responsable de la grippe. Cependant on s'aperçut assez rapidement qu'il existait un taux de portage élevé chez les sujets normaux et surtout que cette bactérie était responsable d'autres infections telles que les méningites purulentes ou des pneumonies.

Le nom du genre *Haemophilus* a été proposé en 1917, en raison de l'exigence de la culture sur milieux enrichis en sang. L'épidémie meurtrière de 1918, qui fit

des millions de morts («grippe espagnole»), semblait confirmer l'hypothèse de Pfeiffer. Cependant la découverte du virus de la grippe humaine relégua le bacille de Pfeiffer (*Haemophilus influenzae*) à son côté d'agent de surinfection pulmonaire aggravant l'infection virale. [11]

En 1930, Pittman a établi la classification des souches encapsulées en 6 sérotypes de a à f et a montré que les souches capsulées de type b étaient responsables de la majorité des infections invasives, essentiellement chez le nourrisson. Smith et collaborateurs en 1933 ont établi que la grippe a été provoquée par un virus, et *Haemophilus influenzae* n'était qu'une cause d'infection secondaire. [12]

Le développement des vaccins anti- *Haemophilus influenzae* type b (Hib), a permis d'assister, au cours de la dernière décennie, à une diminution franche de l'incidence des formes invasives d'infections à *Haemophilus influenzae*. [11]

2.3. Habitat

Les espèces du genre *Haemophilus* ont besoin de facteurs de croissance: ce sont des parasites obligatoires qui font partie de la flore des voies aériennes supérieures de l'homme. La présence de souches non capsulées de *Haemophilus influenzae* y est habituelle. [14]

Haemophilus influenzae est un commensal des voies respiratoires supérieures. Ainsi 50 % des enfants sont porteurs de cette bactérie dans leur naso- pharynx. [9]

Au niveau des voies respiratoires supérieures, les *Haemophilus* représentent 11% de la flore pharyngée d'un adulte normal, l'espèce dominante étant *Haemophilus parainfluenzae*. Au contraire, *Haemophilus influenzae* est plus fréquent chez l'enfant. Le portage de *Haemophilus influenzae* concerne 75 % des jeunes enfants et 35 % des adultes et des enfants plus âgés. Il existe de grandes variations dans la colonisation pharyngée par les souches capsulées de type b. Dans une population normale, les souches capsulées sont rencontrées chez

moins de 5 % des enfants (la moitié des souches étant de type b). Chez l'adulte le portage des formes capsulées est habituellement inférieur à 0,50 %. Chez les enfants vivant en collectivité, orphelinat, crèche ou enfants vivant dans une même famille, le portage du type b peut dépasser les 50 % lorsqu'un cas de manifestation invasive (méningite, épiglottite) se déclare. La durée de la colonisation est variable. *Haemophilus influenzae* est plus rarement rencontré au niveau de la muqueuse buccale, de la salive et de la surface de la muqueuse vaginale. [1]

2.4. Réservoir et transmission de la maladie

Les hommes (porteurs asymptomatiques) sont les seuls réservoirs connus. *Haemophilus influenzae* ne survit pas dans l'environnement sur les surfaces inanimées. Le mode primaire de transmission se fait vraisemblablement à partir de la diffusion de gouttelettes de salive, bien que l'évidence ferme de ce mécanisme manque. [12]

2.5. Taxonomie et Nomenclature

Le classement des différentes espèces de *Haemophilus* repose sur les exigences en facteurs de croissance et sur des caractères biochimiques (tableau I). *Haemophilus influenzae* appartient à la famille des Pasteurellaceae avec le genre *Pasteurella* et *Actinobacillus* (Classification of Bergey's manuel of systematic bacteriology de 1984). [8]. Parmi les espèces, trois exigent les facteurs X et V (*Haemophilus influenzae*, *Haemophilus aegyptius* et *Haemophilus haemolyticus*), deux exigent le facteur X (*Haemophilus haemoglobinophilus* et *Haemophilus ducreyi*) et 10 n'exigent que le facteur V (*Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus parahaemolyticus*, *Haemophilus paraphrohaemolyticus*, *Haemophilus pleuropneumoniae*, *Haemophilus paracuniculus*, *Haemophilus paraphrophilus*, *Haemophilus segnis*, *Haemophilus parasuis*, *Haemophilus paragallinarum*, *Haemophilus avium*). *Haemophilus aphrophilus* présente une exigence variable en facteur X. [13]

Tableau I : Facteurs de croissance et caractères biochimiques des *Haemophilus*.
[15]

Facteurs et Caractères Souches de Haemophilus	Besoin en facteur X	Besoin en facteur V	Oxydase	Catalase	Uréase	Indole
<i>H. influenzae</i>	+	+	+	+	(+)	(+)
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	+	(+)	V
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	+	V	(-)	
<i>H. paraphrophilus</i>	-	+	+	-	-	-
<i>H. segnis</i>	-	+	-	-	-	-
<i>H. aphrophilus</i>	+	-	-	+	-	-
<i>H. haemoglobinophilus</i>	+	-	+	(+)	-	+
<i>H. ducreyi</i>	+	-	-	-	-	-

+ ou - : caractère positif ou négatif chez toutes les souches,

(+) ou (-) : caractère positif ou négatif chez la majorité des souches,

V : caractère variable

2.6. Caractères bactériologiques

2.6.1. Caractères morphologiques et structuraux

Haemophilus influenzae est un petit bacille (0,3 à 0,4 µm de diamètre et 1,5 µm de long), très polymorphe, souvent coccobacillaire, immobile, non sporulé et parfois capsulé. *Haemophilus influenzae* est un bacille à Gram- négatif (cf. figure 1 et 2). [10]

Les bâtonnets sont le plus souvent groupés parallèlement en petits amas comparables à des bancs de poissons suivant le fil de l'eau. Ce groupement est assez caractéristique. [13]

Il convient donc de souligner le polymorphisme, qui lors de l'observation d'une préparation microscopique peut rendre perplexe un observateur non averti. Ce polymorphisme a tendance à s'accroître dans une culture âgée; il existe aussi dans les produits pathologiques comme le Liquide Céphalo- Rachidien (LCR). [1]

Il peut prendre un aspect plus long, filamenteux, et certaines souches présentent des pili ou fimbriae qui confèrent à la bactérie des propriétés d'adhérence aux cellules épithéliales et l'agglutination des hématies humaines. [10]

En microscopie électronique, la paroi de *Haemophilus influenzae* est formée de trois couches denses et présente la structure typique des bacilles à Gram négatif. [1]

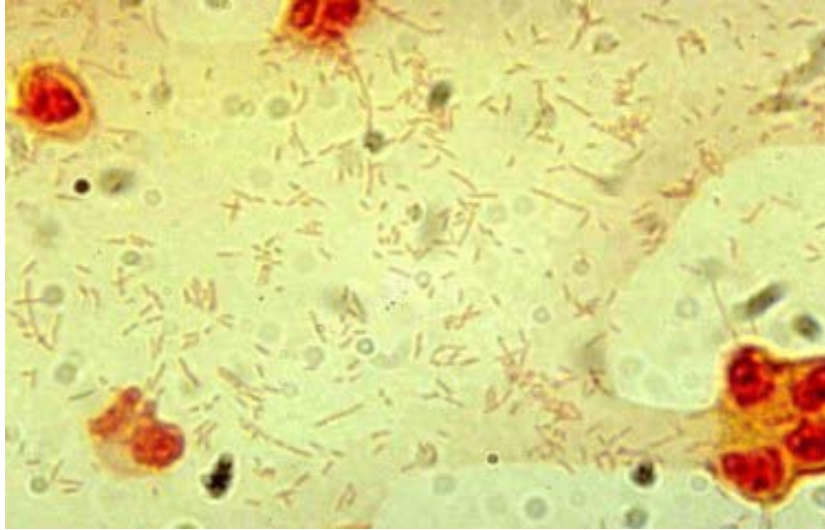


Figure 1: Coloration de Gram d'un LCR positif à *Haemophilus influenzae* . [16]

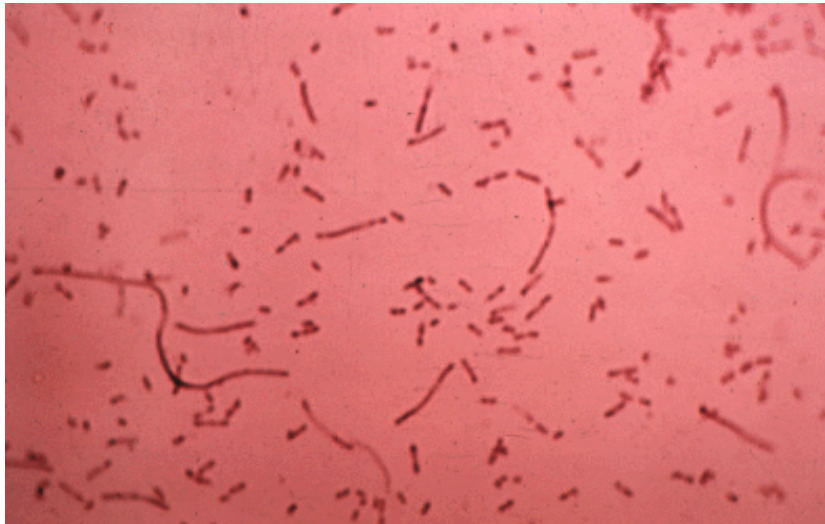


Figure 2 : Coloration de Gram d'une hémoculture positive à *Haemophilus influenzae*. [17]

Nous pouvons observer sur ces figures des bacilles Gram- négatif minces tantôt courts, tantôt longs.

2.6.2. Caractères culturels

L'*Haemophilus influenzae* est un germe aéro- anaérobie facultatif possédant une nitrate réductase. [8]

Il pousse sur les milieux de culture entre 27 °C et 43 °C, optimum 37 °C ; pH de 6,2 à 7,6, optimum 7,0 mais ne pousse pas sur les milieux de culture ordinaires. [13]

C'est un germe exigeant, ne poussant que sur les milieux de culture enrichis en sang cuit apportant deux facteurs de croissance: l'hémine (facteur X) et le NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide ou facteur V). Cette double exigence permet de distinguer *Haemophilus influenzae* d'autres espèces notamment *Haemophilus parainfluenzae* ne nécessitant que le NAD (cf. figure 3).

La croissance de ces bactéries est favorisée par une atmosphère enrichie en CO₂. Après 24 heures de culture à 37 °C, *Haemophilus influenzae* donne des colonies smooth, convexes, grisâtres, translucides de 0,5 à 1 mm. Les souches capsulées donnent des colonies mucoïdes de plus grosses tailles, iridescentes en transillumination oblique. [8]

Notons que le bacille de Pfeiffer ne produit pas d'hémolyse. *Haemophilus influenzae* peut être conservé en bouillon d'extrait globulaire en dix jours. Ce délai est dépassé dans le bouillon d'extrait de foie. [13]

2.6.2.1. Facteurs de croissance

L'appartenance au genre *Haemophilus* («qui aime le sang») repose sur l'exigence en facteurs de croissance X et V, apportés par les globules rouges et d'autres composés présents dans les milieux de base complexe utilisés actuellement (acide pantothénique, thiamine, uracile, cystéine...) qui sont indispensables à *Haemophilus influenzae*.

2.6.2.1.1. Facteur V

C'est le NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) ou le NADP (NAD phosphate). Il n'est pas immédiatement disponible en raison de sa localisation intraglobulaire et de sa présence dans le sang de nombreuses espèces d'une enzyme hydrolytique (NADase). Il est aussi présent dans les tissus de différents organismes vivants (plantes et animaux), il est synthétisé par la plupart des espèces bactériennes. Le NAD est thermolabile, inactivé par chauffage à 120 °C au bout de 30 minutes. Ce composé existe sous formes purifiée et cristallisée. Les besoins en facteur V dans les milieux de culture sont de 0,5 à 1 mg/l pour *Haemophilus influenzae*, de 1 à 5 mg/l pour *Haemophilus parainfluenzae*. Certaines souches demandent une concentration optimale supérieure (25 mg/l).

2.6.2.1.2. Facteur X

C'est l'hémine qui entre dans la composition des enzymes de la chaîne respiratoire contenant du fer, cytochrome, cytochrome oxydase, catalase, peroxydase. Ce composé diffuse à travers les globules rouges intacts. Il est disponible à partir du sang frais. Thermostable, il est libéré des globules rouges après chauffage. Les besoins en hémine cristallisée et incorporée dans les milieux de culture, sont de 0,1 à 10 mg pour *Haemophilus influenzae*. En anaérobiose, les besoins en facteur X du Hib sont considérablement réduits, les enzymes respiratoires étant devenues inutiles. Les bactéries exigeantes en facteur X ne possèdent pas les enzymes de la chaîne permettant la transformation de l'acide delta- aminolevulinique en protoporphyrine. En présence de fer, la protoporphyrine peut remplacer l'hémine comme facteur de croissance pour la majorité des souches X- dépendantes. [1]

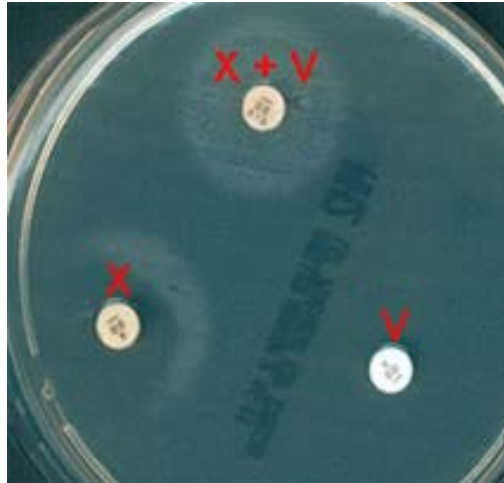


Figure 3 : Test des facteurs de croissance pour Hib sur gélose Muller Hinton.
[18]

Nous pouvons observer une croissance du Hib autour du disque de facteurs de croissance V+X

2.6.2.2. Milieux de culture

Haemophilus influenzae ne pousse que sur des milieux contenant du sang. Il est nécessaire d'utiliser des géloses au sang cuit pour inactiver les enzymes hydrolysant le facteur V. Mais le chauffage de la gélose ne doit pas être excessif pour éviter de dénaturer le facteur V. L'exigence en NAD peut également être recherchée sur des milieux additionnés de NAD purifié ou par la mise en évidence d'un phénomène de satellitisme autour des colonies de *Staphylococcus aureus* (il libère du NAD synthétisé en excès, ce qui permet d'obtenir des colonies de *Haemophilus influenzae* de plus grandes tailles). [10]

2.6.2.2.1. Gélose au sang

L'addition de 5 % de sang de cheval à un milieu nutritif permet une culture visible mais pauvre en *Haemophilus influenzae* en raison de la faible teneur en facteurs V (cf. figure 4).

Le phénomène de satellitisme peut être mise en évidence sur la gélose au sang. Des résultats satisfaisants sont obtenus avec le sang de cheval, de lapin, de

cobaye, de rat ; par contre le sang de mouton ne permet pas la culture de *Haemophilus influenzae*, en raison de l'absence de libération spontanée de NAD et de NADP par les globules rouges de mouton associée à une très forte activité enzymatique hydrolytique de NAD et de NADP

2.6.2.2.1.1. Milieu de Levinthal

Il est préparé à partir du sang de cheval défibriné dont les globules rouges sont lysés par choc osmotique, par congélation ou par chauffage. [1]

La solution stock de Levinthal est utilisée avec un bouillon nutritif ou incorporée à un milieu gélosé et permet d'obtenir un milieu transparent (Turk et May, 1967).

A la gélose fondue on ajoute 5 % de sang défibriné de Lapin ou d'Homme.

Mélangés et portés à ébullition, le sang et les protéines du sérum coagulent et forment un précipité. Le liquide surnageant est décanté et stérilisé. [13]

2.6.2.2.1.2. Milieu de Fildes

Il est également employé, et consiste à ajouter à la gélose une digestion peptique de sang. [11]

Il s'agit d'une solution préparée à partir de globules de mouton et contenant les facteurs X et V. Elle est incorporée aux milieux liquides et solides habituels à la concentration 1 à 2 % et permet de préparer un milieu transparent. [1]

NB : Les milieux transparents permettent d'observer une iridescence des colonies de Hib.



Figure 4 : Aspect des Colonies de *Haemophilus influenzae* sur gélose au sang.
[18]

Les colonies de Hib sont presque invisibles sur gélose au sang par insuffisance en facteur de croissance V.

2.6.2.2.2. Gélose au sang cuit

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

2.6.2.2.3. Gélose chocolat polyvitex (PVX)

Ce milieu correspond, dans la «cuisine» française et américaine, à un milieu nutritif complexe contenant de l'hémine mais pas de NAD. Il doit être supplémenté en facteur V sous forme d'extrait de levure, de NAD ou d'un mélange d'enrichissement chimique défini (cf. figure 5). [1]

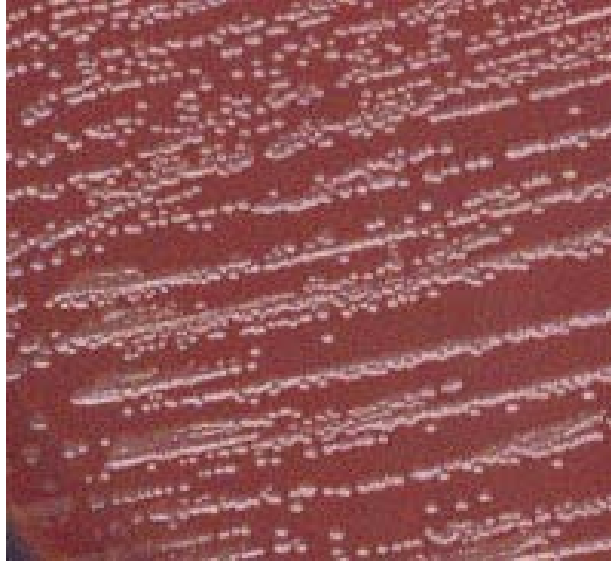


Figure 5 : Aspect des colonies de *Haemophilus influenzae* sur gélose chocolat.
[18]

Les colonies en présence des facteurs de croissance X + V se nourrissent bien et apparaissent grosses.

2.7. Caractères antigéniques

Le sérotypage de *Haemophilus influenzae* repose sur l'étude de la structure antigénique de la capsule du même germe. On distingue ainsi 6 variétés antigéniques, a, b, c, d, e, f. On comprend que les souches de *Haemophilus influenzae* dépourvues de capsule ne peuvent pas être sérotypées. En principe c'est le type b qui est le plus fréquemment rencontré.

2.7.1. Capsule

Six variétés antigéniques (a, b, c, d, e, f) ont été décrites par Pittman en fonction de la structure antigénique de la capsule du germe. La spécificité de type dépend de la composition en polysaccharides de la capsule. Différents sucres ont été individualisés : glucose, ribose, ribitol, galactose, acide mannuronique.

Seul le polysaccharide de type b, constitué de Polyribosyl- Ribitol Phosphate ou PRP a une structure composée de deux riboses. L'association fréquente entre sérotype b et biotype I semble être une conséquence de la diversité génétique limitée (clonalité) des *Haemophilus influenzae* type b. La grande majorité des pathologies invasives chez l'enfant (méningites, épiglottites, arthrites, septicémies) est due aux souches capsulées de type b en raison du rôle majeur du PRP comme facteur de virulence. Cette plus grande virulence du type b est attribuée à sa plus grande résistance à l'activité bactéricide du complément et permet une survie et une multiplication des germes dans le sang. Le PRP est antigénique, obtenu sous forme purifiée et couplée à une protéine le rendant lymphocyte T dépendant, il est utilisé dans le vaccin anti- *Haemophilus*.

2.7.2. Membrane externe

2.7.3. Pili ou fimbriae

La présence de pili ou fimbriae, mise en évidence chez *Haemophilus influenzae*, confère à la bactérie des propriétés.

Notamment, l'adhésion à la muqueuse nasopharyngée, étape précédant l'invasion sanguine et méningée, (et des propriétés d'agglutination de globules humains non inhibés par le mannose ou le alpha - méthyl- D- mannoside).

Leur rôle n'apparaît pas obligatoirement dans la colonisation de la muqueuse ni dans la phase d'invasion ultérieure s'accompagnant de la perte de pili. Les pili interviendraient dans la phase polysaccharidique de type b. Cette adhésion est de faible affinité et la persistance de la colonisation serait liée à la présence de fibrilles, ayant une structure différente de celle des pili (Figure 6).

Chez *Haemophilus influenzae* type b, la piliation permet de définir cinq sérotypes sur la base de différence d'antigénicité de la molécule de piline. Pour *Haemophilus influenzae* type b, les souches isolées du LCR et du sang sont le plus souvent non piliées contrairement à celles isolées dans le rhinopharynx. [8]

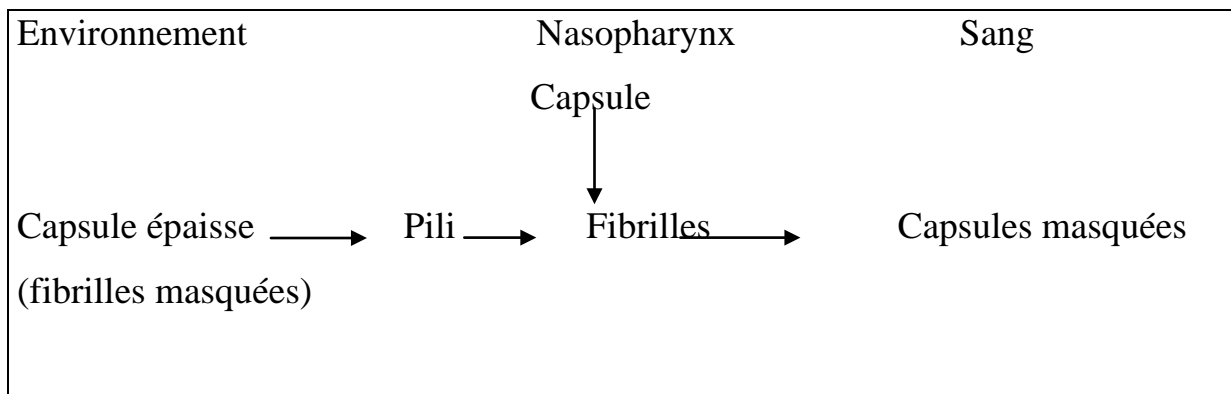


Figure 6 : Modèle d'invasivité de *Haemophilus influenzae* type b, modifications structurelles de bactérie (capsule, pili, fibrilles) en fonction de sa localisation. [8]

2.7.4. Caractères liés au gène

L'étude de plus de 100 % des espèces du genre *Haemophilus* montre une grande hétérogénéité avec des valeurs variant de 37 à 44 Moles. Les études par hybridation confirment cette hétérogénéité et certains gènes apparaissent très éloignés du genre *Haemophilus*, comme *Haemophilus ducreyi* et certains d'origine animale. Ces résultats remettent en question les bases de la classification, en particulier l'exigence en facteurs X et /ou V pour l'appartenance au genre *Haemophilus*.

2.7.4.1. Transformation

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

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

2.7.4.2. Bactériophagie

Différents bactériophages actifs sur *Haemophilus influenzae* ont été décrits (HP1, HP3, SP et N3). Les souches capsulées sont insensibles aux phages HP1, les variants non capsulés de ces souches deviennent sensibles comme le sont les souches non typables. En raison de la présence d'un système de restriction-modification très complexe (plus d'une vingtaine d'enzymes isolées) et de l'existence des souches lysogènes, aucun système de lysotypie n'a été mis au point pour les différentes espèces de *Haemophilus*. [8]

2.7.4.3. Plasmides

Des plasmides de résistance aux antibiotiques ont été décrits. Chez *Haemophilus influenzae*, les plasmides portant un ou plusieurs caractères de résistance (ampicilline, chloramphénicol, kanamycine, tétracycline) sont de différentes tailles: plasmides de petite taille (3,5 mégadaltons), non transférables, relativement rares, ayant des séquences d'homologie avec des plasmides de gonocoque et plasmides transférables de 30 à 40 mégadaltons. Le transfert est possible par la transformation et la conjugaison entre des souches de *Haemophilus* de même genre et de genres différents. Certains plasmides de *Haemophilus* ont une parenté avec des plasmides de *Neisseria* et d'entérobactéries. [1]

2.8. Caractères biochimiques

L'étude des caractères biochimiques (uréase, ornithine décarboxylase ou ODC et production d'indole) permet de reconnaître le biotype et des réactions d'agglutination sur lame en présence de sérums spécifiques permettant de reconnaître le sérotype si la souche est capsulée. [15]

Huit biotypes (I à VIII) ont été définis pour l'espèce *Haemophilus influenzae* à partir des caractères métaboliques suivants : production d'indole, activité enzymatique uréase et ornithine décarboxylase (cf. tableau II). Le biotype I est le plus fréquemment retrouvé dans les méningites, et le biotype II dans les infections broncho- pulmonaires et otites et le biotype VI dans les infections génitales. [8]

Haemophilus influenzae possède une catalase et une oxydase. Il fermente le glucose, le maltose, le ribose et le xylose mais pas le lactose ni le saccharose (cf. tableau III). [15]

Tableau II : Biotypes de *Haemophilus influenzae*. [14]

<i>Haemophilus influenzae</i>	Ornithine Décarboxylase	Urée	Indole	ONPG	Oxydase	Catalase	Réduction des nitrites
Biotype I	+	+	+	-	+	+	+
Biotype II	-	+	+	-	+	+	+
Biotype III	-	+	-	-	+	+	+
Biotype IV	+	+	-	-	+	+	+
Biotype V	+	-	+	-	+	+	+
Biotype VI	+	-	-	-	+	+	+
Biotype VII	-	-	+	-	+	+	+
Biotype VIII	-	-	-	-	+	+	+

Tableau III : Caractères biochimiques des *Haemophilus influenzae* chez l'Homme. [14]

Activités biochimiques	<i>Haemophilus influenzae</i>
Synthèse des porphyrines	-
Exigence en facteurs	+
Hémolyse	-
Acidification D- glucose	+
D- Fructose	-
Saccharose	-
Lactose	-
D- Xylose	+
D- Ribose	+
D- Mannose	-
D- Galactose	+
Maltose	+
Mélibiose	-
Tréhalose	-
Raffinose	-
H ₂ S	-
Hémagglutination	-
Besoins en CO ₂	-
Phosphatase alcaline	+

+ Réaction positive

- Réaction négative

2.9. Sensibilité et résistance aux antibiotiques

2.9.1. Sensibilité et résistance naturelle

Haemophilus influenzae est une espèce naturellement sensible à de nombreux antibiotiques : bêta- lactamines, aminosides, tétracyclines, chloramphénicol, rifampicine, quinolones, triméthoprimes. [8]

Haemophilus influenzae type b est résistant à la pénicilline G. En l'absence de résistance acquise, il est sensible à l'amoxicilline. La sensibilité aux céphalosporines de première génération, aux macrolides et apparentés est inconstante. Les glycosides sont inefficaces.

2.9.2. Résistance acquise

Les tétracyclines et le chloramphénicol ont été utilisés avec efficacité dès 1950, jusqu' à l'introduction de l'ampicilline en 1961, devenue l'antibiotique de référence. Les premières souches résistantes à l'ampicilline sont apparues en 1972, et cette résistance n'a fait que croître.

2.9.2.1. Résistance à l'ampicilline

La résistance est essentiellement liée à la production des bêta- lactamases plasmidiques de type TEM1. Cette bêta- lactamase est semblable à celle produite par *Escherichia coli*. D'autres bêta- lactamases TEM- like ont été décrites. Il existe d'autres mécanismes de résistance, soit par altération d'origine chromosomique des Protéines de Liaison aux Pénicillines (PLP), soit par résistance intrinsèque due à un défaut de perméabilité. Enfin, des phénomènes de tolérance, définis par une augmentation de la concentration minimale bactéricide de plus de 32 fois par rapport à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) ont également été observés. Cependant le mécanisme de résistance principale est lié à la production de bêta lactamase de type TEM1. [8]

2.9.2.2. Résistance au chloramphénicol

La résistance au chloramphénicol est essentiellement liée à un mécanisme de résistance enzymatique par production de chloramphénicol- acétyltransférase. Cette enzyme est d'origine plasmidique et code souvent pour une résistance

combinée chloramphénicol- ampicilline. Cette résistance concerne 3% des souches de *Haemophilus influenzae* et est associée, dans deux tiers des cas à une résistance à l'ampicilline.

2.9.2.3. Résistance à d'autres antibiotiques

La résistance aux tétracyclines est également déterminée par les plasmides qui codent fréquemment pour la résistance combinée chloramphénicol- tétracycline. Elle concerne 10 % des souches. [8]

2.10. Epidémiologie

Haemophilus influenzae fait partie de la flore nasopharyngée du sujet normal et l'homme est le seul réservoir. Il colonise à moindre degré les muqueuses conjonctivales et génitales. [10]

Le portage commence dès les premiers mois de la vie et peut concerner 75 % des jeunes enfants et 35 % des enfants plus âgés et des adultes, avec cependant de grandes variations dans le portage des souches encapsulées, notamment Hib, qui le plus souvent ne dépasse pas 5 % mais peut atteindre des valeurs plus élevées, notamment en crèche. Les infections invasives sont surtout notées chez l'enfant (dans 95 % des cas, la souche de *Haemophilus influenzae* est de type b). L'incidence de la colonisation et des infections à Hib varie en fonction des pays et des conditions socio- économiques. Avant l'ère vaccinale, l'incidence des infections invasives à Hib aux États-unis était de 50 à 100 cas pour 100000 enfants par an (dont 30 à 60 cas de méningites pour 100000 enfants par an). Elle était plus importante dans certaines populations comme les esquimaux d'Alaska ou les Apaches. En Europe, l'incidence était de 30 à 60 cas pour 100000 enfants par an.

Les infections à *Haemophilus influenzae* sont, soit localisées (concernant l'appareil respiratoire et la sphère ORL), essentiellement provoquées par les souches non capsulées, soit systématiques (méningites, arthrites, cellulites,

épiglottites, péricardites, bactériémies isolées) et essentiellement provoquées par les souches capsulées de type b. (cf. tableau IV : portage oropharyngé)

L'épidémiologie des infections à *Haemophilus influenzae* s'est profondément modifiée depuis l'introduction de la vaccination anti- Hib. Dans les pays où la politique de vaccination est développée on assiste à une diminution significative des pathologies invasives avec une quasi- disparition des méningites.

L'intensification de la vaccination s'accompagne également d'une diminution du portage pharyngée des souches invasives de Hib. [8]

Tableau IV : Portage oropharyngé et pathogénicité de *Haemophilus influenzae*.

[8]

Souches	portage oropharyngé (%)	Principales manifestations
Non encapsulées	50 - 80	Exacerbations des bronchites chroniques, otites moyennes, sinusites, conjonctivites, rarement bactériémies
Encapsulées de type b	2 - 4	Méningites, épiglottites, pneumonies, et empyèmes, arthrites septiques, cellulites, ostéomyélites ; plus rarement glossites, Ténosynovites, péritonites, endocardites, ventriculites
Encapsulées de type a, c-f	1 - 2	Rarement pathogènes

2.11. Physiopathologie

Haemophilus influenzae était, avec *Streptocoque pneumoniae* et *Neisseria meningitidis*, l'une des trois espèces bactériennes le plus souvent isolées du LCR lors des méningites purulentes. La vaccination en a diminué l'incidence. [4]

La grande majorité des infections systémiques à *Haemophilus influenzae* est due aux souches capsulées de type b en raison du rôle majeur du PRP comme facteur de virulence. Les autres sérotypes sont, en effet éliminés, au cours de la phase septicémique et présentent un risque moindre de localisations secondaires comme les arthrites, les méningites (cf. fig 7). *Haemophilus influenzae* sérotype b colonise l'épithélium nasopharyngé au niveau des cellules ciliées et échappe à l'escalator mucociliaire par production d'une ciliotoxine, immobilisant les cils. *Haemophilus influenzae* se multiplie puis envahit l'épithélium. Ce sont les *Haemophilus influenzae* sérotype b non ciliés qui ont un avantage sur les souches piliées pour l'invasion. La perte de pili est nécessaire pour le développement de l'infection. *Haemophilus influenzae* de sérotype b est trouvé 24 heures après l'infection dans le sous-épithélium adjacent aux follicules lymphoïdes. *Haemophilus influenzae* sérotype b gagne ensuite la circulation générale par les petits vaisseaux de la sous-muqueuse. La translocation à partir de la muqueuse nasopharyngée est facilitée par une infection virale préalable des voies respiratoires supérieures. Lors des bactériémies intenses et prolongées, les mécanismes d'épuration des germes peuvent être dépassés et c'est alors que des localisations extra vasculaires peuvent survenir, et surtout particulièrement des méningites. En effet, il a été montré que le risque de survenue d'une méningite est proportionnel à la durée et à l'intensité des bactériémies. Le passage de la barrière hémato-méningée se fait au niveau des plexus choroïdes. [8]

La virulence de *Haemophilus influenzae* sérotype b par rapport aux souches non capsulées et aux bactéries capsulées pourrait être liée à la protection par la capsule de l'activité bactéricide non médiée par les anticorps complément-dépendants et de l'effet protecteur de C3. La production d'une IgA protéase

permet à *Haemophilus influenzae* d'échapper aux IgA sécrétoires locales.

L'absence d'un titre suffisant d'anticorps spécifiques et un dysfonctionnement du système réticuloendothélial induisent la diffusion de *Haemophilus influenzae* sérotype b. [8]

Les facteurs de risque sont le jeune âge (les deux tiers des infections invasives surviennent avant 18 mois), le sexe masculin, le terrain (agammaglobulinémie, déficit en C3, splénectomie, drépanocytose, alcoolisme) et l'ethnie. Chez les nourrissons, la bactériémie peut entraîner des localisations secondaires (méningées, ostéo- articulaires, pleurales, péricardiques, tissu cellulaire sous-cutané). [1]

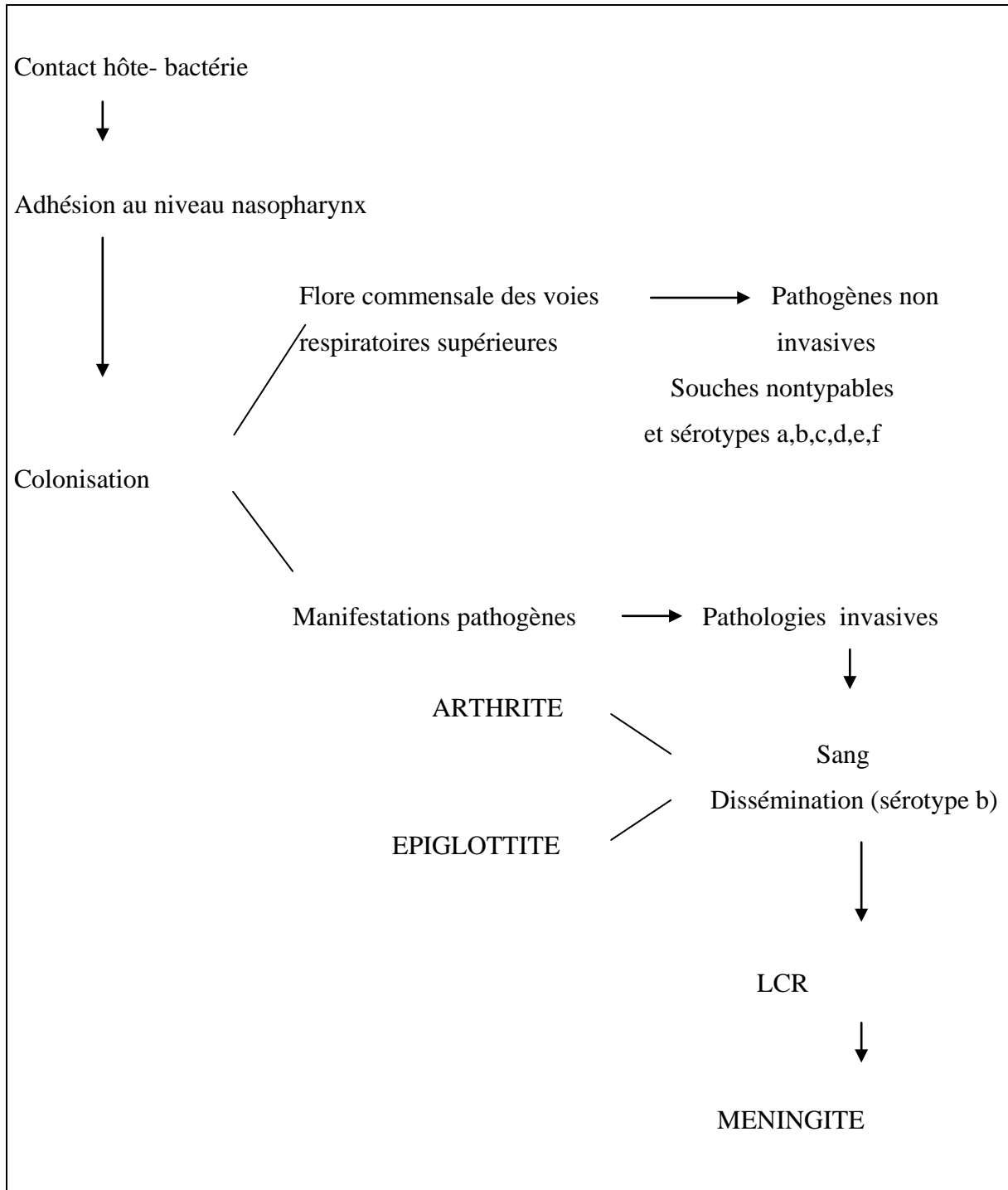


Figure 7 : Physiopathologie des infections à *Haemophilus influenzae*. [8]

2.12. Manifestations cliniques

2.12.1. Méningites de l'enfant

Les méningites purulentes de l'enfant, quel que soit le germe responsable, sont fréquentes (environ 3500 cas par an) et graves (10 % de mortalité, 20 % de séquelles). Leur pronostic doit être réservé par la précocité d'un traitement antibiotique bactéricide.

Haemophilus influenzae était avant la vaccination, le germe le plus fréquent en cause chez les enfants de 3 mois à 3 ans. Dans cette tranche d'âge 80 à 90 % des méningites liées à *Haemophilus influenzae* étaient observées avant 2 ans avec un pic de fréquence maximale entre 6 et 12 mois. D'autres sérotypes ont été incriminés.

2.12.2. Aspect clinique

La méningite est souvent précédée d'un syndrome infectieux pendant lequel des bactériémies se produisent ; ainsi le début clinique de la méningite est très insidieux. Cependant, même au stade de méningite avérée, le tableau clinique peut être trompeur, la raideur de la nuque manque souvent et il faut savoir être alerté par de petits signes: somnolence ou au contraire insomnie ou irritabilité exagérée, plafonnement du regard. Des convulsions peuvent survenir, une ponction lombaire sera alors réalisée. Au cours des méningites à *Haemophilus influenzae*, il n'y a en général pas de purpura. De même les formes fulminantes, avec décès en quelques heures, semblent rares. [8]

Des complications initiales telles que l'épanchement sous- dural sont retrouvées dans 20 % des cas de méningites à *Haemophilus influenzae*, et devront être évoquées devant la persistance de la fièvre, de convulsions retardées ou une hypertension intracrânienne persistante. L'empyème sous- dural est, contrairement à l'épanchement sous- dural, une collection purulente dont l'évacuation est nécessaire. Les abcès cérébraux compliquent moins souvent les méningites du nourrisson que celles du nouveau-né. Les arthrites purulentes peuvent également compliquer une méningite à *Haemophilus influenzae*. Elles

devront être distinguées des arthrites réactionnelles, plus tardives, d'origine immunologique et d'évolution spontanément favorable.

La mortalité globale des méningites à *Haemophilus influenzae* traitées est de l'ordre de 5 %. Des séquelles neurologiques peuvent survenir dans 20 % des cas chez les survivants. Une ataxie transitoire, dans les premiers mois consécutifs à la méningite, peut survenir et régresse sans séquelles. La surdité est la principale séquelle des méningites à *Haemophilus influenzae*. Plus rarement peuvent être notés des déficits moteurs ou intellectuels, des difficultés d'acquisition du langage voire une hydrocéphalie ou des troubles psychiques graves. La fréquence de ces séquelles est proportionnelle à la concentration des germes dans les LCR de la première ponction lombaire. [8]

2.13. Diagnostic microbiologique

Le diagnostic de la méningite repose sur la ponction lombaire. En dehors des situations typiques (liquide trouble, formule cytologique de méningite purulente). On peut observer des formules de LCR peu perturbées dans d'authentiques infections à *Haemophilus*, notamment au début. L'examen au Gram peut montrer des bacilles à Gram négatif très polymorphes. La détection d'antigène soluble est intéressante dans la mesure où elle peut permettre le diagnostic de l'espèce microbienne responsable d'une méningite purulente avant le résultat des cultures, lorsque l'examen direct est négatif, et donc d'instaurer d'emblée un traitement efficace. [1]

Deux types de procédé sont disponibles pour la détection d'anticorps :

-L'agglutination de latex : est une méthode rapide, sensible et spécifique pour déterminer l'antigène capsulaire de polysaccharide du Hib dans le LCR, mais un essai négatif n'exclut pas le diagnostic et des essais positifs faux ont été rapportés. Les essais d'antigène du sérum et l'urine ne sont pas recommandés.

-La contre-immunoelectrophorèse (CIE) : est semblable à l'agglutination latex, mais est moins sensible, prend plus de temps et est difficile à exécuter. Une

culture positive de *Haemophilus* établit le diagnostic. Tous les isolats de Hib devraient être classés par sérotype. C'est un procédé de laboratoire extrêmement important qui devrait être exécuté sur chaque isolat de *Haemophilus influenzae* particulièrement ceux obtenus à partir des enfants de moins de 15 ans. Cet essai détermine si l'isolat est le type b, et est important parce que seulement le b peut être potentiellement prévenu par la vaccination. La classification par sérotype est habituellement faite par le laboratoire du département de santé d'état ou par un laboratoire de référence. [12]

La numération des germes dans le LCR doit être systématiquement réalisée par une technique de dilution ; son intérêt réside dans la possibilité d'évaluer le pronostic encourut par le malade et de prédire une éventuelle diminution de l'activité in vivo de l'antibiotique. Un taux de germes supérieur ou égal à 10^7 / ml a été corrélé à un mauvais pronostic. [8]

Une autre méthode de détermination du Hib est l'**api NH** ou **NH rapide**, dont le principe repose sur un système de galerie comprenant 10 microtubes.

2.14. Traitement

Le traitement curatif repose sur l'antibiothérapie dont les modalités ont évolué au cours de ces dernières années et sont actuellement bien codifiées. En raison de la prévalence actuelle des souches de Hib résistantes à l'amoxicilline, l'utilisation de cet antibiotique n'est plus concevable dans le traitement de première intention des méningites purulentes de l'enfant. Celui ci repose actuellement sur l'utilisation des céphalosporines de 3^{ème} génération : céfotaxime (200mg/kg/j) ou céftriaxone (100 mg/kg/j), qui ont un bon passage méningé (15 à 20 %). Après l'identification des souches de *Haemophilus influenzae*, s'il s'agit d'une souche sécrétrice de bêta- lactamase et sensible à l'amoxicilline, la poursuite du traitement par une céphalosporine de 3^{ème} génération est recommandée. En effet, le Quotient Inhibiteur (QI) des céphalosporines de 3^{ème} génération, égal au rapport concentration in vivo (sang, LCR, tissu) de

l'antibiotique/CMI du germe, est très supérieur à celui de l'amoxicilline même pour les souches sécrétrices de bêta- lactamase. La bithérapie est systématique chez l'enfant afin d'accroître la vitesse de bactéricidie. Ainsi la bêta- lactamine est généralement associée à un aminoside pendant les 48 premières heures ; si l'évolution est favorable, la durée de l'antibiothérapie est actuellement réduite à 10 jours dans les méningites à *Haemophilus influenzae*. [8]

2.15. Prophylaxie

2.15. 1. Vaccination anti-Hib

2.15.1.1. Définition

La vaccination est une méthode de prévention de certaines infections bactériennes, virales ayant pour but d'induire une immunité active par introduction dans l'organisme de préparations appelées vaccins. [19]

2.15.1.2. Historique de la vaccination anti-Hib

En 1933, Fothergill et Wright expliquent la fréquence des infections graves à Hib chez l'enfant de 3 mois à 3 ans par l'absence d'anticorps bactéricides dans cette tranche d'âge : avant l'âge de 3 mois, les anticorps maternels confèrent une protection efficace vis à vis de Hib et, après l'âge de 3 ans, la majorité des enfants a acquis une protection. Les anticorps bactéricides sont dirigés contre le PRP, Le mécanisme d'acquisition d'anticorps anti- Hib est cependant mal connu. En effet, même en l'absence de colonisation nasopharyngée par Hib, les enfants développent des anticorps. L'acquisition de l'immunité pourrait être favorisée par des antigènes d'espèces bactériennes commensales (*Escherichia coli*) ou alimentaires ayant des épitopes communs. Les anticorps anti- PRP activent l'opsonisation, la bactéricidie médiée par le complément et provoque une immunité protectrice vis-à-vis d' Hib.

Le complément apparaît important pour favoriser la phagocytose par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles, même en présence d'anticorps

anticorpusculaires. Les déficits en complément entraînent une susceptibilité accrue aux infections à Hib. [1]

Le rôle de l'immunité locale de la muqueuse est encore mal élucidé. Les immunoglobulines A (IgA) sécrétées pourraient empêcher l'adhésion bactérienne, mais elles pourraient également avoir un effet néfaste en bloquant la sécrétion des autres anticorps. [10]

Les mesures préventives seront mises en oeuvre uniquement contre les infections à *Haemophilus influenzae* de type b, lors des méningites, manifestations invasives les plus graves et les plus fréquentes.

Schématiquement, elles auront pour objectifs :

- 1) l'élimination du portage chez l'individu isolé ou vivant dans une collectivité;
- 2) l'augmentation des défenses spécifiques de l'organisme par l'utilisation d'un vaccin approprié chez les sujets réceptifs (nourrisson ; jeune enfant).

Ces deux objectifs ont été l'objet de nombreux travaux, mais des incertitudes demeurent quant à leur opportunité et efficacité.

2.15.1.3. Le premier vaccin anti-Hib

Le premier vaccin, a été étudié dès 1974 par Peltola en Finlande. [20]

L'intérêt de la vaccination peut être analysé à la lumière de l'expérience de ces auteurs finlandais avec un recul de 10 ans sur 50 000 enfants.

Le vaccin est constitué de polysaccharides purifiés (PRP type b). En effet le PRP antigène thymo- dépendant, active directement les lymphocytes B. Ce type d'immunité a deux inconvénients majeurs : d'une part chez les enfants de moins de deux ans, ce système est immature et d'autre part il n'y a pas d'augmentation des anticorps après les injections de rappel. [1]

Compte tenu de l'âge de survenue des infections à *Haemophilus influenzae* type b en Finlande les auteurs proposent une vaccination à l'âge de 18 mois et rappel à l'âge de 36 mois pour prévenir 50 à 60 % des infections systémiques.

Une telle proposition n'est cependant pas généralisable car la répartition des infections à *Haemophilus influenzae* selon l'âge peut varier et dans de nombreux

pays, la plus forte incidence des méningites est observée chez des enfants plus jeunes qu'en Finlande.

Les polysaccharides purifiés utilisés comme vaccin sont des structures répétitives relativement simples et se comportent comme des antigènes indépendants des cellules T. Après vaccination ou revaccination, il n'y a pas induction de cellule B mémoires et la réponse est toujours identique, uniquement en IgM chez le jeune enfant.

2.15.1.4. Les actuels vaccins anti-Hib

La séroconversion obtenue par le premier vaccin (constitué de PRP seul) était médiocre avant l'âge de 2 ans et il ne donnait pas non plus d'effet rappel, quel que soit l'âge. [1]

Ce faible pouvoir immunogène avant 2 ans, bien connu pour tous les vaccins polysaccharidiques thymo-dépendants ne permettait pas d'administrer le vaccin aux nourrissons, cibles essentielles pour la protection recherchée : un autre vaccin était donc nécessaire. En conjuguant le vaccin PRP à des protéines, on obtient un pouvoir immunogène dès les premiers mois de vie et une réponse immunitaire thymo-dépendante.

Quatre vaccins conjugués sont actuellement disponibles dans le monde et parfaitement étudiés :

- Le vaccin conjugué PRP-D, le plus ancien où une anatoxine diphtérique (analogue de la toxine) est liée à un ligand au PRP.
- Le vaccin conjugué PRP-T, conjugué à l'anatoxine tétanique.
- Le vaccin conjugué PRP-OMP conjugué à une protéine de la membrane externe du méningocoque B.
- Le vaccin conjugué PRP-HbOC, où le PRP est lié par une liaison de covalence à une toxine diphtérique mutante non toxique.

Le vaccin Hib doit être conservé entre +2 et +8 °C et ne doit pas être congelé.

Il est administré à la 6^{ème}, 10^{ème}, 14^{ème} semaine de la vie avec DTC-Hép B d'où DTC-Hép B-Hib appelé pentavalent. [21]

A noter que le vaccin ne protège pas contre les autres infections à *Haemophilus influenzae* dues surtout aux souches non capsulées (ORL infections broncho-pulmonaires).

2.15.2. Chimio prophylaxie

Elle repose sur l'utilisation d'un antibactérien qui a, au niveau de la salive, des larmes, des liquides de l'oro- et du nasopharynx, des concentrations efficaces et une activité sur les bactéries concernées. Plusieurs antibiotiques se sont avérés inefficaces dans l'élimination de *Haemophilus influenzae* type b du pharynx ou ont donné des résultats contradictoires.

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la rifampicine, à la dose de 20 mg/kg/jour en une prise par voie orale pendant quatre jours pour l'enfant de 1 (un) mois à 12 (douze) ans et de 600 mg par jour chez l'adulte. Ceci a permis une éradication chez 90 à 95 % des porteurs. Différentes objections peuvent être opposées à une chimioprophylaxie par la rifampicine. L'émergence des souches résistantes après chimioprophylaxie est rare, mais a été signalée; le risque de sélection de souche de mycobactérie résistante semble être uniquement théorique. Par contre la suppression de la colonisation peut réduire l'immunisation survenant par l'infection inapparente. Les sujets concernés par la chimioprophylaxie sont tous les sujets contacts, vivant dans l'intimité du malade, plus particulièrement les enfants de moins de 4 (quatre) ans. Le malade lui-même doit être soumis à la même chimioprophylaxie car le traitement antibiotique est le plus souvent sans effet sur le portage.

Ces études ont été essentiellement conduites aux Etats Unis, où la fréquentation des crèches et garderies est importante. Le risque de cas secondaires semble cependant plus important dans le contexte familial que dans une collectivité d'enfants. Et si la rifampicine a fait preuve d'efficacité dans l'éradication du portage, la preuve de cette efficacité n'a pas été faite dans la prévention des cas secondaires et la surveillance étroite et soigneuse des enfants exposés reste essentielle. [1]

3. Méthodologie

3. 1. Cadre d'étude

Notre étude a été réalisée dans le laboratoire du CHU Gabriel Touré situé dans le centre commercial de Bamako. En 1959, l'ancien Dispensaire Central de Bamako a été érigé en hôpital. Il sera baptisé «Hôpital Gabriel Touré» en hommage au sacrifice d'un jeune soudanais stagiaire en médecine mort lors d'une épidémie de peste, maladie qu'il contracta au cours de son stage en 1934. L'Hôpital Gabriel Touré a été érigé en Etablissement Public à caractère Administratif (EPA) en 1992, doté de la personnalité morale et de l'autonomie de gestion. L'Hôpital Gabriel Touré est l'un des onze (11) Etablissements Publics à caractère Hospitalier (EPH) institués par la loi n° 94-009 du 22 mars 1994 modifiée par la loi n°02-048 du 12 juillet 2002 portant création du Centre Hospitalier Universitaire (CHU).

Le laboratoire comprend une salle d'hématologie, une salle de biochimie, une salle pour les prélèvements et la parasitologie, une salle de stérilisation équipée d'autoclaves et de fours, une salle de garde, un bureau du chef de service. En Février 2002 une partie du laboratoire a été aménagée pour les activités de bactériologie et équipée en conséquence avec;

- 2 hottes à flux laminaire avec incinérateur électrique pour la stérilisation des anses ;
- 3 automates d'hémocultures BACTEC® 9050 ;
- 1 incubateur à CO₂ pour les bactéries aéro- anaérobies ;
- 1 incubateur sans CO₂ pour les bactéries aérobies, les antibiogrammes et les galeries d'identification API 20 E ;
- 1 centrifugeuse ;
- 1 congélateur de – 80° C pour la conservation des souches bactériennes ;
- 1 congélateur de – 20° C pour la conservation des disques d'antibiotiques, des disques d'identification (Optochine, Bacitracine) des facteurs de croissance des Haemophilus ; des réactifs de sérogroupage des Salmonella ;

- 2 réfrigérateurs pour la conservation des milieux de culture et des réactifs ;
- 1 micro- ordinateur avec un système de communication Internet;
- 1 microscope Olympus CX31;
- 1 néphélomètre Mc Ferland pour la mesure de turbidité en vue des antibiogrammes conformément à la méthode de Kirby Bauer ;

Des petits matériels divers, des consommables et un ravitaillement régulier en milieux de culture et réactifs permettant de réaliser des activités de bactériologie.

Le personnel comprend :

- 1 (un) pharmacien biologiste ;
- des pharmaciens ;
- des faisant fonction d'internes ;
- des techniciens supérieurs.
- des techniciens de laboratoire, repartis entre les différentes sections de biologie; dont deux de la section de bactériologie ont bénéficié d'un stage de formation à Baltimore (USA)
- Un personnel de surface.

Les activités de bactériologie dans le cadre de la recherche sont supervisées par un Professeur de bactériologie- virologie responsable de l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP).

3.2. Etude

3.2.1 Type d'étude

Il s'agit d'une étude rétrospective sur 6 (six) ans, basée sur l'impact de la vaccination sur le suivi biologique de laboratoire des cas d'isolements de Hib chez les patients hospitalisés dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel Touré.

3.2.2 Durée de l'étude

L'étude a été réalisée sur une période de 6 (six) ans : de janvier 2003 à décembre 2008, couvrant les trois saisons: saison sèche fraîche, saison sèche chaude, saison pluvieuse.

3.2.3. Critères

3.2.3.1. Critères d'inclusion

Cette étude porte sur des enfants prélevés au niveau du site de prélèvement de CVD à la pédiatrie et répondant aux critères suivants :

- être âgé de moins de 17 ans,
- être hospitalisé dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel Touré,
- avoir une température corporelle ≥ 39 °C à l'admission ;
- avoir une "Suspicion d'Infection Bactérienne Invasive" (SIBI) ;
- l'assentiment des parents est sollicité pour les enfants âgés de moins de 13 ans ;
- l'assentiment des enfants de 13 à 16 ans est obligatoire ;

3.2.3.2. Critères de non inclusion

Ne prennent pas part à cette étude :

- le nouveau-né malade n'ayant jamais quitté le CHU Gabriel Touré depuis sa naissance;
- l'enfant âgé de 13 à 16 ans incapable ou refusant de donner tout consentement, pas à cause de la gravité de sa maladie ;
- l'incapacité ou refus du parent ou de l'accompagnant du patient à donner un assentiment.

3.3. Méthode de traitement et d'analyse des données

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel EPI-info version 6.0 et Excel.

Le document a été saisi sur Word 2003.

3.4. Aspects éthiques de l'étude :

3.4.1 Consentement des malades.

Des assistants de recherche sont formés à la méthodologie de l'étude, particulièrement à l'obtention du consentement éclairé et à l'inclusion du malade

dans l'étude. Ils travaillent en collaboration avec le tri et les salles de consultation du service de pédiatrie du CHU Gabriel Touré pendant la durée de l'étude. Chaque pédiatre a à ces cotés un assistant de recherche qui est chargé de vérifier les critères d'inclusions, d'expliquer les modalités de l'étude, les objectifs, les risques et les bénéfices pour l'enfant à la famille et\ou au malade et d'obtenir le consentement éclairé du patient avant l'inclusion. (Voir le consentement éclairé en annexe)

3.4.2. Respect des références bibliographiques

Les textes des références bibliographiques n'ont pas fait l'objet de modifications. La propriété intellectuelle des auteurs de nos références bibliographiques a été respectée.

3.5. La réception des prélèvements au laboratoire

Dans le cadre de la démarche qualité, et pour une bonne traçabilité, les prélèvements reçus au laboratoire sont inscrits dans les registres de laboratoire et saisis sur support informatique. Il existe 4 registres :

- 1 registre pour l'enregistrement des hémocultures ;
- 1 registre pour l'enregistrement des LCR ;
- 1 registre pour la goutte épaisse ;
- 1 registre pour l'enregistrement des autres prélèvements (Liquide articulaire, liquide pleural, liquide sous cutané etc...)

Chaque registre comprend :

- une partie de renseignements sur le patient (nom et prénoms, sexe, âge, résidence)
- une partie de données des résultats préliminaires comportant les résultats des tests d'agglutination sur le LCR direct, les résultats du comptage en cellule de KOVA des GB et GR du LCR.

Les résultats de la coloration de Gram sur le LCR direct, sur les autres prélèvements et sur les flacons de BACTEC® des hémocultures positives, sont systématiquement portés dans le registre

- une partie comportant le résultat définitif des cultures du LCR, des hémocultures et des autres liquides et enfin le résultat de l'antibiogramme des souches de bactéries isolées.

3.6. Hémocultures

3.6.1. Présentation de la méthode d'hémoculture :

L'appareil " BACTEC® 9050 de chez Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Md." et d'autres automates d'hémoculture comme le "BacT- ALERT 3D Combination de chez bioMérieux", utilisent des méthodes de détection des flacons positifs basées sur différentes mesures du CO₂. Les microorganismes présents dans les bouteilles BACTEC® libèrent du CO₂ qui réagit avec un colorant présent dans le capteur de l'appareil. Ceci module la quantité de lumière qui est absorbée par un composant fluorescent du capteur. Les détecteurs photosensibles de l'instrument mesurent l'intensité de la fluorescence, laquelle correspond à la quantité de CO₂ libérée par les microorganismes. La mesure est ensuite interprétée par le système en fonction des paramètres de positivités pré-programmés. [22]

Le système "BacT- ALERT 3D Combination" fonctionne grâce à une technologie colorimétrique développée par bioMérieux, la croissance des microorganismes dans chaque flacon est constamment surveillée par un réflectomètre très sensible. Tout changement de statut des flacons est enregistré par un signal sonore et visuel comme pour le BACTEC®. [23]

La capacité de l'automate BACTEC® 9050 est de 50 flacons. Celle de "BacT- ALERT 3D Combination" est de 120 flacons. Chez chacun de ces fabricants il existe d'autres automates de grande capacité.

Un volume de 2-5 ml de sang est prélevé sur le patient et injecté directement dans chaque flacon d'hémoculture qui est saisi dès que possible dans l'appareil pour garantir son efficacité. Il s'agit d'une innovation par rapport à l'hémoculture classique qui demande un volume de 10 ml de sang.

Le BACTEC® 9050 fonctionne par un système d'agitation continue des flacons versus intermittent des BACTEC® des séries de grande capacité (BACTEC® 9120 et BACTEC® 9240). [24]



Figure 8: BACTEC® 9050.

Les bouillons de culture

Il existe 5 types de flacons BACTEC® :

- BD BACTEC™ PLUS/F

Ces milieux de culture contiennent des résines qui neutralisent une grande variété d'antibiotiques et permettent d'améliorer la mise en évidence des germes chez les patients sous antibiothérapie.

- BD BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F

Ce milieu contient un agent lytique qui permet de détecter plus rapidement des organismes en partie phagocytés par les leucocytes.

- BD BACTEC™ MYCOSIS-IC/F

Ce milieu fongique facilite la mise en évidence de levures qui peuvent être masquées par la prolifération bactérienne dans la culture.

- BD BACTEC™ MYCO/F LYTIC

Ce milieu 7H9 supplémenté a été spécialement développé pour la détection des mycobactéries, levures et champignons dans le sang. Il contient un agent lytique qui permet de détecter plus rapidement des organismes en partie phagocytés.

- BD BACTEC™ PEDS PLUS/F

Ce milieu conçu pour les échantillons de faible volume permet d'optimiser la détection des germes pathogènes courants chez les enfants.

Ce flacon BD BACTEC™ PEDS PLUS /F étant utilisé pour sa conception à la détection des germes pathogènes courants chez les enfants, ceci exclut d'autres pathogènes dont la détection est assurée par les autres types de flacons

BACTEC®. [25]



Figure 9 : Le flacon BD BACTEC™ PEDS PLUS /F.

Le flacon BD BACTEC™ PEDS PLUS /F a été utilisé pour sa conception à la détection des germes pathogènes courants chez les enfants, ceci exclut d'autres pathogènes dont la détection est assurée par les autres types de flacons BACTEC®.

Composition du bouillon BACTEC® 9050

Avant analyse, les flacons de culture BACTEC PEDS PLUS/F contiennent les réactifs suivants :

Liste des composants :

(Les pourcentages correspondent au poids par rapport au volume)

Eau traitée	40 ml
Bouillon digéré de soja- caseine	2,75 %
Extrait de levure	0,25 %
Digestion de tissu animal	0,10 %
Pyruvate de sodium	0,10 %
Dextrose	0,06 %
Sucrose	0,08 %
Hémine	0,0005 %
Méladione	0,00005 %
Polyanéthol Sulfonate de Sodium (PSS)	0,020 %
Chlorhydrate de pyridoxal (vitamine B6)	0,001 %
Résine absorbante non ionique	10,0 %
Résine échangeuse de cations	0,60 %

3.6.2. Protocole et techniques des hémocultures positives

Les procédures suivantes sont suivies lorsque le BACTEC® 9050 indique que l'hémoculture est positive. [25]

1. la bouteille du BACTEC® 9050 est retirée de l'appareil. Sa capsule en plastique est désinfectée avec de l'alcool, ensuite une aiguille de subculture est insérée à travers la capsule et immédiatement après nous préparons une

coloration de Gram ainsi qu'une subculture de l'échantillon de sang en utilisant les milieux suivants selon le cas :

Boîte de gélose au sang de cheval ou de mouton ;

Boîte de gélose Mac Conkey ;

Boîte de gélose chocolat ;

Sont écrits sur chaque boîte le numéro du BACTEC®; ou le numéro d'identification GDH (Global Digital Health), les initiales du patient ainsi que la date ;

2. Reporter tous les résultats sur la fiche de travail ;

3. Procéder à la lecture de la coloration de Gram :

Si aucun microorganisme n'est détecté sur la lame de coloration, remettre la bouteille dans le BACTEC® 9050. Ceci devrait être fait le plus tôt possible dans les 3 heures qui suivent la sortie du flacon. Dans les 3 heures, le flacon de BACTEC® doit être subcultivé sur la boîte de gélose au sang, la boîte de gélose Mac Conkey et la boîte de gélose chocolat. Les boîtes et la bouteille sont incubées et observées pendant une durée de 5 jours (à compter de l'incubation de la bouteille). La bouteille est encore subcultivée si au bout de ces 5 jours aucun microorganisme n'a toujours pas été identifié ;

Si des microorganismes sont détectés, ne plus remettre la bouteille dans le Bactec 9050. Reporter sur la fiche de travail les résultats de la coloration de Gram (par exemple : CGPgr, CGPpr, CGPch, BGP, BGN, Cocco BGN, DCGN, Levures...) ;

4. le service de pédiatrie est informé d'un résultat positif de la coloration de Gram ;

5. lorsque des cocci Gram-positif en paires ou en chaînettes sont observés, placer un disque de bacitracine (A) et un disque d'optochine (P) sur la gélose au sang de la subculture ;

6. les boîtes contenant les subcultures sont placées dans l'incubateur à CO₂.

Si la coloration de Gram est positive, la bouteille est incubée avec les Boîtes.

7. lorsqu'une croissance est observée, reporter sur la fiche de travail les références des boîtes dans lesquelles des colonies ont été observées. Faire une coloration de Gram sur ces colonies et reporter les résultats sur la fiche de travail. S'il existe plusieurs genres de colonies, l'aspect de chaque colonie bactérienne est aussi reporté ;
8. dans les cas où des cocci Gram- positifs sont observés, se référer à l'organigramme de travail comme suit :
 - a. enregistrer les résultats des tests des disques d'optochine et de bacitracine ainsi que le test de la catalase ;
 - b. si le micro- organisme est catalase- positif et ressemble au Staphylocoque (cocci Gram- positif en grappes), faire un test de coagulase. Si le micro- organisme est coagulase- positive, il faudrait l'enregistrer comme étant *Staphylococcus aureus*. Si le micro- organisme est coagulase négatif après 24 heures, il faudrait l'enregistrer comme étant *Staphylococcus* à coagulase négative;
 - c. lorsque le micro- organisme est catalase- négatif, bêta- hémolytique, et bacitracine- positif (inhibé par la bacitracine), enregistrer le micro- organisme comme étant *Streptococcus* Groupe A ;
 - d. au cas où le test à la bacitracine ou à la catalase est flou, faire un PYR test. Si le PYR test est positif, enregistrer le micro-organisme comme étant *Streptococcus* groupe A ;
 - e. dans le cas où le micro- organisme est catalase négatif, bêta- hémolytique, et bacitracine négatif, faire les tests d'agglutination des streptocoques des groupes A et B. Enregistrer le micro- organisme comme étant *Streptococcus* bêta- hémolytique de groupe A, de groupe B ou non groupable ;
 - f. quand le micro- organisme est catalase négative, optochine- positif (inhibé par le disque d'optochine) et diplocoque Gram- positif, l'enregistrer comme étant *Streptococcus pneumoniae*. Si le test d'optochine est négatif ou non concluant,

faire un test de «bile solubility». Si ce test de solubilité par la bile est positif, enregistrer le micro- organisme comme étant *Streptococcus pneumoniae* ;
g. lorsque le micro- organisme ressemble au *Streptococcus* (catalase négative, cocci Gram- positif en chaînette), mais négatif au test du disque d'optochine et négatif au test de solubilité par la bile, effectuer le PYR test.

h. au cas où le résultat du PYR test est positif, enregistrer le micro- organisme comme étant *Enterococcus species*. Si le résultat du PYR test est négatif, enregistrer le micro- organisme comme étant *Streptococcus* alpha ou gamma hémolytique selon la réaction d'hémolyse ;

9. quand le micro- organisme est un bacille Gram- positif, aucun test additionnel n'est effectué, enregistrer seulement «bacille Gram- positif» ;

10. si des bactéries Gram- négatif sont observées, la référence est faite à l'organigramme ainsi qu'il suit :

Si le micro-organisme pousse sur la gélose au sang et la gélose Mac Conkey faire un test d'oxydase et inoculer une galerie API 20 E. Les Enterobacteriaceae (tels que *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*) sont oxydase- négatifs ; les *Vibrio* et les *Pseudomonas* sont oxydase positive. Si les microorganismes isolés sont identifiés comme étant *Salmonella*, *Shigella* ou *Vibrio*, confirmer le résultat par un test de sérotypage. Enregistrer le résultat de ces différents tests ;

Si le micro-organisme ne pousse que sur la gélose au sang de cheval ou de mouton et sur la gélose chocolat mais ne pousse pas sur la gélose Mac Conkey et est diplocoque Gram- négatif, *Neisseria meningitidis* pourrait être suspecté. Il faudra faire un test d'oxydase. Si l'identification préliminaire indique *Neisseria meningitidis*, le confirmer par un test de sérotypage ;

Si le micro-organisme ne pousse que sur la gélose au sang de cheval ou de mouton et sur la gélose chocolat mais pas sur la gélose Mac Conkey et se présente comme de petits bacilles Gram- négatif, nous pouvons suspecter *Haemophilus influenzae*. Faire un test d'oxydase et un test des facteurs X et V.

Si l'identification indique *Haemophilus influenzae*, le confirmer par un test de sérotypage ;

11. Procéder à un antibiogramme par la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon Kirby- Bauer ;

12. Enregistrer le résultat dans le registre de laboratoire et informer le médecin du patient de l'identification finale.

3.7. LCR

Les procédures suivantes sont suivies pour le traitement et l'examen cyto bactériologique du Liquide Céphalo- Rachidien. [25]

3.7.1. Techniques préliminaires sur les LCR

Les prélèvements sont reçus au laboratoire dans des tubes stériles et sont immédiatement identifiés puis enregistrés dans le registre de laboratoire.

Le reste du travail se fera sous une hotte à flux laminaire.

Les tests sur le LCR sont réalisés dans l'ordre suivant :

1. Nous identifions les boîtes de gélose ainsi que la lame pour le frottis (le numéro d'enregistrement, le type de prélèvement, la date de travail et les initiales du patient sont écrits) ;

2. Nous déposons sur les géloses au sang de cheval et ou chocolat 2 à 3 gouttes de LCR puis les boîtes de gélose sont refermées. Nous laissons imbiber la gélose par le LCR pendant quelques minutes ;

3. Une goutte de LCR est déposée sur une lame propre en vue de confectionner un frottis;

4. Après avoir laissé sécher le frottis, il est fixé par "chauffage" de la lame à l'incinérateur de la hotte pendant 5 secondes au maximum ;

5. Comptage cellulaire du LCR

Nous remplissons l'hémocytomètre de LCR (cellule de Kova) qui est ensuite laissé au repos pendant 2 à 3 min pour le comptage cellulaire ; Le comptage se fait au microscope optique, nous examinons avec objectifs x10 pour la mise au

point à l'aide de la vis macro métrique et la qualité de l'image améliorée à l'aide de la vis micrométrique.

Nous comptons les éléments sur l'ensemble de la cellule à l'objectif x 40 au cas où les éléments figurés sont peu nombreux, dans le cas où les éléments sont nombreux et pratiquement identiques dans les cases de la grille, nous choisissons une case dans laquelle nous comptons les éléments et nous les multiplions par 81 pour obtenir le nombre d'éléments (hématies et ou leucocytes) par mm^3

NB : Ne compter que les cellules situées à l'intérieur des traits de la grille.

Méthode de calcul alternatif : Faire la moyenne des cellules comptées par petits carrés et multiplier par 81 pour obtenir le nombre de cellules par mm^3 ,

6. Nous revenons pour ensemercer les 2 à 3 gouttes de LCR préalablement déposées sur la gélose au sang de cheval ou de mouton et la gélose chocolat.

Les boîtes sont ensuite mises dans l'incubateur à CO_2 en les renversant ;

7. Nous réalisons les tests d'agglutination sur le LCR direct avec le sérum latex Pastorex meningitis kit ou le sérum latex Slidex meningitis sont ensuite réalisés selon la disponibilité, dont le principe est le suivant :

Les réactifs sont constitués de particules de latex sensibilisées par des antisérums spécifiques, permettent, par une technique d'agglutination rapide sur carte, de détecter l'antigène correspondant dans le prélèvement.

Le coffret de Slidex meningitis contient les réactifs suivants:

- réactif R1 : Latex *Haemophilus influenzae* type b
- réactif R2 : Latex *Streptococcus pneumoniae*
- réactif R3 : Latex *Neisseria meningitidis* groupe A
- réactif R4 : Latex *Neisseria meningitidis* groupe B/ *Escherichia coli* K1
- réactif R5 : Latex *Neisseria meningitidis* groupe C
- réactif R6 : Contrôle Positif, extrait antigénique de : *Haemophilus influenzae* type b [26].

Le coffret de Pastorex meningitis kit contient les réactifs suivants:

- réactif R1 : *Neisseria meningitidis* groupe B/ *Escherichia coli* K1
- réactif R2 : *Neisseria meningitidis* groupe B/ *Escherichia coli* K1 contrôle négatif.
- réactif R3 : *Haemophilus influenzae* type b.
- réactif R4 : *Streptococcus pneumoniae*
- réactif R5 : *Streptococcus* groupe B
- réactif R6 : *Neisseria meningitidis* groupe A
- réactif R7 : *Neisseria meningitidis* groupe C
- réactif R8 : *Neisseria meningitidis* groupe Y/W135
- réactif R9 : Contrôle polyvalent négatif
- réactif R10 : Contrôle polyvalent positif. [27]

8. Nous procédons à la coloration de Gram ;

9. Le reste du prélèvement de LCR est gardé au laboratoire sur la paillasse de travail pendant 5 jours.

Les résultats suivants doivent être notifiés au service de pédiatrie dans les deux heures qui suivent la réception du prélèvement au laboratoire, il s'agit :

- du résultat de la coloration de Gram ;
- du résultat du comptage cellulaire ;
- du résultat des tests d'agglutination.

Nous préparons "une fiche de travail LCR" pour y enregistrer le nom du patient, le numéro de dossier ou le numéro de GDH et la date du prélèvement. Tous les résultats des tests sont enregistrés sur cette fiche de travail et saisi sur le support informatique.

3.7.2. Protocole de suivi de la culture des LCR

1. Les géloses au sang et au chocolat sont examinées tous les jours pendant 5 jours et les résultats sont enregistrés sur la fiche de travail et saisi sur le support informatique.

2. Si une colonie bactérienne est observée sur les géloses, une coloration de Gram est effectuée. Les résultats de la coloration de Gram ainsi que la description des colonies sont enregistrés sur la fiche de travail.

Le service de pédiatrie est informé de la positivité de la culture du LCR.

3. Nous suivons les procédures d'identification pour les cultures positives.

3.8. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries

3.8.1. Coloration de Gram

Principe :

La coloration de Gram est la coloration la plus importante dans le laboratoire de microbiologie. Les bactéries peuvent être divisées en micro-organismes Gram-positif et en micro-organismes Gram-négatif. Les bactéries Gram positif retiennent la coloration violette du Violet de Gentiane (ou du Cristal Violet) et auront une teinte bleue au microscope.

Les bactéries Gram négatif peuvent être décolorées, leur enlevant ainsi la coloration violette du Violet de Gentiane avec une solution d'alcool acétone. Les bactéries sont ensuite colorées en rouge avec la safranine (ou la fuschine basique).

C'est parce que la coloration de Gram est très importante, qu'elle doit être accomplie avec le plus grand soin.

Matériels et réactifs utilisés :

- Microscope binoculaire avec objectifs 10 et 100 ;
- Huile à immersion ;
- Coffret de colorants de Gram contenant :
 - Violet de gentiane ou cristal violet
 - Solution de lugol
 - Solution de décolorant alcool acétone
 - Safranine ou fuschine basique
- Lames porte- objet

- Portoir de lame
- Crayon de papier
- Papier buvard
- Flacon d'eau distillée
- Bac de coloration

Procédure de la coloration :

1. Utiliser une lame propre sur laquelle sont écrits le nom du patient et l'identification du spécimen avec un crayon de papier. Ne pas utiliser de stylo à bille ;
2. Etaler l'échantillon en un frottis mince sur la lame de verre afin de permettre au frottis de sécher à l'air libre. Ne pas surtout chauffer la lame pour faire sécher rapidement le frottis ;
3. Lorsque la lame est complètement séchée, la tenir contre l'incinérateur jusqu'à ce qu'elle soit tiède sans être brûlante au toucher ;
4. Recouvrir le frottis de lame avec le Violet de Gentiane pendant 30 à 40 secondes
5. Verser le surplus de la solution de Violet de Gentiane et rincer la lame avec un jet d'eau faible et ensuite égoutter l'excès d'eau. Utiliser un faible jet d'eau pour laver la lame, si non le spécimen se détache de la lame ;
6. Recouvrir le frottis avec la solution Iode- iodure (Solution de Lugol) pendant 30 à 40 secondes ;
7. Verser la solution de Lugol de la lame et la rincer avec un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau ;
8. Goutte à goutte la solution de décolorant alcool -acétone est versée sur la lame de manière à recouvrir entièrement le frottis ;
9. Immédiatement après, rincer la lame avec un faible jet d'eau. L'excès d'eau est égoutté ;

Note : Si la solution alcool- acétone reste trop longtemps sur la lame, les micro-organismes Gram- positif pourraient apparaître comme Gram- négatif.

10. Recouvrir le frottis avec la solution de safranine (ou la fuschine basique) pendant 60 secondes (2 fois plus longtemps que les autres étapes) ;

11. Verser la safranine qui une minute plu tard est rincée en tenant la lame sous un faible jet d'eau, l'excès d'eau est égoutté. Prudemment, sécher la lame avec du papier buvard. Ne pas surtout frotter la lame pour la faire sécher.

Interprétation :

La clé dans l'interprétation de la coloration de Gram est d'identifier la morphologie des micro-organismes (exemple : cocci, bacilles) ainsi que leur relation les uns par rapport aux autres (exemple : cellules isolées, en paires, en chaînettes et en grappes). La reconnaissance de ces caractéristiques peut aider à l'interprétation de la coloration de Gram.

Par exemple

Cocci Gram- positif en grappes = Staphylocoques

Note : Aucun cocci Gram- négatif en grappes n'existe, ainsi les cellules qui apparaissent Gram- négatif sont probablement des cocci Gram- positif qui ont été décolorés trop longtemps.

Cocci Gram- positif en chaînettes = Streptocoques.

Note : Il n'existe pas de cocci Gram- négatif en chaînettes.

Cocci Gram- positif en paires = *Streptococcus pneumoniae* ou *Enterococcus*

Note : Ces cocci sont allongés et attachés par leur bout.

Bacilles Gram- positif : égale plusieurs micro-organismes

Note : Il existe plusieurs bacilles Gram- positif comprenant *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*.

Cocci Gram- négatif en paires = *Neisseria*

Note : Les cocci Gram- négatif les plus connus sont arrangés en pair (diplocoques) et attachés par leur côté. Ils ressemblent à des grains de café.

Bacilles Gram- négatif = Plusieurs micro- organismes

Note : Il existe plusieurs bacilles Gram- négatif comprenant *Klebsiella*, *Haemophilus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, etc.

3.8.2. Tests biochimiques et métaboliques :

3.8.2.1. Oxydase

Principe :

Le test d'Oxydase est un examen rapide, utilisé pour identifier les bactéries Gram- négatif. Cet examen est utilisé comme un indicateur redox qui passe d'une teinte incolore (quand c'est réduit) à une couleur violet- foncé (quand c'est oxydé). Les bactéries qui possèdent le cytochrome C sont capables d'éliminer des électrons (oxyde) de cet indicateur redox, cause pour laquelle la couleur change.

Matériels et réactifs utilisés :

Papier buvard

Anse

Réactif d'oxydase : Phénylène- diamine

Procédure :

- Avec un écouvillon stérile prendre une à deux colonies de bactéries bien isolées dans une boîte de gélose (Ne pas utiliser une gélose MacConkey)
- Placer une à deux gouttes d'oxydase sur l'écouvillon.

Interprétation :

Réaction positive = développement d'une couleur violette dans un intervalle de 10 à 30 secondes.

Réaction négative = aucune couleur ne se développe au bout de 30 secondes. Ne pas lire le test après 30 secondes à cause des faux positifs qui peuvent se développer.

Contrôle de Qualité :

- Le test d'oxydase est très important pour l'identification des bactéries Gram- négatif. Les bactéries, oxydase positives, les plus connues sont *Neisseria*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*. Les bactéries, oxydase négatives, les plus

connues sont les Enterobacteriaceae, une grande famille de bactéries qui inclut *Klebsiella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*.

- Un test d'oxydase ne peut pas être réalisé avec des colonies de bactéries isolées sur une gélose Mac Conkey parce que les colorations dans la gélose pourraient causer une réaction faussement positive.

3.8.2.2. Galeries classiques pour entérobactéries

3.8.2.2.1. Test à l'ONPG

Principe :

Bien que certaines bactéries possèdent une enzyme intracellulaire (E) capable de scinder la molécule de lactose en galactose et glucose (sucre fermenté par toutes les entérobactéries), comme par exemple la bêta galactosidase (en abrégé β gal) ; elles ne fermentent pas ou fermentent tardivement le lactose.

Chez les bactéries, une autre enzyme (P) (perméase par exemple la galactoside perméase), qui permet la pénétration du lactose dans la cellule bactérienne, est absente ou n'est pas fonctionnelle.

Le test ONPG est une méthode simple et rapide, qui permet de rechercher directement l'enzyme (E) et par suite de distinguer les bactéries potentiellement lactose positives des bactéries lactose négatives.

Il présente un grand intérêt diagnostique : comme le lactose, l'ONPG (= Orthonitrophényl – β – galactopyranoside) composé incolore, est scindé par l'enzyme (E) en libérant de l'orthonitrophénol soluble en jaune.

Klebsiella est ONPG positive

3.8.2.2.2. Recherche de l'uréase

Principe

L'uréase est mise en évidence au moyen du milieu «urée indole » ; milieu synthétique utilisé pour rechercher simultanément L'uréase, la tryptophane – désaminase (TDA) et la production d'indole

Dans ce milieu tamponné, les bactéries qui possèdent une uréase suffisamment active, transforment l'urée en carbonate d'ammonium, selon la réaction :



Il en résulte une alcalinisation du milieu dans des délais plus ou moins rapides.

3.8.2.2.3 Recherche de l'indole

Principe

Certaines bactéries possèdent une tryptophanase, capable de scinder la molécule de tryptophane en donnant de l'indole suivant la réaction :

A partir de la culture en eau peptonée ou de suspension bactérienne en milieu « urée – indole » ; qui fermentent toutes deux du tryptophane, on peut rechercher la production d'indole à l'aide du réactif de Kovacs (anneau rouge). La présence d'indole est relevée par un anneau rouge en surface.

3.8.2.2.4 Recherche du thiosulfate- réductase (production de H₂S)

Principe :

Cette enzyme permet de réduire $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$ en S^{--} . L'anion S peut être relevé grâce à la coloration noire de certains sulfures métalliques : sulfure de fer (milieu Hajna-Kligler), sulfure de plomb (gélose au sous – acétate de plomb)

3.8.2.2.5 Réaction de Voges- Proskauer

Principe :

Les bactéries dites Voges – Proskauer positives (VP^+) possèdent une voie métabolique particulière dans la fermentation des hexoses. A partir de l'acide pyruvique $\text{CH}_3\text{CO} - \text{COOH}$, produit d'oxydation du glucose, elles peuvent former de l'acétyl méthyle carbinol (= acétoïne) : $\text{CH}_3\text{CO} - \text{CHOH} - \text{CH}_3$ et du butane diol 2-3 : $\text{CH}_3 - \text{CHOH} - \text{CHOH} - \text{CH}_3$.

La présence de ces deux composés est décelée par la réaction de VP : en milieu fortement alcalin, ils sont oxydés en diacétyl : $\text{CH}_3 \text{CO} - \text{COCH}_3$, qui réagit avec le groupement guanidine des peptones pour produire un complexe de couleur rose rouge cerise ; l'alpha – naphтол accélère cette réaction colorée.

D'une façon générale, les produits de dégradation obtenus par les bactéries qui possèdent cette voie métabolique, présentent une réaction peu acide (virage au jaune du rouge de méthyle : RM^+)

3.8.2.2.6 Milieu synthétique au citrate de Simmons

Principe : Le milieu au citrate de Simmons est un milieu minéral synthétique tamponné avec comme source d'azote un sel d'ammonium et comme source unique de carbone et d'énergie du citrate, dont l'utilisation en aérobiose par certaines bactéries se traduit par leur croissance et l'alcalisation du milieu. Les entérobactéries, qui exigent des facteurs de croissance auxotrophes, (par exemple : *Salmonella Typhi* et les *Shigella*), ne peuvent pas pousser sur ce milieu.

3.8.2.2.7 Recherche des décarboxylases et dihydrolase (LDC, ODC, ADH)

Principe : Les décarboxylases sont des enzymes qui décarboxylent les acides aminés en formant l'amine correspondante avec dégagement de CO₂.

Les décarboxylases présentant un intérêt taxonomique sont :

- la lysine – décarboxylase ou LDC (lysine → cadavérine) ;
- l'ornithine – décarboxylase ou ODC (ornithine putrescine) ;
- l'arginine – décarboxylase et dihydrolase ou ADH (arginine → agmatine et ornithine). [28]

Le milieu de Hajna-Kligler :

Le milieu de Hajna-Kligler est un milieu complexe, qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques. Il est très utilisé dans l'identification des Entérobactéries.

Milieu urée – indole :

- Milieu urée – indole On utilise ce milieu pour mettre en évidence la décomposition de l'urée (présence d'uréase).

3.8.2.3. Galerie API 20^E



Figure 10: Galerie pour l'identification des entérobactéries et autres BGN.

Le système d'identification API 20E est utilisé pour l'identification des entérobactéries et d'autres bacilles Gram négatif qui poussent facilement. Le système consiste en une galerie de 20 microtubes contenant les substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne, incubés pendant la nuit dans un incubateur en aérobiose, et ensuite interprétés.

3.9. Test de sensibilité des antibiotiques : méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon Kirby- Bauer

Ce procédé définit l'utilisation de la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques in vitro selon Kirby- Bauer. Pour tester la sensibilité, d'importants isolats en clinique. Les résultats de cet examen peuvent aider les médecins dans la sélection de l'antibiotique approprié pour la thérapie.

Principe :

La méthode de diffusion des disques selon Kirby- Bauer est basée sur l'observation qu'il y a une corrélation entre la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et le diamètre de la zone d'inhibition de croissance bactérienne autour d'un disque d'antibiotique. La taille de la zone d'inhibition de croissance est déterminée par la sensibilité du micro-organisme à l'antibiotique, la concentration du disque d'antibiotique, le taux de diffusion de l'antibiotique du disque et le taux de croissance du micro-organisme. En standardisant les conditions du test (exemple : préparation d'un seul antibiotique contenu dans le disque, milieu de culture spécial, atmosphère et durée d'incubation) et avec une

concentration du micro- organisme du test, la zone d'inhibition mesurée sera corrélée avec la sensibilité du micro-organisme à l'antibiotique (exemple : plus la zone est grande, plus l'organisme est sensible).

Le test doit être exécuté exactement comme décrit sinon les résultats ne seront pas précis.

3.10. Conservation des cultures pures.

Les laboratoires de bactériologie ont le désir et le souci de conserver les cultures des différentes espèces bactériennes isolées. Ces cultures servent de souches de référence. Elles sont fréquemment utilisées pour l'enseignement, le contrôle ou pour la recherche. L'intérêt de se référer à des souches standard est devenu si évident que des organisations nationales ou internationales se sont créées à cet effet. Leur but est le maintien en cultures pures des microorganismes tels que les levures, les champignons inférieurs, les bactéries, les rickettsies et les virus.

L'une des plus célèbres est l'«American Type Culture Collection» (ATCC) située à Rockville aux Etats-Unis. En Angleterre, la plus connue est la «National Collection of Type Cultures» (NCTC). En France, la plus importante est celle de l'Institut Pasteur de Paris (IPP). Lorsqu'une nouvelle espèce est isolée, il est recommandé de l'envoyer dans plusieurs de ces collections internationales pour la faire connaître.

Deux possibilités sont offertes aux collectionneurs pour maintenir les souches en survie et leur conserver toutes leurs propriétés. On peut simplement les cultiver sur des milieux adaptés et les transférer périodiquement sur des milieux neufs. Il est nécessaire de bien connaître le milieu le plus convenable, la température la plus favorable et la durée limite de stockage. Les précautions élémentaires suivantes sont prises pour assurer cette conservation :

1. La dessiccation du milieu est évitée en bouchant soigneusement l'orifice des tubes de culture ou mieux en les scellant au chalumeau.

2. La culture est conservée à l'abri de la lumière ou à la température du laboratoire ou dans les meilleures conditions, au réfrigérateur (+ 4° C).
3. Le milieu de culture est dans le cas le plus général une gélose nutritive inclinée, ensemencée en plusieurs points ou une gélose nutritive en culot, ensemencée par piqûre centrale.

Ainsi peut-on procéder avec les bactéries à croissance rapide comme le sont les Entérobactéries, les Staphylocoques, etc. Pour de nombreux autres germes, on aura recours à des milieux particuliers : sérum coagulé pour les Corynébactéries, gélose pomme de terre pour les *Brucella*, gélose sans peptone pour les *Bacillus*, etc.

Les souches isolées dans notre cas d'étude sont conservées par congélation. Deux paramètres importants parmi d'autres conditionnent sa mise en œuvre : le choix de la température et surtout la vitesse d'abaissement à la température choisie.

Pour conserver dans les meilleures conditions les structures cellulaires, il convient de les congeler à la température la plus basse et d'y parvenir dans les délais les plus brefs.

Les souches sont conservées dans un congélateur de -90° C à - 65° C.

Chaque souche porte une étiquette d'identification.

E B T / D
N° B-P
N° D et G I
I P /E ₂

E = Etage du congélateur ; B = Bloc ; T = Tiroir ; D = Date

N° B-P : Numéro de la Boîte et Position de la souche

N° D et G I : Numéro de Dossier du patient et Germe Isolé

I P /E₂ : Initiale du Patient /Etude 2. [20]

4. Résultats

Nous tenons à préciser que :

- La vaccination anti- Hib fut d'installation progressive de juillet 2005 à juin 2006 et nous avons présenté nos résultats en fonction de la durée de notre étude en suivant le calendrier qui suit :

Période prévaccinale : janvier 2003 à décembre 2005 ;

Période post- vaccinale : janvier 2006 à décembre 2008.

- Seul le résultat de la culture finale a été pris en compte pour les germes.

Tableau VI : Fréquences d'isolement de Hib dans les hémocultures avant et après l'introduction du pentavalent la dans le PEV.

Echantillons Périodes	Positifs	Pourcentage %	Négatifs	Pourcentage %	Total
Pré- vaccinale : de 2003 à 2005	369	67,21	7243	37,53	7612
Post- vaccinale : de 2006 à 2008	180	32,79	12058	62,47	12238
Total	549	100,00	19301	100,00	19858

La différence entre les deux périodes est très significative avec $\text{Khi}^2 = 198,99$ et $p = 10^{-7}$.

Tableau VII: Evolution de l'isolement de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures selon les années de l'étude.

Désignations Années	Nombre de Prélèvements annuels	<i>Haemophilus influenzae</i> type b		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
		Effectifs	Pourcentages (%)	Effectif	Pourcentages (%)
2003	1672	99	5,92	100	5,98
2004	1843	122	6,62	115	6,24
2005	4097	148	3,61	178	4,34
2006	4375	96	2,19	221	5,05
2007	2913	42	1,44	153	5,25
2008	4950	42	0,85	187	3,78

La fréquence d'isolement annuelle de *Haemophilus influenzae* type b diminue progressivement à partir de 2006.

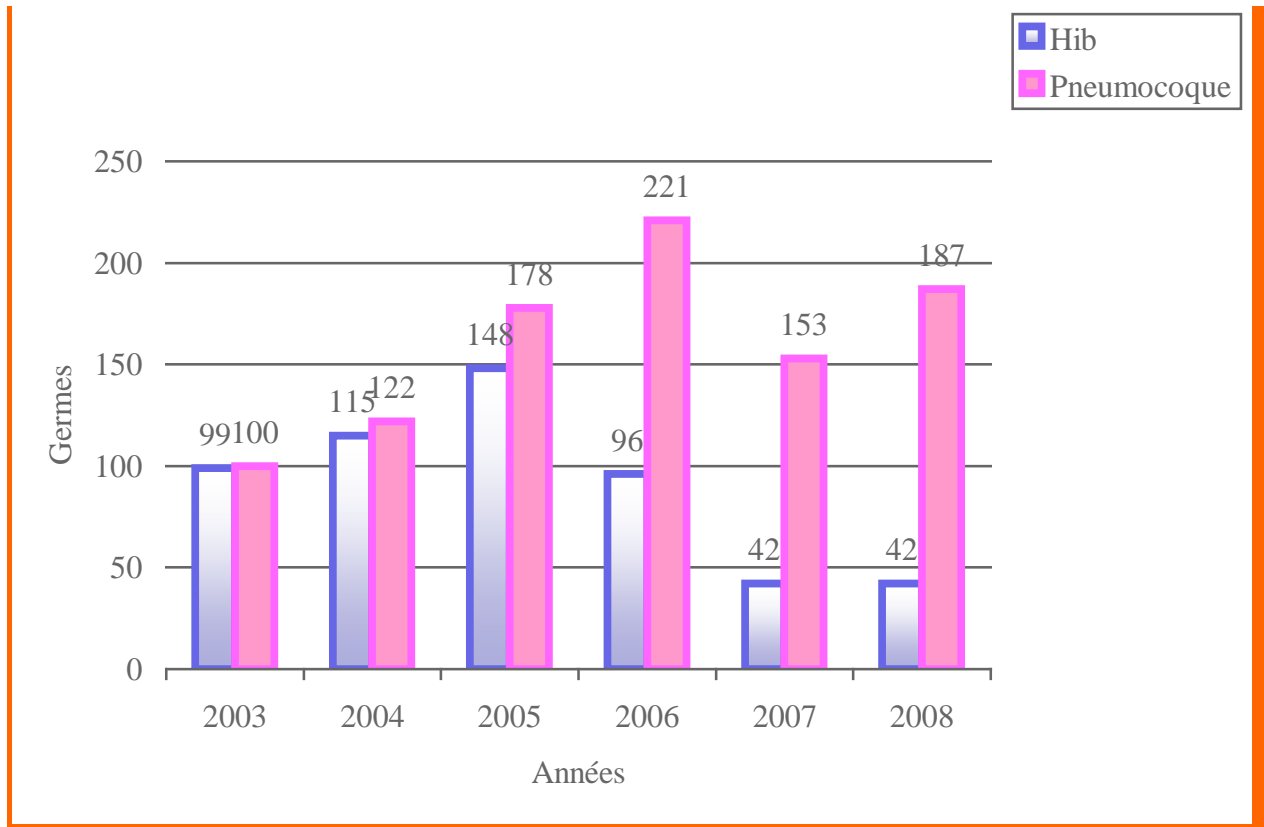


Figure11 : Représentation graphique des fréquences d'isolement annuelles de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures.

► Période pré- vaccinale

Tableau VIII : Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2003.

Germes	<i>Haemophilus influenzae</i> type b		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	Effectifs	Pourcentages (%)	Effectifs	Pourcentages (%)
Mois				
Janvier	03	3,03	06	6,00
Février	06	6,06	09	9,00
Mars	11	11,11	16	16,00
Avril	10	10,10	08	8,00
Mai	09	9,09	06	6,00
Juin	07	7,07	10	10,00
Juillet	07	7,07	05	5,00
Août	08	8,09	07	7,00
Septembre	09	9,09	07	7,00
Octobre	10	10,10	03	3,00
Novembre	09	9,09	06	6,00
Décembre	10	10,10	17	17,00
Total	99	100,00	100	100,00

Nous avons observé les pics de Hib et de streptocoque respectivement en mars : 11 cas soit 11,11% et décembre : 17 cas soit 17,00%.

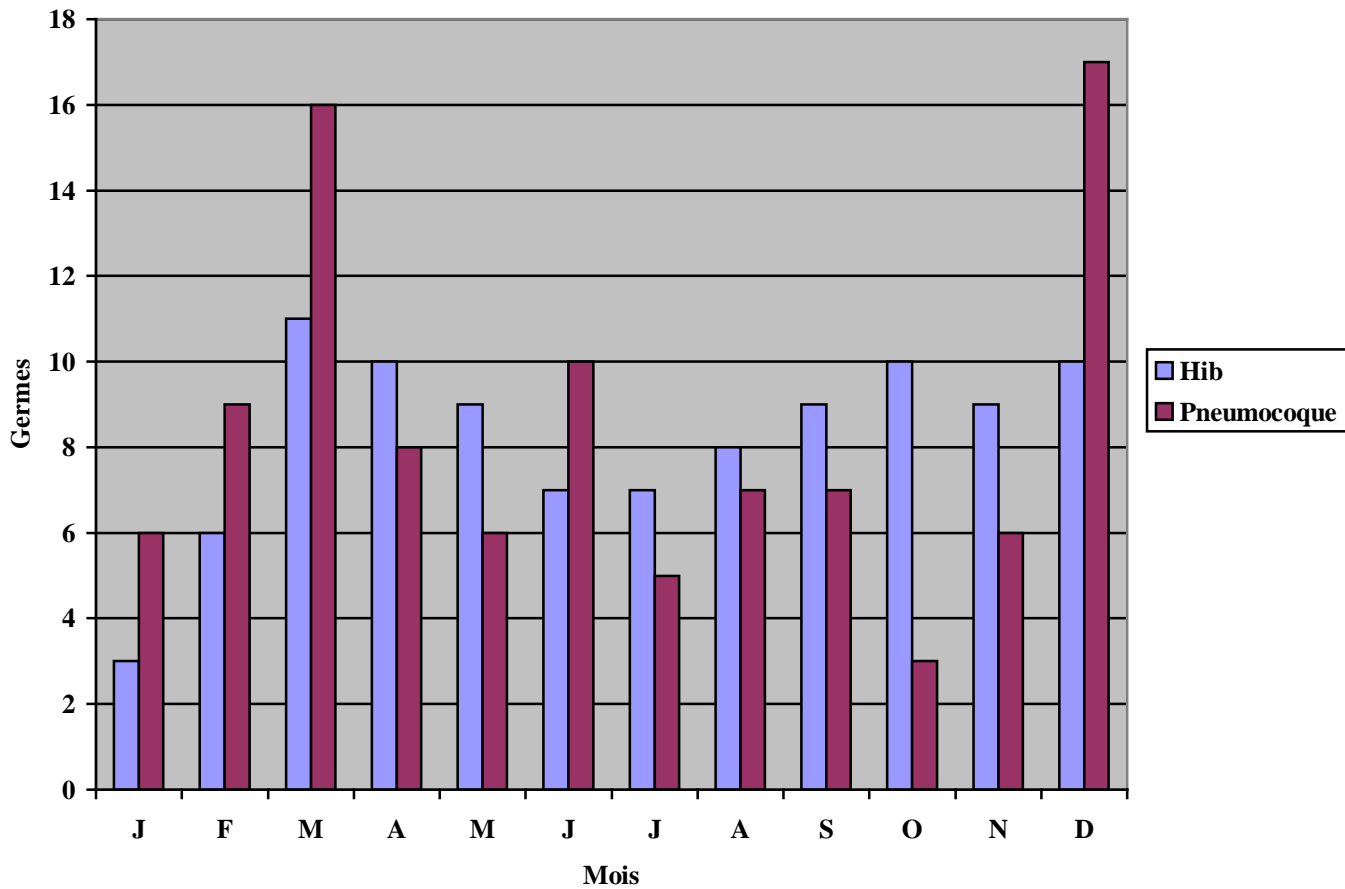


Figure 12 : Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2003.

Tableau IX : Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2004.

Germes	<i>Haemophilus influenzae</i> type b		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	Effectifs	Pourcentages (%)	Effectifs	Pourcentages (%)
Mois				
Janvier	13	10,65	06	5,22
Février	12	9,84	05	4,35
Mars	15	12,29	07	6,08
Avril	16	13,11	09	7,83
Mai	17	13,93	15	13,04
Juin	07	5,74	11	9,57
Juillet	04	3,28	12	10,43
Août	08	6,56	11	9,57
Septembre	07	5,74	14	12,17
Octobre	05	4,10	07	6,08
Novembre	11	9,02	10	8,70
Décembre	07	5,74	08	6,96
Total	122	100,00	115	100,00

Nous avons observé les pics de Hib et de streptocoque respectivement en mai : 17 cas soit 13,93% et en mai : 15 cas soit 13,04%.

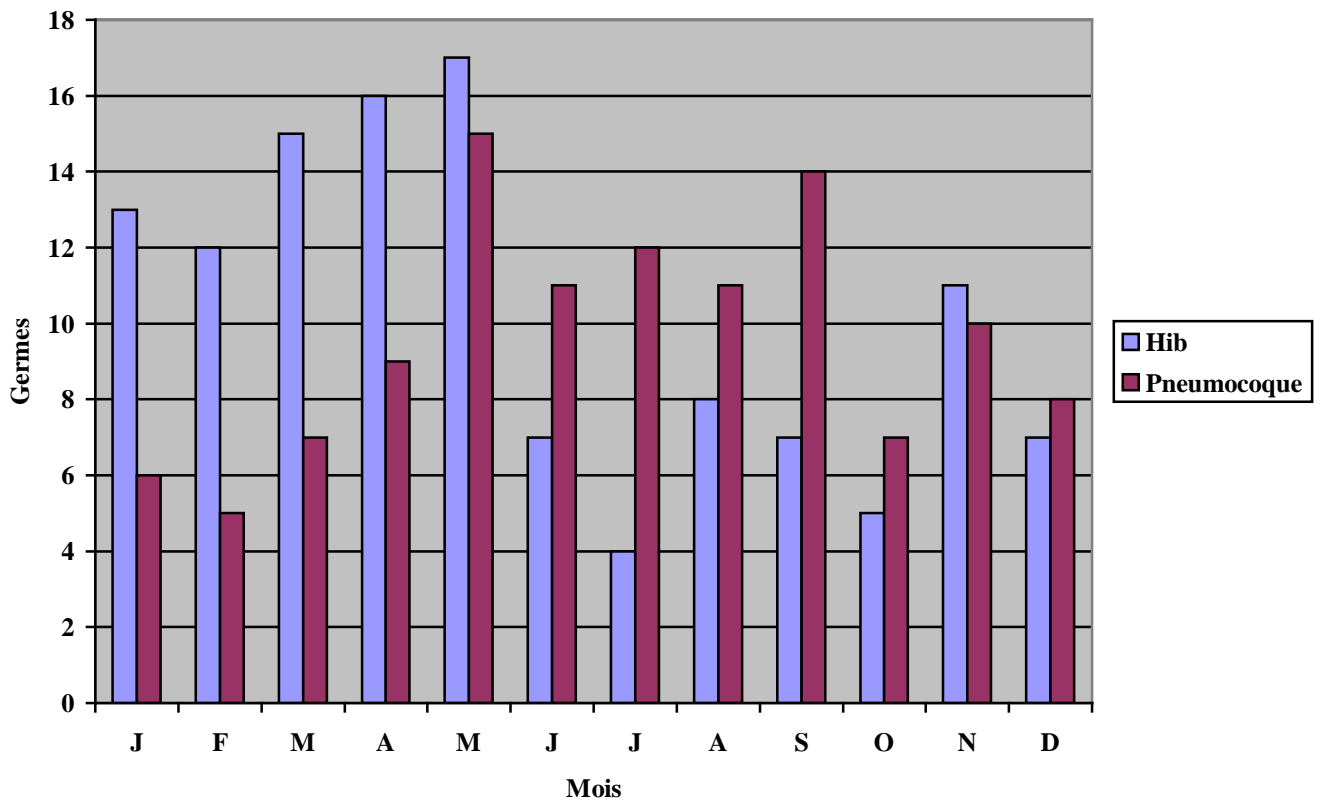


Figure 13: Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2004.

Tableau X : Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2005.

Germes	<i>Haemophilus influenzae</i> type b		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	Effectifs	Pourcentages (%)	Effectifs	Pourcentages (%)
Mois				
Janvier	06	4,05	12	6,74
Février	05	3,38	22	12,36
Mars	12	8,11	12	6,74
Avril	13	8,78	15	8,42
Mai	15	10,14	13	7,30
Juin	14	9,46	28	15,73
Juillet	17	11,49	16	8,99
Août	18	12,16	09	5,06
Septembre	21	14,19	17	9,55
Octobre	15	10,14	14	7,87
Novembre	06	4,05	09	5,06
Décembre	06	4,05	11	6,18
Total	148	100,00	178	100,00

Le mois de septembre a enregistré le plus grand nombre de Hib : 21 cas soit 14,19% et juin pour le streptocoque : 28 cas soit 15,73%.

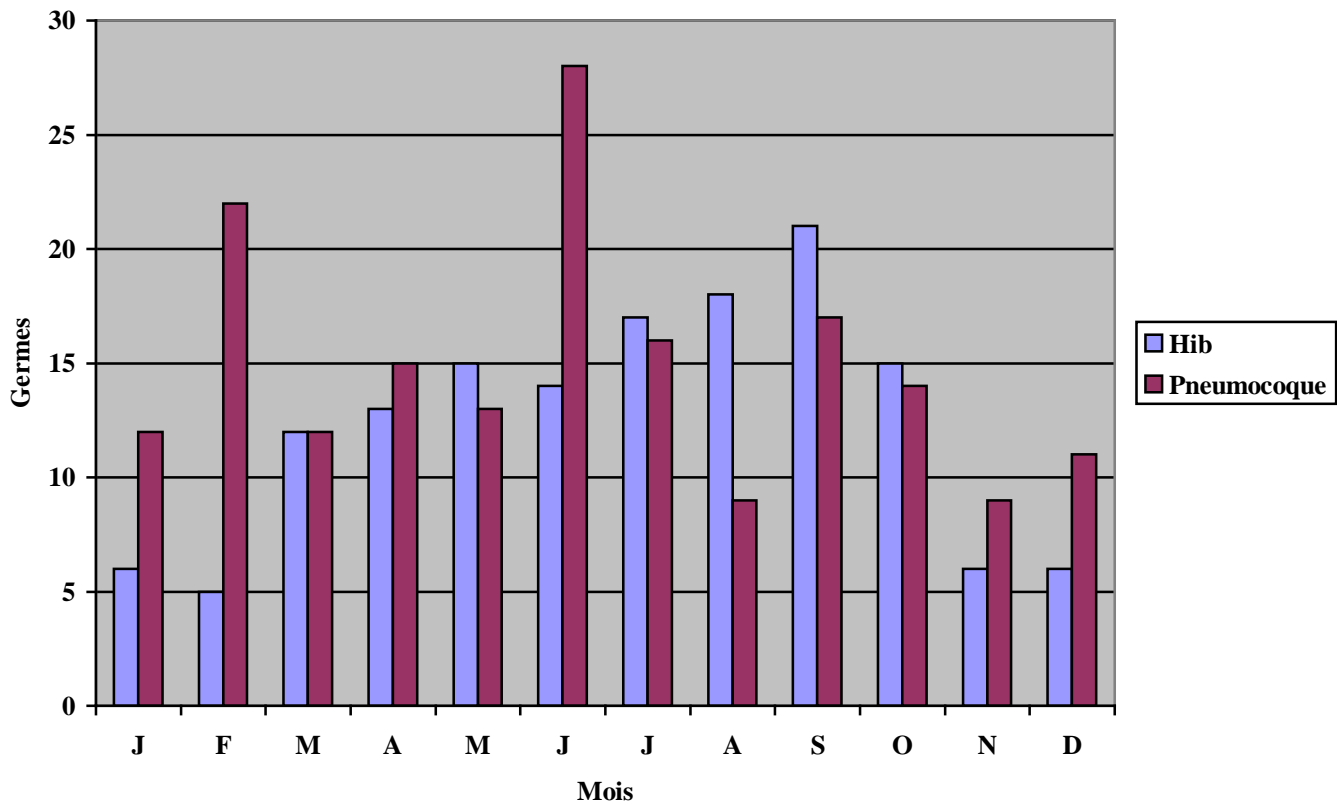


Figure14 : Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2005.

► Période post- vaccinale

Tableau XI : Fréquences d'isolement mensuelles t de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2006.

Germes	<i>Haemophilus influenzae</i> type b		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	Effectifs	Pourcentages (%)	Effectifs	Pourcentages (%)
Mois				
Janvier	15	15,63	20	9,05
Février	07	7,29	25	11,31
Mars	10	10,42	23	10,41
Avril	09	9,37	37	16,74
Mai	09	9,37	24	10,86
Juin	08	8,33	17	7,69
Juillet	05	5,21	11	4,98
Août	03	3,13	10	4,52
Septembre	10	10,42	12	5,43
Octobre	11	11,45	17	7,69
Novembre	05	5,21	06	2,72
Décembre	04	4,17	19	8,60
Total	96	100,00	221	100,00

Nous avons observé les pics de Hib et de streptocoque respectivement en janvier : 15 cas soit 15,63% et en Avril : 37 cas soit 16,74%.

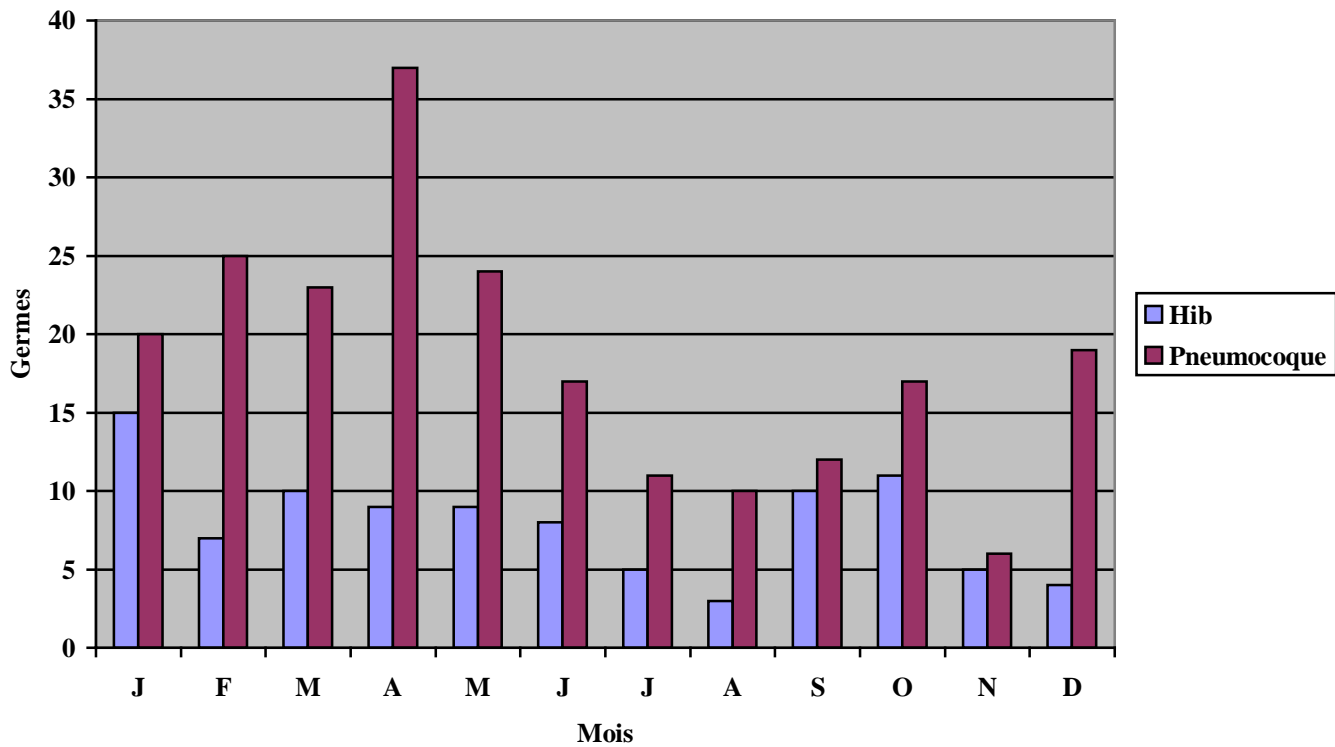


Figure 15 : Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2006.

Tableau XII : Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2007.

Germes	<i>Haemophilus influenzae</i> type b		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	Effectifs	Pourcentages (%)	Effectifs	Pourcentages (%)
Mois				
Janvier	07	16,67	21	13,73
Février	04	9,53	18	11,76
Mars	02	4,76	18	11,76
Avril	02	4,76	11	7,19
Mai	04	9,53	16	10,46
Juin	03	7,14	11	7,19
Juillet	06	14,29	09	5,88
Août	03	7,14	07	4,58
Septembre	03	7,14	07	4,58
Octobre	02	4,76	07	4,58
Novembre	01	2,38	09	5,88
Décembre	05	11,90	19	12,41
Total	42	100,00	153	100,00

Nous avons observé les pics de Hib et de streptocoque en janvier respectivement : 07 cas soit 16,67% et 21 cas soit 13,73%.

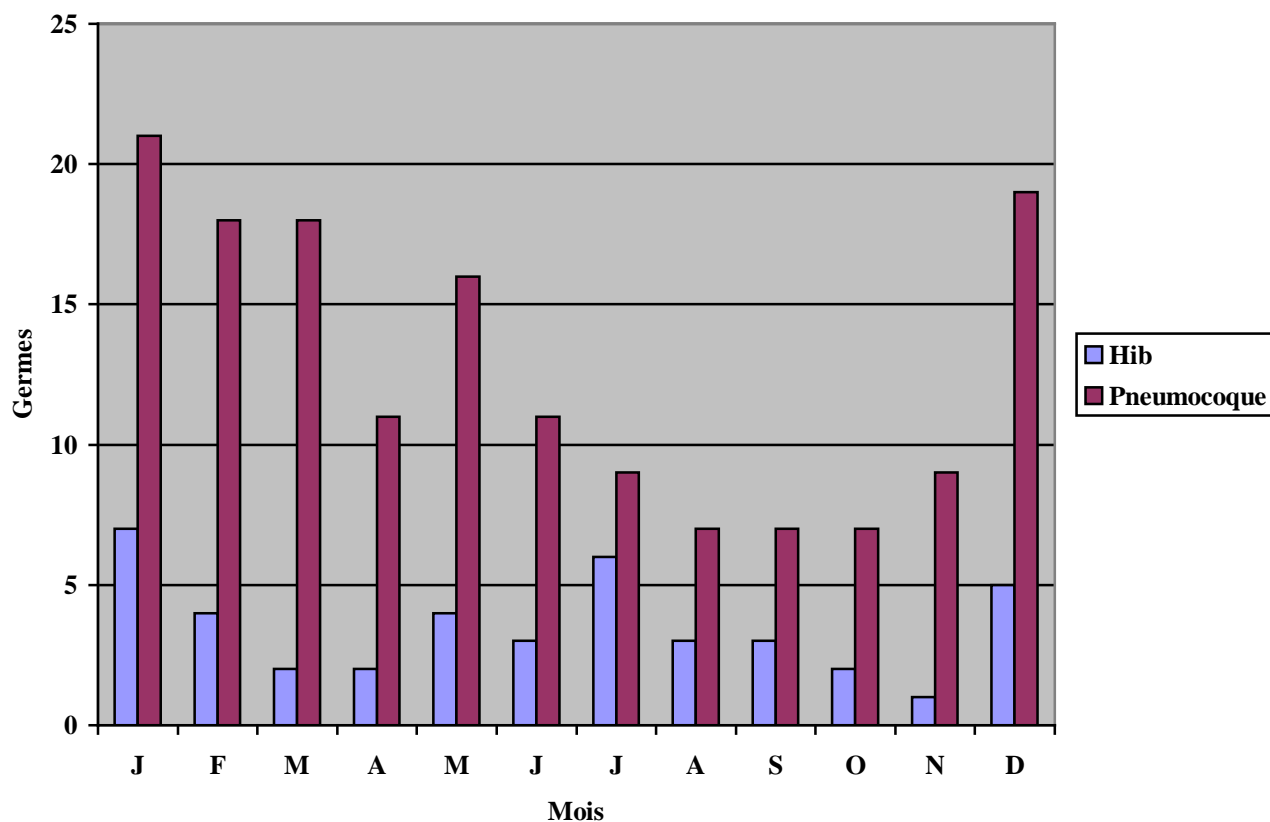


Figure 16 : Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2007.

Tableau XIII : Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2008.

Germes	<i>Haemophilus influenzae</i> type b		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	Effectifs	Pourcentages (%)	Effectifs	Pourcentages (%)
Mois				
Janvier	05	11,90	20	10,70
Février	02	4,76	11	5,88
Mars	03	7,14	26	13,90
Avril	04	9,53	14	7,49
Mai	04	9,53	23	12,30
Juin	04	9,53	13	6,95
Juillet	04	9,53	12	6,42
Août	03	7,14	12	6,42
Septembre	02	4,76	12	6,42
Octobre	04	9,53	08	4,28
Novembre	03	7,14	18	9,62
Décembre	04	9,53	18	9,62
Total	42	100,00	187	100,00

Nous avons observé les pics de Hib et de streptocoque respectivement en Janvier : 05 cas soit 11,90% et en mars : 26 cas soit 13,90%.

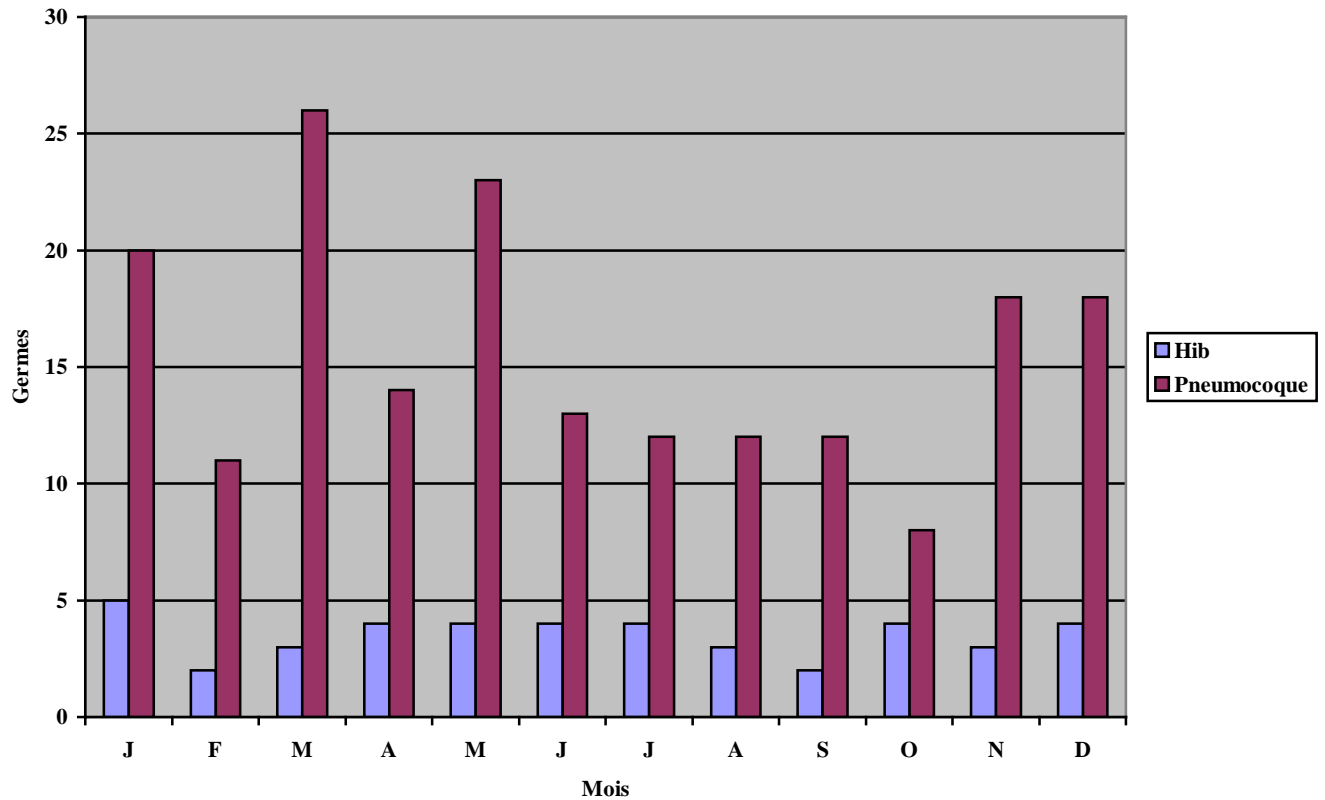


Figure 17 : Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures. Cas de 2008.

4.2. Données concernant les LCR

Tableau XIV : Résultat des LCR de 2003 à 2008.

DESIGNATIONS	ANNEES						TOTAL	%
	2003	2004	2005	2006	2007	2008		
Total	981	1038	1408	1252	649	1266	6594	100
Résultats négatifs	482	523	1197	1098	524	1068	4892	74,19
Résultats positifs	499	515	211	154	125	198	1702	25,81
Germes identifiés								
<i>Haemophilus influenzae</i> type b	75	87	108	54	26	27	377	5,72
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	68	77	71	83	62	77	438	6,64
<i>Salmonella enterica</i>	14	06	00	1	00	00	21	0,32
<i>Neisseria meningitidis</i> type A	18	09	02	9	32	81	151	2,29
<i>Escherichia coli</i>	05	05	02	1	00	01	14	0,21
<i>Neisseria meningitidis</i> W135	08	06	00	00	01	01	16	0,24
<i>Neisseria Meningitidis non typé</i>	00	00	00	00	00	01	01	0,02
<i>Salmonella Typhi</i>	01	04	01	1	00	00	07	0,11
<i>Proteus mirabilis</i>	04	03	01	00	01	00	09	0,13
<i>Neisseria spp</i>	02	00	00	00	00	03	05	0,08
<i>Streptococcus non hémolytique</i>	02	04	01	1	00	00	08	0,12
<i>Staphylococcus aureus</i>	02	02	04	1	00	01	10	0,15
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	01	01	00	00	00	00	02	0,03
<i>Streptococcus</i> groupe B	01	03	00	00	00	00	04	0,06
<i>Salmonella paratyphi</i> B	01	03	05	01	00	00	09	0,13
<i>Enterococcus spp</i>	02	01	01	00	00	01	05	0,08
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	02	01	00	00	01	01	05	0,08
<i>Pseudomonas putida</i>	01	01	00	00	00	00	02	0,03
<i>Moraxella specie</i>	01	01	00	00	00	00	02	0,03
<i>Klebsiella arizonae</i>	01	01	00	00	00	00	02	0,03
<i>Acinetobacter calco. var anitratus</i>	01	02	00	00	00	00	03	0,05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	01	01	00	00	01	00	03	0,05
<i>Enterobacter agglumera</i>	01	01	00	01	00	01	04	0,06
<i>CDC groupe V</i>	00	00	00	00	00	01	01	0,02
<i>Alcaligines spp</i>	00	00	00	00	00	01	01	0,02
<i>Citrobacter freundii</i>	01	01	00	00	00	00	02	0,03
<i>Morganella morganii</i>	01	01	00	00	00	00	02	0,03
<i>Salmonella paratyphi</i> A	01	00	00	00	00	00	01	0,02
<i>Enterobacter cloacae</i>	00	01	01	00	00	00	02	0,03
<i>Enterobacter sakasakii</i>	00	01	00	00	00	00	01	0,02
<i>Flavobacter meningoseptocum</i>	00	00	01	00	00	00	01	0,02
<i>Pseudomonas fluorescent</i>	00	00	00	00	01	00	01	0,02
Contaminants								
<i>Staphylococcus non aureus</i> (SNA)	248	252	09	00	00	01	510	7,73
Bacilles Gram- positif (BGP)	34	36	03	01	00	00	74	1,12
Levures	02	04	00	00	00	00	06	0,09

Le Hib et le pneumocoque représentent les deux germes pathogènes les plus souvent isolés des LCR.

Tableau XV : Fréquences d'isolement de Hib dans les LCR avant et après l'introduction du pentavalent dans le PEV.

Echantillons / Périodes	Positifs	Pourcentage %	Négatifs	Pourcentage %	Total
Pré- vaccinale : de 2003 à 2005	270	68,88	3157	50,90	3427
Post-vaccinale : de 2006 à 2008	122	31,12	3045	49,10	3167
Total	392	100,00	6202	100,00	6594

La différence entre les deux périodes est très significative avec $\text{Khi}^2 = 47,72$ et $p = 10^{-7}$.

Tableau XVI: Fréquences d'isolement de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR selon les années de l'étude.

Désignations / Années	Nombre total de Prélèvements	<i>Haemophilus influenzae</i> Type b		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
		Effectifs	Pourcentages (%)	Effectifs	Pourcentages (%)
2003	981	75	7,65	68	6,93
2004	1038	87	8,38	77	7,42
2005	1408	108	7,67	71	5,04
2006	1252	54	4,31	83	4,95
2007	649	26	4,01	62	9,55
2008	1266	42	3,32	60	4,74

La fréquence d'isolement du Hib diminue progressivement dans les LCR à partir de 2006.

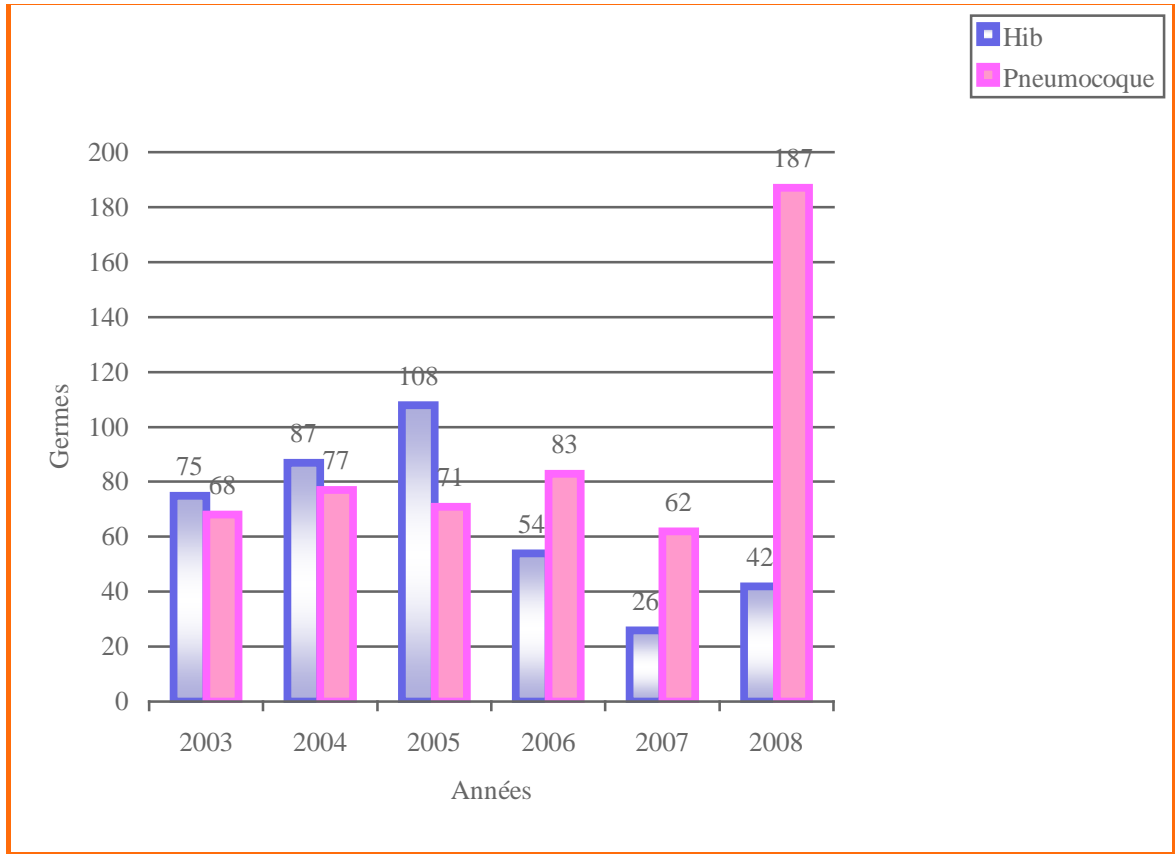


Figure 18: Représentation graphique des fréquences d'isolement annuelles de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR.

► Période pré- vaccinale

Tableau XVII : Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2003.

Germes	<i>Haemophilus influenzae</i> type b		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	Effectifs	Pourcentages (%)	Effectifs	Pourcentages (%)
Mois				
Janvier	03	4,00	02	2,95
Février	07	9,33	07	10,29
Mars	03	4,00	03	4,41
Avril	05	6,67	06	8,82
Mai	05	6,67	10	14,71
Juin	03	4,00	03	4,41
Juillet	05	6,67	06	8,82
Août	03	4,00	06	8,82
Septembre	08	10,66	05	7,35
Octobre	10	13,33	02	2,95
Novembre	12	16,00	06	8,82
Décembre	11	14,67	12	17,65
Total	75	100,00	68	100,00

Le mois de novembre a enregistré le plus grand nombre de Hib : 12 cas soit 16,00% et décembre pour le streptocoque : 12 cas soit 17,65%.

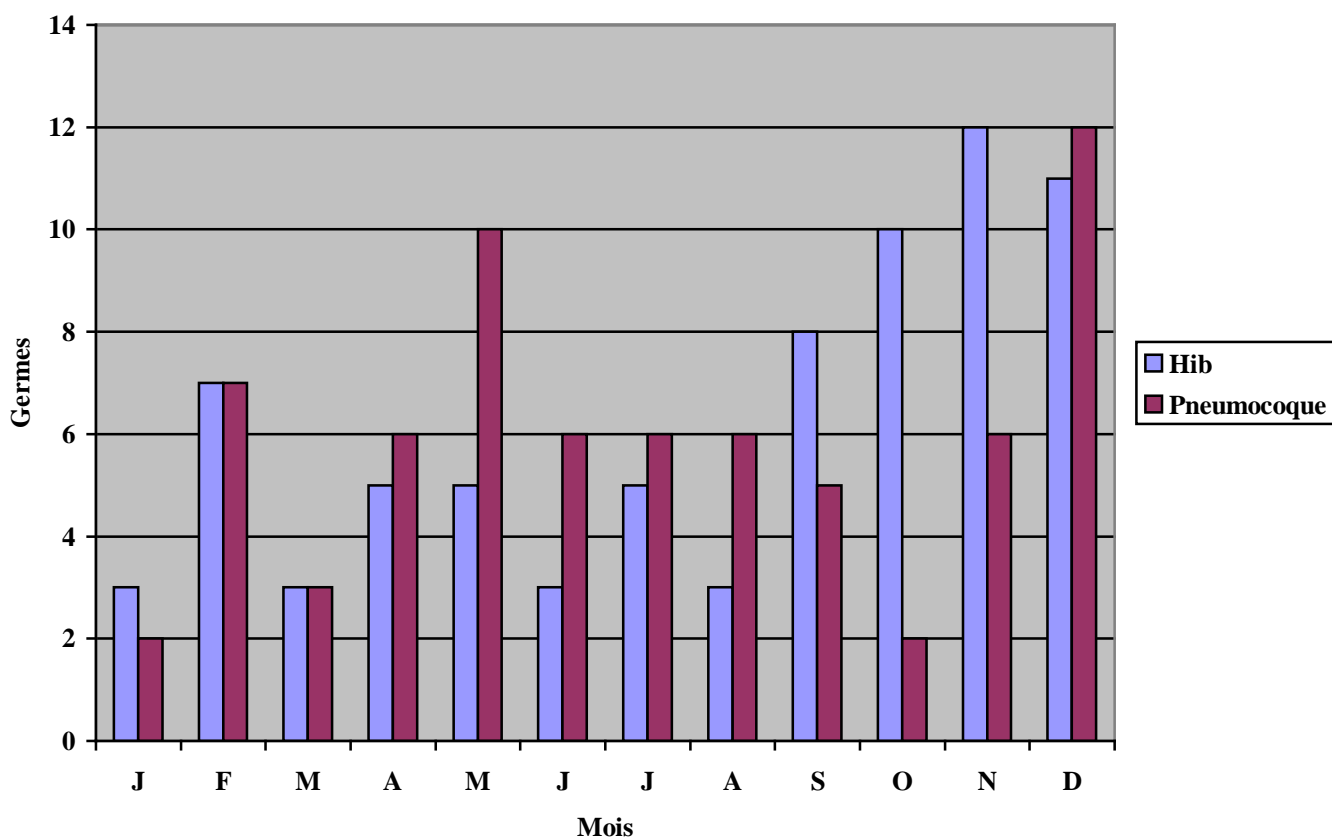


Figure 19 : Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2003.

Tableau XVIII: Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2004.

Germes	<i>Haemophilus influenzae</i> type b		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	Effectifs	Pourcentages (%)	Effectifs	Pourcentages (%)
Mois				
Janvier	05	5,75	13	16,88
Février	05	5,75	10	12,98
Mars	04	4,60	14	18,18
Avril	04	4,60	11	14,29
Mai	06	6,90	03	3,90
Juin	08	9,19	03	3,90
Juillet	10	11,49	02	2,60
Août	09	10,34	02	2,60
Septembre	04	4,60	04	5,19
Octobre	10	11,49	01	1,30
Novembre	16	18,39	06	7,79
Décembre	06	6,90	08	10,39
Total	87	100,00	77	100,00

Le mois de novembre a enregistré le plus grand nombre de Hib : 16 cas soit 18,39% et mars pour le streptocoque : 14 cas soit 18,18%.

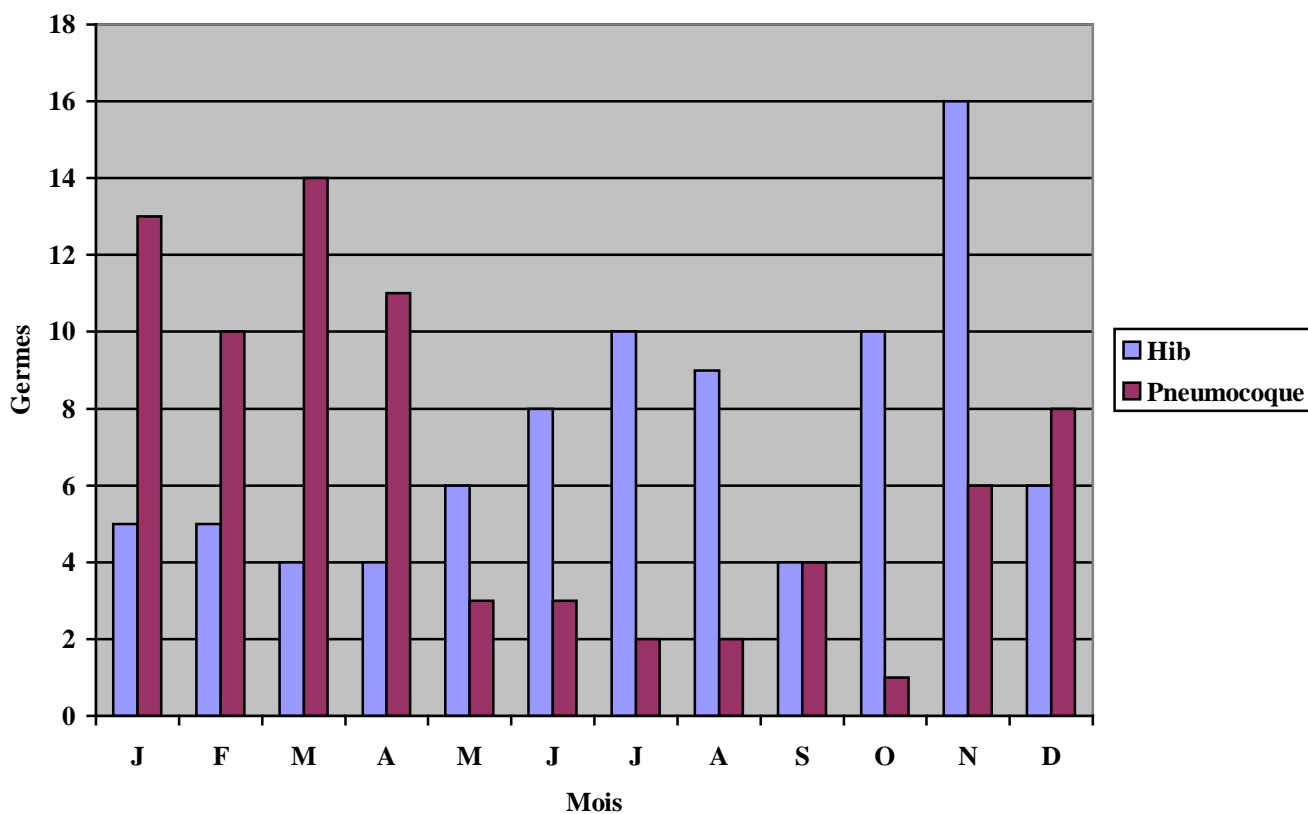


Figure 20 : Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2004.

Tableau XIX: Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2005.

Germes	<i>Haemophilus influenzae</i> type b		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	Effectifs	Pourcentages (%)	Effectifs	Pourcentages (%)
Mois				
Janvier	07	6,48	08	11,27
Février	03	2,78	09	12,68
Mars	11	10,19	07	9,86
Avril	12	11,11	06	8,45
Mai	12	11,11	01	1,41
Juin	13	12,04	09	12,68
Juillet	07	6,48	08	11,27
Août	15	13,89	01	1,41
Septembre	09	8,33	06	8,45
Octobre	10	9,26	04	5,63
Novembre	05	4,63	07	9,86
Décembre	04	3,70	05	7,03
Total	108	100,00	71	100,00

Nous avons observé les pics de Hib et de streptocoque respectivement en août : 15 cas soit 13,89% et en février et juin : 9 cas chacun soit 12,68%.

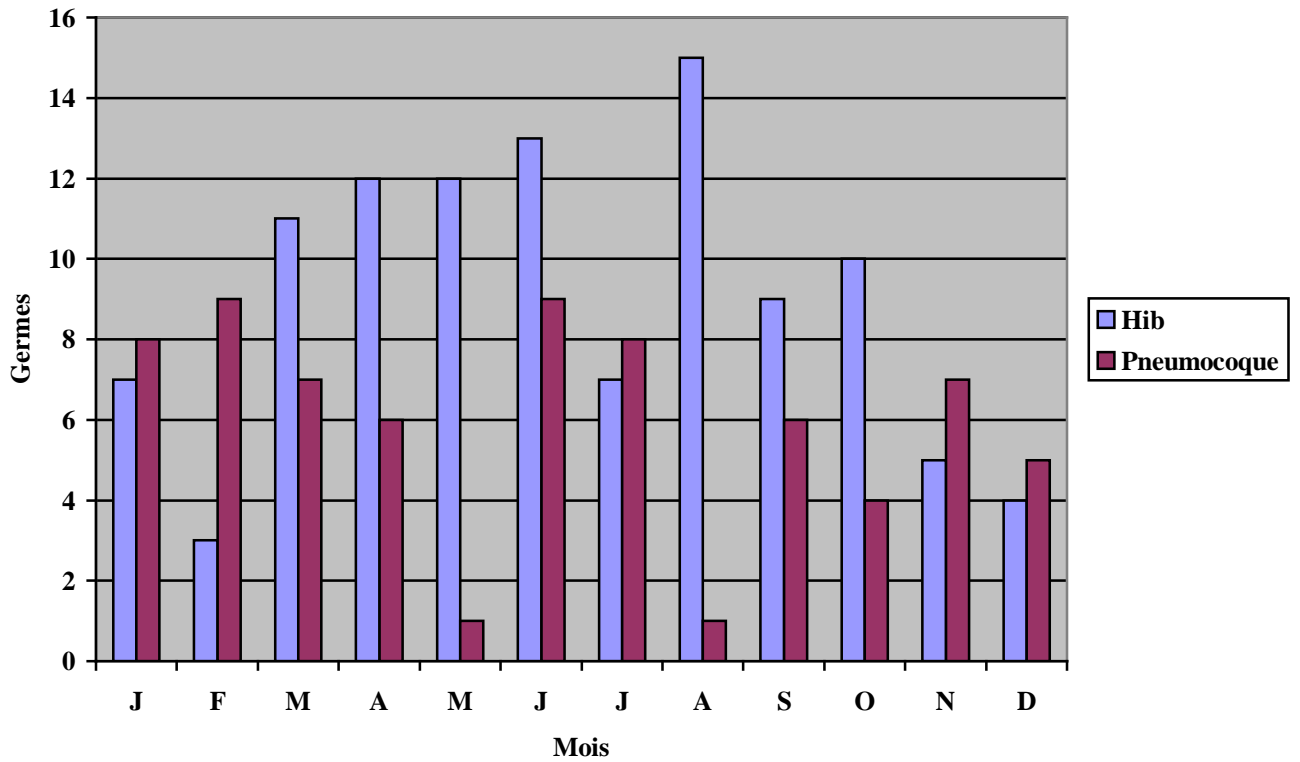


Figure 21: Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2005.

► Période post- vaccinale

Tableau XX : Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2006.

Germes	<i>Haemophilus influenzae</i> type b		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	Effectifs	Pourcentages (%)	Effectifs	Pourcentages (%)
Mois				
Janvier	11	20,37	04	4,82
Février	03	5,56	12	14,46
Mars	09	16,67	11	13,25
Avril	02	3,70	12	14,46
Mai	03	5,56	09	10,84
Juin	07	12,96	05	6,02
Juillet	03	5,56	06	7,23
Août	01	1,85	05	6,02
Septembre	05	9,26	06	7,23
Octobre	07	12,96	03	3,61
Novembre	02	3,70	04	4,82
Décembre	01	1,85	06	7,23
Total	54	100,00	83	100,00

Nous avons observé les pics de Hib et de Streptocoque respectivement en janvier : 11cas soit 20,37% et en février et avril : 12 cas chacun soit 14,46%.

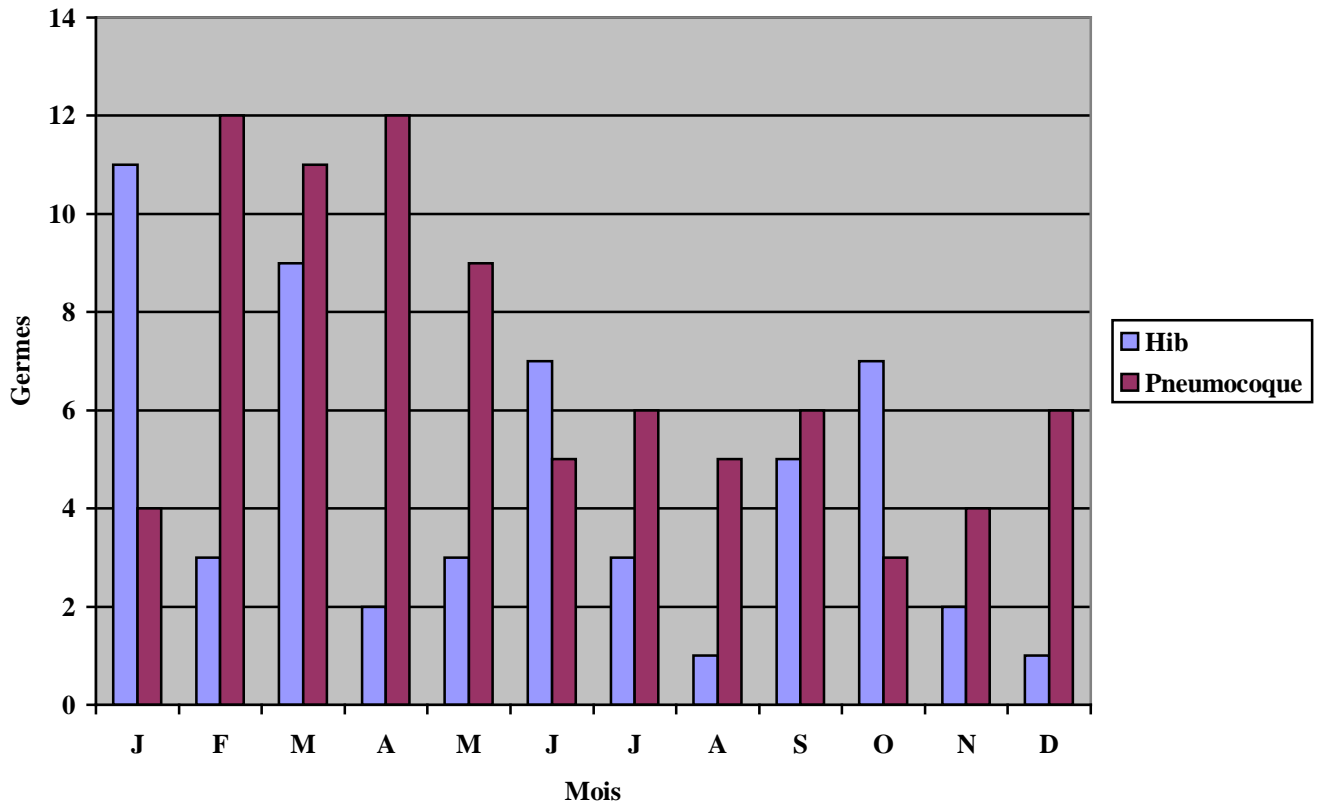


Figure 22 : Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2006.

Tableau XXI: Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2007.

Germes	<i>Haemophilus influenzae</i> type b		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	Effectifs	Pourcentages (%)	Effectifs	Pourcentages (%)
Mois				
Janvier	05	19,23	07	11,29
Février	03	11,54	06	9,68
Mars	03	11,54	10	16,13
Avril	01	3,85	10	16,13
Mai	04	15,38	03	4,84
Juin	02	7,69	04	6,45
Juillet	03	11,54	04	6,45
Août	02	7,69	02	3,23
Septembre	02	7,69	01	1,61
Octobre	00	0,00	01	1,61
Novembre	01	3,85	03	4,84
Décembre	00	0,00	11	17,74
Total	26	100,00	62	100,00

Le mois de janvier a enregistré le plus grand nombre de Hib : 5 cas soit 19,23% et décembre pour le streptocoque : 11 cas soit 17,74%.

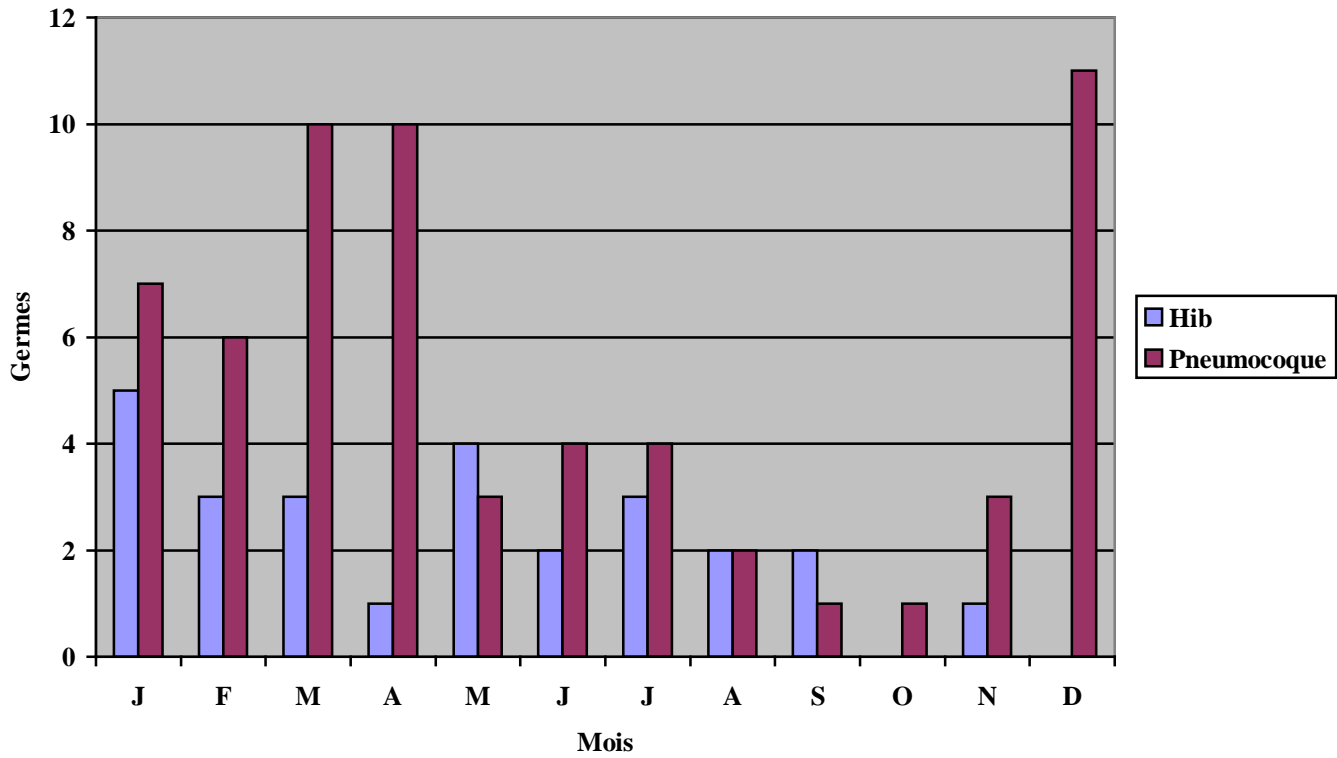


Figure 23 : Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l' *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2007.

Tableau XXII : Fréquences d'isolement mensuelles de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2008.

Germes	<i>Haemophilus influenzae</i> type b		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	Effectifs	Pourcentages (%)	Effectifs	Pourcentages (%)
Mois				
Janvier	02	7,41	11	18,18
Février	01	3,70	07	9,09
Mars	03	11,11	08	10,39
Avril	04	14,81	22	28,57
Mai	03	11,11	05	6,50
Juin	03	11,11	03	3,90
Juillet	04	14,81	04	5,19
Août	03	11,11	01	1,30
Septembre	02	7,41	01	1,30
Octobre	01	3,70	02	2,60
Novembre	01	3,70	04	5,19
Décembre	00	0,00	09	11,69
Total	27	100,00	77	100,00

Les mois d'avril et juillet ont enregistré le plus grand nombre de Hib : 4 cas chacun soit 14,81% et avril pour le streptocoque : 22 cas soit 28,57%.

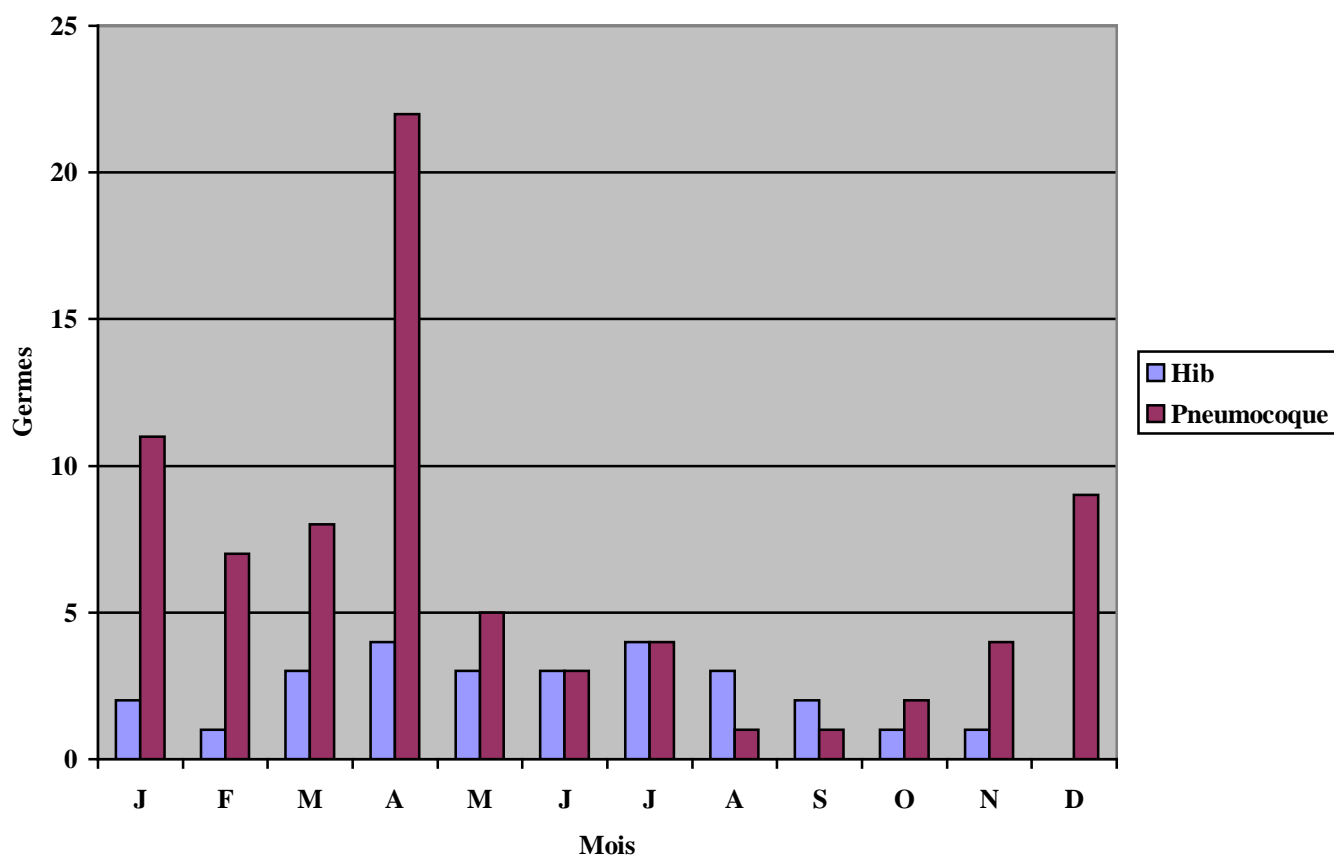


Figure 24 : Représentation graphique des fréquences d'isolement mensuelles de l'*Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* dans les LCR. Cas de 2008.

5. Commentaires et discussions

5.1. Du point de vue de la méthodologie

L'étude rétrospective de l'impact de la vaccination sur le suivi biologique de laboratoire de l'infection à *Haemophilus influenzae* type b en cours concerne les prélèvements apportés de la pédiatrie sur lesquels un examen bactériologique est fait.

Ces prélèvements sont le sang et le liquide céphalo- rachidien prélevés chez des enfants souffrant de Suspicion d'Infections Bactériennes Invasives (SIBI) comme les méningites, les pneumonies, les septicémies, et les autres.

Les hémocultures sont effectuées dans des bouillons nutritifs mis en incubation dans l'appareil BACTEC® 9050 BD conçu pour la détermination rapide des bactéries, des champignons et d'autres microorganismes présents dans les hémocultures positives. La surveillance de ces hémocultures est programmée volontairement sur une durée de 5 jours, alors que les hémocultures classiques peuvent aller de 7 à 10 jours.

L'intervention de l'utilisateur et les manipulations sur des bouteilles, qui consistent à faire la coloration de Gram en fonction de la turbidité observée sur les hémocultures dans la méthode classique, sont minimisées dans la méthode du BACTEC®. En effet cette dernière est basée sur l'incubation, l'agitation de toutes les cultures et un signal immédiat des positifs par les voyants lumineux, un affichage sur l'écran à cristaux liquides et une alarme sonore... tout ce qui concourt à diminuer le risque d'erreur humaine. [29]

Les flacons positifs sont examinés alors conformément à la bactériologie de routine. La coloration de Gram, technique très importante, est accomplie avec le plus grand soin. [24]

Dans le traitement du LCR, des techniques complémentaires comme les tests d'agglutinations latex, la cytologie (notamment le comptage des globules blancs et des globules rouges) aident aux résultats préliminaires. Le résultat du Gram, s'il est positif permet un choix judicieux des milieux de culture.

Pour les CGP on utilise une gélose au sang de cheval ou de mouton et une gélose chocolat.

Pour les BGN, en plus de ces deux milieux on ajoute une gélose Mac ConKey. *Haemophilus influenzae* type b ne pousse pas sur Mac Conkey qui est un milieu sélectif pour les bacilles entériques.

Les résultats préliminaires et définitifs des hémocultures et des LCR sont saisis dans le logiciel GDH, en plus de la saisie dans le registre de travail. Ce logiciel met en réseaux les services de consultation de la pédiatrie, le bureau CVD de la pédiatrie et le laboratoire. Il existe un transfert informatique des données via Internet entre le serveur de l'hôpital, le serveur du CVD au CNAM et celui du CVD de l'université de Maryland (Baltimore- USA).

5.2. Du point de vue des résultats

Résultats globaux

Au terme de notre étude, nous avons obtenu les résultats suivants :

- un total de 19850 flacons BACTEC® ont été reçus en hémocultures de Janvier 2003 à Décembre 2008: 16161 flacons négatifs ; 3689 flacons sont sortis positifs avec germes pathogènes dont 549 *Haemophilus influenzae* type b soit 14,88%, 954 *Streptococcus pneumoniae* soit 25,86%, 1057 flacons positifs avec contaminants soit 28,65% ;

- nous avonsensemencé 6594 prélèvements de LCR dont 4892 sont sortis négatifs ; 1702 positifs avec germes pathogènes dont 377 *Haemophilus influenzae* type b soit 22,15%, 438 *Streptococcus pneumoniae* soit 25,73% ; 590 positifs avec contaminants soit 34,67% contre 5% de valeur admise.

Par ailleurs il est établi que dans les pays sahéliens les réveils épidémiques de méningite concernent la saison sèche pour *Neisseria meningitidis*, alors que *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* type b persistent toute l'année dans notre cas précis.

Suivi biologique avant l'introduction progressive du vaccin pentavalent dans le PEV

❖ Hémocultures

De 2003 à 2005, le laboratoire a reçu 7612 prélèvements d'hémoculture dont 5847 sont sortis négatifs et 1765 positifs.

Sur les hémocultures positives, nous avons isolés 1290 pathogènes (73,09% de l'ensemble des germes) dont :

- Hib : 369 cas soit 28,60% ; ce résultat est en légère baisse par rapport à celui obtenu par KONATE E. 32,30%. [30]
- pneumocoques : 393 cas soit 30,70% ; ce résultat sur le pneumocoque avoisine celui obtenu par MARIKO R. 32,86%. [31]

❖ LCR

Sur 3427 LCRensemencés, 2202 ont donné des cultures négatives et 1225 cultures positives. Parmi ces cultures positives, 637 ont donné des germes pathogènes (52,00% de l'ensemble des germes) dont :

- Hib : 270 cas soit 42,37% ; ce résultat est en hausse par rapport à celui obtenu par KONATE E. 30,95%. [30]
- pneumocoques : 216 cas soit 33,91% ; ce résultat sur le pneumocoque est en légère hausse par rapport à celui obtenu par MARIKO R. 32,86%. [31]

Une étude réalisée entre juin 2002 et mai 2005, par le CVD-Mali en collaboration avec ses alliés américains sur les maladies invasives dues au *Streptococcus pneumoniae*, a montré que le pneumocoque représentait 34,5% des germes isolés des hémocultures positives. [32]

Nos résultats confirment la prédominance de *Haemophilus influenzae* type b et de *Streptococcus pneumoniae* comme principales bactéries responsables de méningites et des autres infections invasives chez les enfants comme signalé dans les thèses de KONATE E et de MARIKO R. [30; 31]

Suivi biologique après l'introduction progressive du vaccin pentavalent dans le PEV.

❖ Hémocultures

De 2006 à 2008, nous avons reçu 12238 flacons BACTEC®. A la sortie des flacons, nous avons dénombré 10314 hémocultures négatives et 1924 positives. De ces hémocultures positives, il a été isolé 1342 germes pathogènes (69,75% de l'ensemble des germes) dont :

- Hib : 180 cas soit 13,41%.
- pneumocoque : 561cas soit 41,80%.

❖ LCR

Sur 3167 LCRensemencés, 2680 ont donné des cultures négatives et 477 cultures positives. Parmi ces cultures positives, 475 (99,58% de l'ensemble des germes) ont donné des germes pathogènes dont :

- Hib : 107 cas soit 22,43%
- pneumocoque 222 cas soit 46,54%.

Ceci nous permet de dire qu'en espace de trois (3) ans, les cas d'isolement de *Haemophilus influenzae* type b ont diminué de près de 50% aussi bien dans le l'hémoculture que dans le LCR pendant que les isollements de *Streptococcus pneumoniae* restent en hausse.

En plus d'une diminution de cas d'isolement du Hib, l'étude clinique à CVD/Mali chez les enfants de 4-11 mois au CHU Gabriel Touré avant et après l'introduction progressive du pentavalent a révélé une baisse de cas d'infections liées au Hib de 75,00% mais le nombre de cas d'infections liées au pneumocoque reste inchangé. [33]

Notre résultat est aussi comparable à celui obtenu au Canada où on dénombrait plus de 200 cas d'infections invasives à Hib chez les nourrissons avant l'introduction du vaccin anti-Hib en 1992, actuellement on enregistre moins de 50 cas par an soit une diminution de plus de 50%. [34]

Du point de vue du laboratoire cette étude nous montre avec aisance que depuis l'avènement de la vaccination anti- Hib, il y a eu une baisse considérable de cas d'isolement de *Haemophilus influenzae* type b.

A travers cette étude on s'est aperçu que les études sur l'introduction du vaccin constituaient une bonne méthode pour estimer la charge de morbidité de l'infection à Hib.

Nous pouvons dire alors qu'il y'a une baisse très importante du nombre d'enfants atteints d'infection à *Haemophilus influenzae* type b dans les zones où l'on vaccine correctement les enfants contre ce germe comme signalée par KONATE E.

Cette étude a évalué en partie l'impact de la vaccination anti- Hib sur la fréquence d'isolement de *Haemophilus influenzae* type b au laboratoire mais aussi et surtout s'est projetée dans le futur en vue d'étendre le Programme Elargi de Vaccination à d'autres infections bactériennes invasives plus précisément à celles dues au *Streptococcus pneumoniae*.

De nos jours certains pays d'Afrique de l'Ouest tels que le Mali, le Ghana, le Sénégal, ont introduit ce vaccin dans leur Programme Elargi de Vaccination.

6. Conclusion et recommandations :

6.1. Conclusion

Le laboratoire de bactériologie du CVD au CHU Gabriel Touré assure le diagnostic bactériologique des infections et intervient comme laboratoire du réseau de la Surveillance Intégrée de la Maladie et la Riposte. Les différents prélèvements du seul service pédiatrique de Bamako au Mali, examinés au laboratoire ont permis d'étudier la fréquence d'isolement de *Haemophilus influenzae* type b avant et après l'introduction du vaccin pentavalent.

Au terme de cette étude, 26444 prélèvements d'hémocultures et de LCR ont été examinés et ont permis d'isoler 5391 germes pathogènes.

- 1290 germes pathogènes ont été isolés des hémocultures dont 369 Hib soit 28,60%, 393 pneumocoques soit 30,70% et 637 germes pathogènes isolés des LCR dont 270 Hib soit 42,37%, 216 pneumocoques soit 33,91% entre 2003 - 2005.

- de 2006 à 2008, 1342 germes pathogènes ont été isolés des hémocultures dont 180 Hib soit 13,41%, 561 pneumocoques soit 41,80% et 475 germes pathogènes isolés des LCR dont 107 Hib soit 22,43% et 222 pneumocoques soit 46,54%.

Les infections au Hib et au pneumocoque persistent en toute saison au Mali avec une incidence de plus en plus faible pour celles dues au Hib grâce à la vaccination.

6.2. Recommandations

Aux autorités du CHU Gabriel Touré

- développer les activités bactériologiques indispensables pour un Centre Hospitalier Universitaire de 3^{ème} référence.

Aux autorités de tutelles

- renforcer la coopération scientifique et technique avec nos partenaires Américains du CVD Baltimore (Université de Maryland- USA)

- étendre la couverture vaccinale anti- Hib à toute la population cible.

7. Références

1. **DABERNAT H, SANSON-LE PORS M J.** In **LE MINOR L, VERON M,** 1989. Bactériologie médicale. 2ème édition : 522-27.
2. **http://www.Afro.who.int/hib/manuel/afro-hib_mbp_fr.pdf** (consulté le 10/05/09)
3. **<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs294/fr/index.html>** (consulté le 10/05/09)
4. **FAUCHERE J L, AVRIL J L,** 2002. Bactériologie Générale et Médicale. Ellipses Edition Marketing S. A. -32 : 286- 87.
5. **RAPPORT ANNUEL,** 2002 – 2003. C.V.D- Mali - Centre National d'Appui à la lutte contre la Maladie (CNAM).
6. **KONATE A,** 2007. Etude de l'infection à *Haemophilus influenzae* type b dans le service de pédiatrie de l'hôpital Gabriel Touré d'août 2005 à juillet 2006 après l'introduction du vaccin Hib. Thèse Méd N° (07-M-64) : 68p.
7. **AVRIL JL, BABERN H, DENIS F, MONTEIL H,** 2000. Bactériologie Clinique. 3e édition Ellipses édition Marketing S.A. 32, rue Bague 75740 Paris cedex 15 : 59-72.
8. **MARIANI E, KURKDJIAN P, BINGENE,** 1998. Infection à *Haemophilus* en pédiatrie. Encyclopédie Médico- Chirurgicale, (Elsevier, Paris), Pédiatrie, 4-260-A-10, Maladies infectieuses, 8-017-F-15 : 6.
9. **FERON A,** 1984 .Bactériologie Médicale, à l'usage des étudiants en médecine. 12ème édition, Edition C et R. 79, rue Faidherbe 59110 la Madeleine : 162.
10. **JAEGER F, LEROY J, ESTAVOYER J M et HOEN B,** 1999. Infections à *Haemophilus*. Encyclopédie Médicochirurgicale (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses, 8-017-F-10 : 6.
11. **BERCHE P, GAILLARD J L, SIMONET M,** 1988. Bactériologie, Les infections humaines. Médecines- sciences Flammarion : 176 -84.

- 12.** <http://www.cdc.gov/search.deo/action/search/queryText/Haemophilus+influenzae+b/x/18/y/14/page/3> (consulté le 01/06/09)
- 13.** **GASTINEL P**, 1957. Précis de bactériologie, avec la collaboration de Fasquelle R, Nevot A, Cristol D, Demanche R et Nicolle P, 2ème édition Refondu.
- 14.** **AVRIL J L, BERNAT H, DENIS F et MONTEIL H**, 2000. Bactériologie clinique. 3ème édition Ellipse Edition Marketing S.A. 32, rue Bague 75740 Paris Cedex 15 : 268 -82.
- 15.** <http://anne.decoستر.free//bgn/haemo.htm>. (consulté le 15/07/09)
- 16.** <http://www.immunize.org/Hib/>(consulté le 15/07/09)
- 17.** <http://www.brown.edu/courses/Bio160/projects1999/bmenin/epid.html> (consulté le 15/07/09)
- 18.** <http://www.chu-rouen.fr/ssf/pathol/haemophilusinfection.html> (consulté le 18/07/09)
- 19.** **AJJAN NIZAR**. 1990. Vaccination (Institut Mérieux). 5è édition, EDS-M III: 296.
- 20.** **LECLERC H**, 1983. Microbiologie générale. 2^{ème} Edition : 199- 202
- 21.** http://www.cfes.sante.fr/10000/themes/vaccination/guide_2008/pdf/GV2008_P2_HaeInfB.pdf (consulté le 18/07/09)
- 22.** **BERCHE P**. Les staphylocoques. In **BERCHE P, GAILLARD JL, SIMONET M**, 1998. eds. Bactériologie: Les bactéries des infections humaines. Paris, Flammarion: 267-77.
- 23.** **BIO MERIEUX BV. BACTÉRIOLOGIE**, 2003. Réf. 247003.
- 24.** **BECTON DICKINSON** and Company, 2004. BACTEC® 9050. Manuel d'utilisation. MA- 0103. Révision : E Réf 445845.
- 25.** **BECTON DICKINSON**, 1996. Division DIAGNOSTIC VOTRE PARTENAIRE EN MICROBIOLOGIE : 1-4.
- 26.** **Procédures et techniques de laboratoire d'analyses**, 2002. Protocoles approuvés par CVD-Mali.

- 27. BIO-RAD PASTOREX™ MENINGITIS**, 2006. Detection of soluble antigens and identification of *Neisseria meningitidis* A, C, Y/W135, B/E. *coli* K1, *Haemophilus influenzae* type b, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* béta- haemolytique du groupe B.
- 28. LE MINOR L, RICHARD C.** Institut Pasteur Méthode de Laboratoire pour l'Identification des Entérobactéries.
- 29. FERON A**, 1979. Bactériologie Médicale à l'usage des étudiants en médecine. 10^e édition, par les professeurs et maîtres de conférences de microbiologie médicale : 16.
- 30. KONATE E**, 2005. Caractères bactériologiques et place de HAEMOPHILUS *influenzae* type b isolé au laboratoire CVD dans les infections bactériennes invasives chez les enfants hospitalisés dans le service de pédiatrie de l'hôpital Gabriel TOURE de Novembre 2003 à Octobre 2004. Thèse Pharm N° (05-P-64) : 103-09p.
- 31. MARIKO R**, 2005. Caractères bactériologiques et place de *Streptococcus pneumoniae* isolé au laboratoire CVD dans les infections bactériennes invasives chez les enfants hospitalisés dans le service de pédiatrie de l'hôpital Gabriel TOURE. Thèse Pharm N° (05-P-63): 120-21p.
- 32. TAPIA MD¹, SOW SO², DIALLO S³, SYLLA M³ et al**, 2005. Invasive pneumococcal disease among children in Bamako, Mali.
- 33. SOW SO, DIALLO S, CAMPBELL JD, KEITA MM et al**, 2009. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine introduction in Mali: impact on disease burden and serologic correlate of protection. Am. J. Trop. Med. Hyg; 80(6): 1036.
- 34. ADERSON EL, DECHER MD, ENGLUND JA et al.** (Interchangeability of conjugated haemophilus influenzae type b vaccin in nourrissons)

8. Annexes

8.1. Annexe I : consentement des malades

Des assistants de recherche sont formés à la méthodologie de l'étude, particulièrement à l'obtention du consentement éclairé et à l'inclusion du malade dans l'étude. Ils travaillent en collaboration avec le tri et les salles de consultations du service de Pédiatrie du CHU Gabriel Touré pendant la durée de l'étude. Chaque pédiatre a à ses côtés un assistant de recherche qui est chargé de vérifier les critères d'inclusion, d'expliquer les modalités de l'étude, objectifs, risques et bénéfices pour l'enfant à la famille et/ou au malade et d'obtenir le consentement éclairé du patient avant l'inclusion. Les parents sont approchés dès l'admission ou plus tard dans les 12 heures qui suivent celle-ci. Après avoir obtenu le consentement du malade ou des parents le malade est inclus par l'assistant de recherche dans l'étude. Il est demandé aux enfants âgés de 13-16 ans, leur accord pour participer à l'étude de donner un consentement signé. Cependant, si un enfant extrémis est incapable de donner un consentement éclairé, le consentement des parents suffit pour participer. Toute information que vous fournissez est gardée de façon confidentielle dans des armoires bouclées, bien que les résultats de la culture soient donnés à votre médecin traitant. Nous, nous engageons à ne pas utiliser les échantillons de sang prélevés pour d'autres recherches, cependant certaines souches de pathogènes pourront être gardées pour des investigations futures.

8.2. Annexe II : inconvénients potentiels de cette étude

Le risque pour les enfants qui participent est faible. Tous les participants sont soumis à une ponction de sang veineux pour l'hémoculture. Cette procédure peut avoir un risque dont la douleur, l'infection et l'hémorragie. A l'admission, beaucoup d'enfants vont subir une ponction sur indication du pédiatre et cette prise complémentaire peut avoir des risques. La procédure d'obtention d'autres liquides stériles d'autres sites (lombaire, pleural, articulaire, tissulaire et osseux)

peut avoir des risques comme la douleur, l'infection et la détérioration tissulaire. Ces procédures sont réalisées à la discrétion du médecin traitant et ne sont pas dictées par ce protocole. La culture de ces liquides, qui est prise en charge par l'étude, n'entraîne pas de risque additionnel.

8.3. Annexe III : bénéfices de cette étude

Sur le plan individuel, les nouveaux équipements en place avec un personnel qualifié permettront une recherche étiologique avancée, telle l'isolement des bactéries par culture, non habituellement utilisés au CHU Gabriel Touré. Ceci aide, considérablement, le médecin traitant à conduire un traitement étiologique, guidé par un antibiogramme, de la maladie de l'enfant, ce qui est largement important par rapport aux risques mineurs ci-dessus évoqués. Tous les examens biologiques (hémocultures et autres cultures, et antibiogrammes) sont faits gratuitement chez les malades inclus. Le coût moyen de la prise en charge journalière d'un malade est estimé à 25000 Fcfa.

D'une manière générale, cette étude va permettre de relever le niveau, la qualité des prestations au CNAM, au CHU Gabriel Touré et à l'INRSP par l'amélioration du plateau technique (rénovation des locaux, équipements de laboratoire et de bureau). Aussi, deux techniciens de laboratoire (dont un pour le CHU Gabriel Touré et un pour l'INRSP) et un médecin superviseur en pédiatrie ont été formés en microbiologie ainsi qu'à l'usage des nouveaux équipements de laboratoire. Au terme de l'étude, l'épidémiologie des maladies concernées est mieux connue et des recommandations sont faites en vue d'améliorer leur prise en charge et pour permettre d'autres études dans le domaine de la vaccinologie (introduction de nouveaux vaccins).

FICHE SIGNALETIQUE

Nom : KY

Tel : 79.42.54.47

Prénom : Blaise Pascal

e-mail : kyblaise@yahoo.fr

Titre de la thèse : Fréquence d'isolement de Hib au laboratoire du CHU Gabriel Touré avant et après l'introduction du vaccin pentavalent dans le PEV.

Année Universitaire : 2009 - 2010

Ville de soutenance : Bamako

Pays d'origine : Mali

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto - Stomatologie

Secteurs d'intérêt : Bactériologie, Santé publique, Infectiologie.

RESUME :

La triade constituée par *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b (Hib) et *Streptococcus pneumoniae*, représente la principale cause des méningites purulentes chez l'enfant.

Ces pathogènes sont responsables d'infections invasives comme les septicémies, les pneumonies, les méningites, les otites et autres avec une morbidité et une mortalité importantes chez l'enfant de moins de 5ans en Afrique.

Il s'agit d'une étude rétrospective portant sur l'étude de la fréquence d'isolement de Hib au laboratoire du CHU Gabriel Touré avant et après l'introduction du vaccin pentavalent dans le PEV.

Elle vise aussi à évaluer l'impact du vaccin pentavalent sur la fréquence d'isolement du Hib en comparaison avec le streptocoque.

Les résultats obtenus ont été les suivants :

- ✓ Nombre de Hib isolés des hémocultures avant l'introduction du pentavalent : 369
- ✓ Nombre de Hib isolés des hémocultures après l'introduction du pentavalent : 180

- ✓ Nombre de pneumocoques isolés des hémocultures avant l'introduction du pentavalent : 393
- ✓ Nombre de pneumocoques isolés des hémocultures après l'introduction du pentavalent : 561
- ✓ Nombre de Hib isolés des LCR avant l'introduction du pentavalent : 270
- ✓ Nombre de Hib isolés des LCR après l'introduction du pentavalent : 107
- ✓ Nombre de pneumocoques isolés des LCR avant l'introduction du pentavalent : 216
- ✓ Nombre de pneumocoques isolés des LCR après l'introduction du pentavalent: 222

Les infections au Hib et au pneumocoque persistent en toute saison au Mali avec une incidence de plus en plus faible pour celles dues au Hib grâce à la vaccination.

Mots Clés : Hib, Pneumocoque, Vaccination, Bamako, Mali.

IDENTIFICATION FORM

Last Name: KY

Tel: 79.42.54.47

First Name: Blaise Pascal

e-mail: kyblaise@yahoo.fr

Title: Hib isolation frequency in the laboratory of CHU Gabriel Touré before and after the pentavalent vaccine introduction in the routine immunization process.

Academic year: 2009-2010

City: Bamako

Deposit area: Library of the Faculty of Medecine, Pharmacy and Odonto-Stomatology.

Sector of interest: Bacteriology, Public health, Infectiology.

SUMMARY

The group of the three germs composed by *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae* are the main causes of meningitis in children.

These pathogens are responsible of invasive infections such as septicaemia, pneumonia, meningitis, otitis and others with important morbidity and mortality in children younger than 5 years old in Africa.

It is a retrospective study on the biological surveillance of Hib infection in paediatric area in the lab of CHU Gabriel Touré from 2003 to 2008.

The target was also to evaluate the impact of the pentavalent vaccine through Hib isolation rate versus pneumocoque.

The results are the following:

- ✓ Number of Hib isolated in blood culture before the pentavalent vaccine:
369
- ✓ Number of Hib isolated in blood culture after the pentavalent vaccine:
180

- ✓ Number of pneumocoque isolated in blood culture before the pentavalent vaccine: 393
- ✓ Number of pneumocoque isolated in blood culture after the pentavalent vaccine: 561
- ✓ Number of Hib isolated from CSF before the pentavalent vaccine: 270
- ✓ Number of Hib isolated from CSF after the pentavalent vaccine: 107
- ✓ Number of pneumocoque isolated from CSF before the pentavalent vaccine: 216.
- ✓ Number of pneumocoque isolated from CSF after the pentavalent vaccine: 222.

Hib and Pneumococcal infections persist without specific season in Mali with decreasing burden of Hib thanks to immunization.

Key Words: Hib, Pneumocoque, Immunization, Bamako, Mali.

SERMENT DE GALIEN



Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des
conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :
D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur
témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
D'exercer dans l'intérêt de la Santé Publique, ma profession avec conscience et
de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de
l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa
dignité humaine.
En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour
corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.
Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobres et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Je le jure !