

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

*Paix – Travail – Patrie*

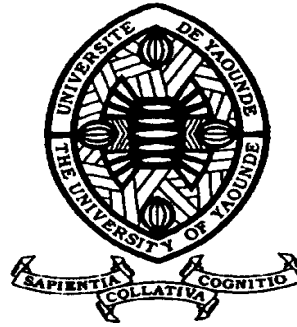
\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

\*\*\*\*\*

CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN  
SCIENCES DE LA VIE, SANTE ET  
ENVIRONNEMENT

Laboratoire de Recherche sur la  
Tuberculose et Pharmacologie



REPUBLIC OF CAMEROUN

*Peace – Work – Fatherland*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF  
BIOCHEMISTRY

\*\*\*\*\*

CENTRE FOR RESEARCH AND  
TRAINING IN GRADUATE  
STUDIES

IN LIFE , HEALTH AND  
ENVIRONMENTAL SCIENCES  
Laboratory for Tuberculosis  
Research and Pharmacology

**Fréquence de détection des bactéries et typage  
moléculaire des Haemophilus chez les patients  
souffrant d'infection des voies respiratoires à Yaoundé**

THÈSE

Présentée et soutenue en vue de l'obtention partielle du  
Doctorat/PhD en Biochimie

Par : TCHATCHOUANG Serges  
Master en Biochimie

Sous la direction de  
**PENLAP BENG Véronique**  
Professeur, Université de Yaoundé I  
**FONKOUA Marie-Christine**  
Directeur de Recherche, Centre Pasteur du  
Cameroun

Année Académique : 2020



UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I  
\*\*\*\*\*  
CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN  
SCIENCES DE LA VIE, SANTE ET  
ENVIRONNEMENT  
\*\*\*\*\*  
UNITE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN  
SCIENCES DE LA VIE  
\*\*\*\*\*  
DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDÉ I  
\*\*\*\*\*  
CENTRE FOR RESEARCH AND  
TRAINING IN GRADUATE STUDIES  
IN LIFE , HEALTH AND  
ENVIRONMENTAL SCIENCES  
\*\*\*\*\*  
RESEARCH AND DOCTORATE  
TRAINING UNIT IN LIFE SCIENCES  
\*\*\*\*\*  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

### ATTESTATION DE CORRECTION

Nous soussignés, Pr. SADO KAMDEM Sylvain et Pr. MBACHAM Wilfred, respectivement Examineur et Président de jury de Thèse de Doctorat/PhD en Biochimie spécialité Biotechnologie et Développement, soutenue par Monsieur TCHATCHOUANG Serges (matricule 05Q342) le Mercredi 19 Août 2020 à 10 heures dans la salle S01/S02 du Nouveau Bloc Pédagogique de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, sous le thème « Fréquence de détection des bactéries et typage moléculaire des *Haemophilus* chez les patients souffrant d'infection des voies respiratoires à Yaoundé » attestons que le candidat a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.


En foi de quoi la présente attestation est établie et délivrée à l'intéressé pour servir et valoir ce que de droit

Fait à Yaoundé, le .....2.8.AOÛT.2020.....

Examineur

  
Pr. Sado Kamdem Sylvain, PHD  
Food Technologist & Food Microbiologist  
Associate Professor  
University of Yaoundé I

Président du jury

  
Pr. Wilfred S. Mbacham  
MS, DS, ScD (Harvard), FASL, FCAS  
Public Health Biotechnologist

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I

\*\*\*\*\*

CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN  
SCIENCES DE LA VIE, SANTE ET  
ENVIRONNEMENT

\*\*\*\*\*

UNITE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN  
SCIENCES DE LA VIE

\*\*\*\*\*

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE

THE UNIVERSITY OF YAOUNDÉ I

\*\*\*\*\*

CENTRE FOR RESEARCH AND  
GRADUATE TRAINING IN LIFE ,  
HEALTH AND ENVIRONMENTAL  
SCIENCES

\*\*\*\*\*

RESEARCH AND DOCTORATE  
STUDY UNIT IN LIFE SCIENCES

\*\*\*\*\*

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY



### FICHE DE CERTIFICATION DE L'ORIGINALITE DU TRAVAIL

Je soussigné, TCHATCHOUANG Serges matricule 05Q342 et étudiant en doctorat PhD au Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé 1, atteste que la présente thèse est issu de mes travaux de recherche effectués au Centre Pasteur du Cameroun. Ces travaux ont été faits sous l'encadrement du Pr. PENLAP BENG Véronique (Professeur), enseignante au Département de Biochimie et responsable du Laboratoire de Recherche sur la Tuberculose (Centre de Biotechnologie de Nkolbisson) de l'Université de Yaoundé I, Pr. NJOUOM Richard (Directeur de Recherche) Chef de Service de Virologie et Dr. FONKOUA Marie-Christine (Directeur de Recherche) au Service de Bactériologie au Centre Pasteur du Cameroun.

Mon travail portant sur « **Fréquence de détection des bactéries et typage moléculaire des *Haemophilus* chez les patients souffrant d'infection des voies respiratoires à Yaoundé** » est authentique et n'a jamais fait l'objet d'une présentation en vue de l'obtention d'un grade universitaire.

#### Le candidat

11/04/2020

TCHATCHOUANG Serges

#### Directeurs de thèse

11/04/2020

Dr. FONKOUA Marie C.


11/04/2020

Pr. NJOUOM Richard

#### Superviseur

12/04/2020

Pr. PENLAP B. Véronique

<b>UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I</b> <b>Faculté des Sciences</b> Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		<b>THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I</b> <b>Faculty of Science</b> Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
<b>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS</b>		<b>LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF</b>

## LISTE PROTOCOLAIRE

**ANNÉE ACADEMIQUE 2019/2020**

(Par Département et par Grade)

**DATE D'ACTUALISATION 03 Mars 2020**

### ADMINISTRATION

**DOYEN** : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maitre de Conférences*

**VICE-DOYEN / DPSAA** : DONGO Etienne, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DSSE** : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DRC** : ABOSSOLO Monique, *Maitre de Conférences*

**Chef Division Administrative et Financière** : NDOYE FOE Marie C. F., *Maitre de Conférences*

**Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR** : MBAZE MEVA'A Luc Léonard, *Professeur*

#### 1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DIAGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOUGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
17	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
18	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
19	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
20	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
21	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

22	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
23	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
24	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
25	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
26	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
27	EWANE Cécile Anne	Chargée de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
30	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste

36	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
37	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
38	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

## 2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (48)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UYI</i>
6	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
7	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
13	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	<i>En poste</i>

14	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
15	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
16	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
17	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
18	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
19	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
20	MONY Ruth épse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
21	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste

22	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
26	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
27	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
28	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
29	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
30	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
31	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
32	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
33	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
34	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
35	MOUNGANG LucianeMarlyse	Chargée de Cours	En poste
36	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
37	NGOuateu KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
38	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
39	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
40	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
41	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
42	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
43	YEDE	Chargé de Cours	En poste

44	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
45	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
46	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
47	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
48	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

### 3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
6	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
16	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
17	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste

18	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
19	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
21	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
23	NGOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
24	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
25	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
26	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste
27	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
28	KABELONG BANAHOU Louis-Paul-Roger	Assistant	En poste
29	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
30	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
31	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
32	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
33	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

#### 4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (35)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Vice Recteur Univ ,Bamenda</i>
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI/Chef de Departement</i>
7	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>

10	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
11	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
23	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
12	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
13	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
14	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
15	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
17	NJIOMOU C. épse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
18	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
19	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste

20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
24	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
25	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
26	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
27	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
28	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
29	NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINFEM
30	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
31	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste
32	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
33	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
34	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
35	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

#### 5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen / PSAA
2	GHOOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NKENGFAK Augustin Ephrem	Professeur	Chef de Département
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste

8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>DEPE/ Rectorat/UYI</i>
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	<i>Chef Service Programme &amp; Diplomes</i>
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	Chef Service/MINESUP
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	En poste
20	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
21	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
22	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
23	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste



24	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
25	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
26	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
27	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
28	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
29	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
30	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
31	SIELINOU TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
33	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste

34	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

### **6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (27)**

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div. MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA. MINESUP</i>

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
---	---------------	-----------------------	----------

4	AMINOU Halidou	Chargé de Cours	En poste
5	DJAM XAVIERA YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En poste
6	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
11	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
12	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset. Ebolowa
14	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
16	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

17	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
23	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

**7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (31)**

1	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>CD Info/ Inspecteur MINESUP</i>
2	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
3	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
4	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda
7	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
8	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
9	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
10	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
11	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
12	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
13	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
14	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
15	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
16	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
20	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
21	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
22	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
23	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
26	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
27	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
28	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
29	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
30	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
31	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

**8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)**

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	DRV/IMPM
2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
6	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
7	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste

9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

### 9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Chef Division. UN</i>
3	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
4	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
5	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
6	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
7	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
8	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous Directeur/ MINRESI</i>
9	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
10	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda
11	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
12	WOAFO Paul	Professeur	En poste

13	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
14	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
15	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
16	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
20	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
21	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
22	SAIDOU	Maître de Conférences	MINERESI
23	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
24	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
25	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
26	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Sous Directeur/ MINESUP</i>
27	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste

28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
29	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
30	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Chargée de Cours	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
34	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
36	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
37	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

38	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
39	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
40	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste

### 10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
6	NGOS III Simon	Professeur	DAAC/Uma
7	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
8	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

9	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10	GHOOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
11	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
12	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
13	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	En poste
15	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
16	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
17	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>

29	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	CD/Uma
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargée de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
39	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
40	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
41	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste
42	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
43	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

### Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

OMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	9 (1)	13 (09)	14 (06)	3 (2)	<b>39 (18)</b>
BPA	13 (1)	09 (06)	19 (05)	05 (2)	<b>46 (14)</b>
BPV	06 (0)	11 (02)	9 (06)	07 (01)	<b>33 (9)</b>
CI	10 (1)	10 (02)	12 (02)	03 (0)	<b>35 (5)</b>
CO	7 (0)	17 (04)	09 (03)	02 (0)	<b>35(7)</b>
IN	2 (0)	1 (0)	13 (01)	09 (01)	<b>25 (2)</b>
MAT	1 (0)	5 (0)	19 (01)	06 (02)	<b>31 (3)</b>
MIB	1 (0)	5 (02)	06 (01)	06 (02)	<b>18 (5)</b>
PHY	12 (0)	15 (02)	10 (03)	03 (0)	<b>40 (5)</b>
ST	8 (1)	14 (01)	19 (05)	02 (0)	<b>43(7)</b>
<b>Total</b>	<b>69 (4)</b>	<b>100 (28)</b>	<b>130 (33)</b>	<b>46 (10)</b>	<b>345 (75)</b>

Soit un total de **345 (75)** dont :

- Professeurs **68 (4)**
- Maîtres de Conférences **101 (28)**
- Chargés de Cours **130 (33)**
- Assistants **46 (10)**

( ) = Nombre de Femmes

**75**

## DÉDICACE

*A ma maman Nzesseu Pauline*

## REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été rendu possible grâce aux efforts cumulés de nombreux intervenants à qui je tiens à exprimer ma profonde gratitude. Ma reconnaissance s'adresse :

Au **Pr NJOUOM Richard** qui a consacré son temps et son énergie pour suivre ce travail en fournissant tout le support scientifique lié à la compréhension du sujet, tous les moyens matériels et financiers pour renforcer la recherche. Votre rigueur scientifique a été indispensable pour le déroulement de ce travail. Aucun mot ne peut exprimer ma reconnaissance pour le soutien sans faille durant ce parcours.

Au **Dr FONKOUA Marie-Christine** pour votre rigueur scientifique, votre dévouement à m'apprendre les bases de la bactériologie et votre disponibilité à diriger ce travail. Vous m'avez montré combien de fois un travail scientifique nécessite une rigueur scrupuleuse des règles, mais surtout une rigueur individuelle.

Au **Dr TAHA Muhamed-Kheir** pour m'avoir accueilli dans votre unité de recherche à travers la bourse de stage Calmette et Yersin du Réseau International des Instituts Pasteur à Paris. Je vous remercie pour votre enthousiasme communicatif, pour nos discussions scientifiques et pour tout ce que vous m'avez appris pendant mon stage à l'Institut Pasteur de Paris, France.

Au **Pr PENLAP BENG Véronique** responsable du Laboratoire de Recherche sur la Tuberculose au Centre de Biotechnologie de l'Université de Yaoundé 1 pour m'avoir accueilli à partir du Master 2 en Biochimie dans votre Laboratoire, le soutien pendant mes moments difficiles et m'avoir offert la possibilité de m'encadrer en thèse. Je vous suis infiniment reconnaissant pour toutes ces années.

À la Direction générale, la Direction scientifique, la Direction des Affaires administratives et la Direction Médicale du Centre Pasteur du Cameroun pour le suivi et la formation reçu pendant mes années de thèse. Je vous remercie pour la confiance que vous me témoignez.

Au **Pr MOUNDIPA FEWOU Paul**, Chef du Département de Biochimie à la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, pour ses encouragements et **tous les enseignants du Département de Biochimie**, pour toute la connaissance qu'ils m'ont transmise.

Aux **Drs NZOUANKEU Ariane, CRUCITTI Tania, SADEUH MBAH Serge** et **NGOUPU Alain** pour tous les conseils et toutes les critiques scientifiques visant à améliorer ce travail.

Au **Dr VERNET Marie-Astrid** pour l'encadrement reçu à mon arrivée au Centre Pasteur et les différentes critiques mélioratives. Merci infiniment.

Aux **Drs NGANDO Laure, CHOUMESSI Aphrodite, ASSOHOUN Stanislas et ASSAM-ASSAM Jean Paul**, pour le soutien et les encouragements. Trouvez ici le témoignage de mon respect et ma considération.

À toute **l'équipe du service de Bactériologie et de Virologie du Centre Pasteur du Cameroun** pour le soutien et l'aide dans l'accomplissement de ce travail.

À **tous les membres du laboratoire Infections Bactériennes Invasives (Centre National de Référence Méningocoques et *Haemophilus influenzae*) de l'Institut Pasteur de Paris (France)**, qui m'ont apporté leur aide et ont créé une ambiance agréable pendant mon stage.

À **l'Hôpital Jamot de Yaoundé, au Centre Hospitalier d'Essos et aux participants** pour la collaboration durant cette étude.

Au **Dr GAILLOT Olivier** pour l'initiation au typage des *Haemophilus influenzae* au Centre Hospitalier Universitaire de Lille, France.

À mes camarades **Sébastien, Gwladys, Landry, Abdou, Delors, Elodie, Marie, Brice et Jocelyne**, pour l'atmosphère amicale, l'aide scientifique et le soutien dont ils m'ont fait preuve durant ce parcours. Qu'ils soient assurés de mon profond respect et de ma sincère amitié.

À **toute ma famille** dont la présence m'a procuré la motivation d'entreprendre ce travail, qui je l'espère peut servir d'exemple à mes cadets.

Aux **membres du jury** pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Mes sincères remerciements.

À **Mme DONTSA Roseline, Mme TOUKAP Ide, M. KAMSU Deples, M. TCHATCHOUANG Olivier et M. NDAYOU Samuel** à qui je témoigne ma reconnaissance pour m'avoir toujours soutenu.

À ma fille **NZESSEU Sasha** pour l'espoir suscité en moi.

À **tous ceux qui ont participé de près ou de loin** à la réalisation de ce travail et dont j'ai omis de citer ; qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.



## FINANCEMENT

Ce travail de recherche a été financé par :

- **Le Projet Interne du Centre Pasteur du Cameroun de 2016,**
- **Le Service de Coopération et d'action Culturelle de l'Ambassade de France au Cameroun (SCAC),**
- **Le Réseau International des Instituts Pasteur à travers la bourse de stage Calmette et Yersin,**
- ***Department of Health and Human Services (DHHS).***

## TABLE DES MATIERES

ATTESTATION DE CORRECTION.....	Erreur ! Signet non défini.
FICHE DE CERTIFICATION DE L'ORIGINALITE DU TRAVAIL .....	ii
LISTE PROTOCOLAIRE .....	iii
DÉDICACE.....	xiii
REMERCIEMENTS.....	xiv
FINANCEMENT .....	xvi
TABLE DES MATIERES .....	xvii
LISTE DES ABREVIATIONS .....	xxiv
LISTE DES TABLEAUX .....	xxv
LISTE DES FIGURES.....	xxvi
RÉSUMÉ .....	xxviii
ABSTRACT .....	xxix
INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE .....	6
I.1 INFECTION DES VOIES RESPIRATOIRES.....	6
I.1.1 Infections des voies respiratoires supérieures .....	6
I.1.2 Infections des voies respiratoires basses .....	6
I.1.3 Étiologie des infections des voies respiratoires .....	7
I.2 GÉNÉRALITES SUR LES <i>Haemophilus</i> .....	8
I.2.1 Définition du genre .....	8
I.2.2 Taxonomie .....	8
I.2.3 Morphologie cellulaire.....	8
I.2.4 Composition de la membrane cytoplasmique .....	9
I.2.5 Composition de la paroi cellulaire .....	9
I.2.6 Caractères coloniaux et culturaux .....	10
I.2.7 Espèces du genre <i>Haemophilus</i> .....	12
I.2.7.1 <i>Haemophilus influenzae</i> .....	12
I.2.7.2 <i>Haemophilus aegyptius</i> .....	14
I.2.7.3 <i>Haemophilus ducreyi</i> .....	15
I.2.7.4 <i>Haemophilus haemolyticus</i> .....	15

I.2.7.5 <i>Haemophilus parainfluenzae</i> .....	15
I.2.7.6 <i>Haemophilus segnis</i> .....	16
<b>I.3 BESOINS DES <i>Haemophilus</i> AUX FACTEURS DE CROISSANCE....</b>	<b>17</b>
I.3.1 Facteur X et biosynthèse de l'hème .....	17
I.3.2 Facteur V et biosynthèse du NAD .....	17
<b>I.4 LES FACTEURS DE VIRULENCE.....</b>	<b>18</b>
I.4.1 La capsule polysaccharidique .....	18
I.4.2 La protéase d'immunoglobuline A1 .....	20
I.4.3 Les lipooligosaccharides .....	20
I.4.4 Les adhésines .....	21
I.4.5 Les pili .....	21
I.4.6 Les protéines de la membrane externe .....	22
<b>I.5 MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES ET TYPAGE DES</b>	
<b><i>Haemophilus</i> .....</b>	<b>22</b>
I.5.1 Séquençage du génome entier.....	23
I.5.2 L'approche <i>Multilocus enzyme electrophoresis</i> .....	24
I.5.3 L'approche Multilocus Sequence Typing .....	25
I.5.4 Ribosomal MultiLocus Sequence Typing.....	29
<b>I.6 DIAGNOSTIC DES INFECTIONS À <i>Haemophilus</i>.....</b>	<b>31</b>
I.6.1 Méthodes conventionnelles.....	31
I.6.2 Méthodes moléculaires .....	32
I.6.3 Sérotypage des <i>Haemophilus influenzae</i> .....	32
I.6.4 Identification par protéomique.....	32
<b>I.7 TRAITEMENT DES INFECTIONS À <i>Haemophilus</i> .....</b>	<b>33</b>
<b>I.8 MÉCANISMES DE RÉSISTANCE DES <i>Haemophilus</i> AUX</b>	
<b>ANTIBIOTIQUES.....</b>	<b>34</b>
I.8.1 Mécanisme de résistance aux bêta-lactamines .....	34
I.8.2 Mécanisme de résistance aux aminoglycosides .....	35
I.8.3 Mécanisme de résistance aux rifamicines .....	35
I.8.4 Mécanisme de résistance aux phénicolés .....	36
I.8.5 Mécanisme de résistance aux sulfamides : inhibiteurs du métabolisme de l'acide folique .....	37
I.8.6 Mécanisme de résistance aux cyclines.....	38
I.8.7 Mécanisme de résistance aux quinolones .....	38
I.8.8 Mécanisme de résistance aux macrolides .....	39
I.8.9 Formation de biofilm .....	39
<b>I.9 PATHOGÉNÈSE.....</b>	<b>40</b>

<b>I.10 MANIFESTATIONS CLINIQUES .....</b>	<b>41</b>
<b>I.11 PREVENTION DES INFECTIONS À <i>Haemophilus</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>I.12 ÉPIDÉMIOLOGIE.....</b>	<b>42</b>
I.12.1 Portage .....	42
I.12.2 Transmission.....	42
I.12.3 <i>Haemophilus influenzae</i> non typables.....	43
I.12.4 <i>Haemophilus influenzae</i> sérotype b .....	44
<b>I.13 STRATÉGIES DE VACCINATION POUR LES INFECTIONS À <i>Haemophilus influenzae</i> NON TYPABLES .....</b>	<b>44</b>
<b>CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>47</b>
<b>II.1 CARACTÉRISTIQUES DE L'ETUDE.....</b>	<b>47</b>
II.1.1 Type et durée de l'étude .....	47
II.1.2 Lieux d'étude.....	47
II.1.3 Période de l'étude .....	47
II.1.4 Population d'étude.....	47
II.1.5 Critères d'inclusion, de non inclusion et d'exclusion.....	48
II.1.5.1 Critères d'inclusion .....	48
II.1.5.2 Critères de non inclusion et d'exclusion .....	48
II.1.6 Taille de l'échantillon et justification .....	48
II.1.7 Procédure de collecte des échantillons .....	48
II.1.8 Considération éthique.....	49
II.1.9 Risques potentiels.....	49
II.1.10 Bénéfices .....	50
II.1.11 Mesures prises pour la confidentialité des données, archivage et le respect de la vie privée des participants .....	50
<b>II.2 DÉTECTION DES BACTÉRIES RESPIRATOIRES.....</b>	<b>51</b>
II.2.1 PCR en temps réel .....	51
II.2.1.1 Extraction de l'ARN.....	51
II.2.1.2 Amplification par RT-PCR .....	52
II.2.2 Culture bactériologique .....	54
II.2.3 Caractérisation phénotypique des isolats.....	55
II.2.3.1 Coloration de Gram.....	55
II.2.3.2 Test à l'optochine .....	56
II.2.3.3 Test à la catalase.....	56

II.2.3.4 Vitek 2 pour l'identification des bactéries .....	57
II.2.3.5 Galeries de tests biochimiques API 20E .....	58
II.2.3.6. Test d'agglutination au latex .....	59
II.2.3.7 Test de la coagulase.....	60
II.2.3.8 Identification des colonies des espèces <i>Haemophilus</i> .....	60
II.2.4 Diagnostic de la tuberculose.....	61
II.2.5 Analyses statistiques.....	61
<b>II.3 IDENTIFICATION DES ESPÈCES <i>Haemophilus</i> ET DIVERSITE GENETIQUE.....</b>	<b>62</b>
II.3.1 Approche experimentale.....	62
II.3.2 Biotypage des <i>Haemophilus</i> .....	62
II.3.2.1 Test à l'indole.....	62
II.3.2.2 Test à l'uréase.....	63
II.3.2.3 Test à l'ornithine décarboxylase.....	64
II.3.2.4 Interprétation des biotypes .....	65
II.3.3 Test de facteurs de croissance .....	66
II.3.3.1 Principe.....	66
II.3.3.2 Mode opératoire .....	66
II.3.3.3 Lecture et interprétation .....	66
II.3.4 Identification par spectrométrie de masse .....	67
II.3.4.1 Principe.....	67
II.3.4.2 Mode opératoire .....	68
II.3.5 Identification des <i>Haemophilus</i> par PCR .....	69
II.3.5.1 Extraction de l'ADN par choc thermique.....	69
II.3.5.2 Mode opératoire de purification de l'ADN : QIAquick® PCR purification kit ...	70
II.3.5.3 Amplification des gènes <i>fucK</i> , <i>IgA</i> , <i>ompP2</i> et <i>hpd</i> .....	70
II.3.5.4 Analyse des produits PCR: électrophorèse .....	71
II.3.6 Séquençage du génome entier .....	72
II.3.6.1 Principe du séquençage Illumina.....	72
II.3.6.2 Extraction du culot d'ADN génomique.....	72
II.3.6.3 Mode opératoire du séquençage Illumina .....	73
II.3.7. Identification des espèces <i>Haemophilus</i> par BLAST et par <i>ribosomal Multilocus Sequence Typing</i> .....	73

II.3.8 Analyse de la diversité génétique .....	73
II.3.9 Analyses statistiques.....	74
<b>II.4 SÉROTYPAGE D'<i>Haemophilus influenzae</i> .....</b>	<b>75</b>
II.4.1 Séro-agglutination des isolats d' <i>Haemophilus influenzae</i> .....	75
II.4.1.1 Principe.....	75
II.4.1.2 Précautions ou conditions préopératoires.....	75
II.4.1.3 Test d'auto-agglutination de l'isolat .....	75
II.4.1.4 Test d'agglutination.....	76
II.4.1.5 Lecture et interprétation .....	76
II.4.2 Identification du type capsulaire des <i>Haemophilus influenzae</i> par PCR .....	76
II.4.2.1 Mode opératoire N°1 .....	77
II.4.2.2 Mode opératoire N°2 .....	77
II.4.2.3 Révélation.....	79
II.4.3 Analyses statistiques.....	79
<b>II.5 ANTIBIOGRAMMES ET ANALYSES DES MODIFICATIONS MOLÉCULAIRES ASSOCIÉES À LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....</b>	<b>80</b>
II.5.1 Détermination de l'activité bêta-lactamase (céfinase).....	80
II.5.1.1 Principe.....	80
II.5.1.2 Mode opératoire .....	81
II.5.1.3 Lecture et interprétation .....	81
II.5.2 Test de sensibilité des <i>Haemophilus</i> par la méthode de diffusion .....	81
II.5.2.1 Préparation de l'inoculum .....	81
II.5.2.2 Ensemencement de la gélose.....	82
II.5.2.3 Dépôt des disques imprégnés d'antibiotique et des bandelettes E-test .....	82
II.5.2.4 Incubation des boîtes de Pétri.....	83
II.5.2.5 Lecture des boîtes après incubation.....	83
II.5.2.6 Interprétation des résultats.....	83
II.5.3 Conservation des isolats d' <i>Haemophilus</i> .....	84
II.5.4 Analyse des modifications moléculaires associées des espèces <i>Haemophilus</i> à la résistance aux antibiotiques .....	84
II.5.4.1 Identification des mutations de la PLP3 des isolats d' <i>Haemophilus</i> résistants aux bêta-lactamines.....	84

II.5.4.2 Recherche des mécanismes moléculaires de la résistance aux fluoroquinolones	88
II.5.4.3 Recherche des mécanismes moléculaires de la résistance aux rifamicines.....	88
II.5.4.4 Recherche des mécanismes moléculaires de la résistance aux phénicolés .....	89
II.5.4.5 Recherche des mécanismes moléculaires de la résistance aux macrolides .....	89
II.5.4.6 Mécanisme moléculaire de la résistance aux cyclines .....	91
II.5.5 Analyses statistiques.....	92
<b>CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>94</b>
<b>III.1 DÉTERMINATION DE LA FRÉQUENCE DE DÉTECTION DES DIFFÉRENTES BACTÉRIES RESPIRATOIRES ET DES FACTEURS ASSOCIÉS .....</b>	<b>94</b>
III.1.1 Caractéristiques sociodémographiques et cliniques de la population d'étude.....	94
III.1.2 Détection bactérienne et mycobactérienne .....	96
III.1.3 Co-détection bactérienne.....	100
III.1.4 Comparaison des techniques de détection bactérienne.....	100
III.1.5 Différents types d'infection des voies respiratoires .....	102
III.1.6 Discussion partielle .....	102
<b>III.2 IDENTIFICATION ET DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES <i>Haemophilus</i></b>	<b>110</b>
III.2.1 Caractéristiques de la population d'étude à culture positive pour les <i>Haemophilus</i> .....	110
III.2.2 Test des facteurs de croissance.....	110
III.2.3 Identification par PCR.....	111
III.2.4 Identification par MALDI-TOF .....	111
III.2.5 Identification par rMLST .....	112
III.2.6 Identification des <i>Haemophilus</i> par BLAST du gène <i>rpoB</i> et du génome entier .....	112
III.2.7 Évaluation de la performance des techniques .....	113
III.2.8 Biotypage .....	114
III.2.9 Étude de la diversité génétique des <i>Haemophilus</i> .....	114
III.2.10 Discussion partielle .....	118
<b>III.3 IDENTIFICATION DU TYPE CAPSULAIRE ET ÉVALUATION DE L'IMPACT DE LA VACCINATION CONTRE <i>Haemophilus influenzae</i> SÉROTYPE b .....</b>	<b>123</b>
III.3.1 Taux de couverture vaccinale.....	123
III.3.2 Détermination du type capsulaire (sérotipe) des <i>H. influenzae</i> .....	123
III.3.3 Impact de la vaccination contre <i>Haemophilus influenzae</i> type b .....	125
III.3.4 Discussion partielle .....	125

<b>III.4 PROFIL DE RÉSISTANCE DES ISOLATS DES <i>Haemophilus</i> AUX ANTIBIOTIQUES ET MODIFICATIONS MOLÉCULAIRES ASSOCIÉES.....</b>	<b>128</b>
III.4.1 Caractéristiques de la population d'étude .....	128
III.4.2 Sensibilité des isolats d' <i>Haemophilus</i> aux antibiotiques.....	128
III.4.3 Mécanismes de résistance aux bêta-lactamines.....	129
III.4.4 Mécanisme de résistance au chloramphénicol: production de chloramphénicol acétyltransférase .....	134
III.4.5 Mécanismes de résistance aux fluoroquinolones: mutations dans les QRDR .....	134
III.4.6 Mécanismes de résistance aux rifamicines: mutations du gène <i>rpoB</i> .....	137
III.4.7 Discussion partielle .....	138
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>144</b>
<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>145</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>146</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>cxli</b>
<b>LISTE DES PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE .....</b>	<b>clxxvii</b>



## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribo-Nucléique
ARN	Acide Ribo-Nucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	acide ribonucléique ribosomique
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BURST	<i>Based Upon Related Sequence Types</i>
CAT	Chloramphénicol Acétyltransférase
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CV	<i>Conjugate vaccine</i>
dNTP	deoxyribose nucléoside triphosphate
DO	Densité Optique
EI	Écart Interquartile
FTD	<i>Fast Tract Diagnostic</i>
hia	<i>Haemophilus influenzae</i> Serotype a
hib	<i>Haemophilus influenzae</i> Serotype b
hic	<i>Haemophilus influenzae</i> Serotype c
hid	<i>Haemophilus influenzae</i> Serotype d
hie	<i>Haemophilus influenzae</i> Serotype e
hif	<i>Haemophilus influenzae</i> Serotype f
IC	Intervalle de Confiance
MHF	<i>Mueller Hinton Fastidious Agar</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
ODC	Ornithine Décarboxylase
Omp	<i>Outer membrane protein</i>
pb	paire de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEV	Programme Elargi de Vaccination
rMLST	<i>Ribosomal MLST</i>
rps	<i>ribosome protein subunit</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Real Time PCR</i>
ST	Sequence Type
T <sub>m</sub>	température de fusion
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages</i>
ZI	Zone d'inhibition

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Caractéristiques différentielles des espèces du genre <i>Haemophilus</i> .....	11
Tableau II: Liste des gènes cibles pour le kit FTD.....	53
Tableau III: Biotypes des <i>Haemophilus</i> à partir des tests biochimiques.....	65
Tableau IV: Besoins en facteurs de croissance (V, X et XV) en fonction des espèces d' <i>Haemophilus</i> .....	67
Tableau V: Caractéristiques des amorces des pour l'amplification des gènes <i>fucK</i> , <i>IgA</i> , <i>ompP2</i> et <i>hpd</i> .....	71
Tableau VI: Caractéristiques des amorces des types capsulaires et des amplicons .....	78
Tableau VII: Caractéristiques des amorces du gène <i>ftsI</i> .....	85
Tableau VIII: Programme d'amplification du gène <i>ftsI</i> .....	85
Tableau IX: Programme d'amplification de la portion du gène <i>ftsI</i> à séquencer.....	87
Tableau X: Caractéristiques sociodémographiques et cliniques de la population d'étude.....	95
Tableau XI: Détection des bactéries à Gram positifs et atypiques par culture et RT-PCR.....	98
Tableau XII: Détection des bactéries à Gram négatif par culture et RT-PCR .....	99
Tableau XIII: Co-détection bactérienne .....	101
Tableau XIV: Caractéristiques de la population d'étude.....	110
Tableau XV: Résultats d'évaluation de performance entre les différentes techniques d'identification.....	114
Tableau XVI: Caractéristiques de la population d'étude pour la détermination du type capsulaire .....	124
Tableau XVII: Caractéristiques des patients et antibiothérapie préalable.....	128
Tableau XVIII: Profil de résistance des isolats d' <i>Haemophilus</i> aux antibiotiques .....	129
Tableau XIX: Mutations d'acides aminés de la Protéine de Liaison à la Pénicilline 3 des isolats d' <i>Haemophilus</i> résistants aux $\beta$ -lactamines .....	133
Tableau XX: Diamètre de la zone d'inhibition, CMI des fluoroquinolones et mutations des acides aminés des QRDR des gènes <i>gyrA</i> et <i>parC</i> dans les isolats d' <i>Haemophilus</i> .....	136
Tableau XXI: Diamètres d'inhibition, CMI de la rifampicine et mutations d'acides aminés du gène <i>rpoB</i> dans les isolats d' <i>Haemophilus</i> .....	138

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Morphologie cellulaire d'une souche de <i>H. influenzae</i> (à gauche) et d'une souche de <i>H. parainfluenzae</i> (à droite), illustrant l'ampleur du pléomorphisme pouvant être observé chez les bactéries appartenant à ce genre. ....	9
Figure 2: Structure des polysaccharides capsulaires de <i>H. influenzae</i> . ....	13
Figure 3: Utilisation du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) chez les <i>Pasteurellaceae</i> . ....	18
Figure 4: Loci des capsules pour les sérotypes a, b, c, d, e et f de <i>H. influenzae</i> . ....	19
Figure 5: Dendrogramme Neighbor-joining illustrant les liens phylogénétiques entre les souches types de <i>H. influenzae</i> , <i>H. aegyptius</i> et <i>H. haemolyticus</i> à partir des fragments de gènes concaténés <i>adk</i> , <i>atpG</i> , <i>frdB</i> , <i>mdh</i> , <i>pgi</i> et <i>recA</i> . ....	26
Figure 6: Analyses eBURST des isolats de <i>H. influenzae</i> . ....	28
Figure 7: Arbre phylogénétique (Neighbour-joining) du domaine bactérien entier reconstruit à partir des séquences de gène de protéines ribosomales concaténées. ....	30
Figure 8: Arbre phylogénétique représentant les 4 groupes <i>ftsI</i> à partir de la séquence d'alignements multiples d'acides aminés CLUSTALW déduit des séquences d'ADN de tous les allèles <i>ftsI</i> définis. ....	35
Figure 9: Résultats du test à l'indole. ....	63
Figure 10: Résultats du test à l'uréase. ....	64
Figure 11: Résultats du test à l'ornithine décarboxylase. ....	65
Figure 12: Halo de croissance autour des disques de facteurs de croissance. ....	66
Figure 13: Test de séro-agglutination des isolats d' <i>Haemophilus influenzae</i> . ....	76
Figure 14: Activité $\beta$ -lactamase. ....	81
Figure 15: Inhibition de la croissance bactérienne. ....	83
Figure 16: Répartition des bactéries atypiques selon la tranche d'âge. ....	96
Figure 17: Proportion des espèces d' <i>Haemophilus</i> identifiées à partir des facteurs de croissance. ....	111
Figure 18: Proportion des espèces d' <i>Haemophilus</i> identifiées par PCR. ....	111
Figure 19: Proportion des espèces d' <i>Haemophilus</i> identifiées par MALDI-TOF. ....	112
Figure 20: Résultat de l'identification des <i>Haemophilus</i> par rMSLT. ....	112
Figure 21: Résultat de l'identification des <i>Haemophilus</i> par BLAST du gène <i>rpoB</i> et du génome entier. ....	113

Figure 22: Arbres SplitsTree de Neighbor-Net générés à l'aide de SplitsTree4 pour visualiser les espèces d' <i>Haemophilus</i> isolées chez des patients présentant des infections respiratoires. ....	115
Figure 23: Liens phylogénétiques entre les isolats de <i>H. influenzae</i> . ....	116
Figure 24: Profils alléliques neighbour-network des 73 isolats de <i>H. influenzae</i> par rapport aux loci annotés de la souche de référence Rd KW20. ....	117
Figure 25: Taux de couverture du vaccin contre <i>Haemophilus influenzae</i> type b suivant le groupe d'âge dans les sites d'étude. ....	123
Figure 26: Impact de la vaccination sur la circulation d' <i>Haemophilus influenzae</i> type b ....	125
Figure 27: Proportion des allèles ftsI du groupe I des <i>H. influenzae</i> identifiés. ....	130
Figure 28: Mutations de la Protéine de Liaison à la Pénicilline 3. ....	131
Figure 29: Substitutions d'acides aminés issues de la traduction du gène <i>gyrA</i> et <i>parC</i> . ....	134
Figure 30: Substitutions d'acides aminés issues de la traduction du gène <i>rpoB</i> . ....	137

## RÉSUMÉ

Les maladies respiratoires sont une cause majeure de morbidité et de mortalité dans le monde entier, l'Afrique étant l'un des continents le plus affecté. Les bactéries parmi lesquelles les *Haemophilus* constituent l'une des principales causes et peu d'informations sont disponibles en ce qui les concerne au Cameroun. L'objectif de cette étude consistait à détecter les bactéries chez les patients souffrant d'infections des voies respiratoires à Yaoundé, et de caractériser les isolats d'*Haemophilus*. Il s'agissait d'une étude prospective descriptive dans la ville de Yaoundé qui s'est déroulée de 2017 à 2018. Les échantillons cliniques prélevés chez les patients souffrant d'infection des voies respiratoires étaient soumis à la culture et une RT-PCR pour la recherche des bactéries respiratoires. Les isolats d'*Haemophilus* ont été identifiés suivant une approche phénotypique, protéomique et génotypique, puis la détermination du type capsulaire, de l'antibiotype et de la diversité génétique. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SPSS avec un seuil de significativité fixé à  $< 5\%$ . Au total, 440 participants ont été enrôlés dans cette étude. Les bactéries ont été détectées chez 68% (299/440) des patients et pouvaient être groupées en Gram négatif avec 47% (207/440), Gram positif avec 35,7% (157/440), atypiques avec 4,3% (19/440) et mycobactéries avec 8,6% (38/440). Les *Haemophilus* étaient les bactéries les plus détectées indépendamment des méthodes utilisées, suivies des pneumocoques, soit 21,6% et 10,9% respectivement par culture. La fréquence de détection bactérienne par culture était de 32% (141/440) contre 58,6% (258/440) par RT-PCR ( $p < 0,001$ ). Les facteurs associés à la détection bactérienne étaient socio-démographiques et cliniques. L'identification des 95 isolats d'*Haemophilus* a révélé 76,8% d'*Haemophilus influenzae*, 14,7% d'*Haemophilus haemolitycus* et 6,3% d'*Haemophilus parainfluenzae*. Ces isolats étaient très divers sur le plan génétique. Des 73 isolats d'*Haemophilus influenzae*, 3 isolats capsulés (4,1%) ont été identifiés chez des patientes (de type b, e et f). La résistance des *Haemophilus* aux antibiotiques était dominée par celle aux sulfamides (99%) suivie de celle aux  $\beta$ -lactamines (55,3%). Les modifications moléculaires associées aux antibiotypes incluaient la modification de la cible (mutation) et la production d'enzymes. Les *Haemophilus* et les pneumocoques étaient les bactéries les plus détectées dans cette étude. L'outil moléculaire utilisé au cours de l'investigation a augmenté le rendement de la détection bactérienne. Les espèces d'*Haemophilus* circulant à Yaoundé sont variables et présentent une haute diversité génétique. La circulation d'*Haemophilus influenzae* de type b de nos jours demeure une menace pour la santé publique tout comme la résistance aux antibiotiques.

**Mots-clés:** Bactéries respiratoires, *Haemophilus*, sérotype, antibiotypes, diversité génétique

## ABSTRACT

Respiratory diseases are the major cause of morbidity and mortality worldwide, with Africa being one of the most affected continents. Bacteria among which *Haemophilus* is one of the main causes and little information is available with regard to Cameroon. The objective of this study was to detect bacteria in patients suffering from respiratory tract infections in Yaoundé, and to characterize the *Haemophilus* isolates. This was a prospective descriptive study in the city of Yaoundé which took place from 2017 to 2018. The clinical samples collected from patients with respiratory tract infections were subjected to culture and an RT-PCR for the search for respiratory bacteria. *Haemophilus* isolates were identified using a phenotypic, proteomic and genotypic approach followed by determination of capsular type, antibiotic resistance profile and genetic diversity. The data were analyzed using SPSS software with a significance level set at <5%. A total of 440 participants were enrolled in this study. Bacteria were detected in 68% (299/440) of patients and could be grouped as Gram negative with 47% (207/440), Gram positive with 35.7% (157/440), atypical with 4.3% (19/440) and mycobacteria with 8.6% (38/440). *Haemophilus* sp. were the most detected bacteria regardless of the methods used, followed by pneumococci : 21.6% and 10.9% respectively per culture. The frequency of bacterial detection by culture was 32% (141/440) versus 58.6% (258/440) by RT-PCR (p <0.001). Factors associated with bacterial detection were socio-demographic and clinical. Identification of the 95 *Haemophilus* isolates revealed 76.8% *Haemophilus influenzae*, 14.7% *Haemophilus haemolitycus* and 6.3% *Haemophilus parainfluenzae*. These isolates were very genetically diverse. Of the 73 isolates of *Haemophilus influenzae*, 3 encapsulated isolates (4.1%) were identified (types b, e and f). The antibiotic resistance profile of *Haemophilus* sp. was dominated by that to sulfonamides (99%) followed by that to  $\beta$ -lactams (55.3%). Molecular changes associated with antibiotic resistance include target modification (mutation) and production of enzymes. *Haemophilus* sp. and pneumococci were the bacteria most detected in this study. The molecular tool used during the investigation increased the yield of bacterial detection. The *Haemophilus* species circulating in Yaoundé are variable and present a high genetic diversity. The circulation of *Haemophilus influenzae* type b today remains a threat to public health, as does resistance to antibiotics.

**Keywords:** Respiratory bacteria, *Haemophilus*, serotype, antibiotypes, genetic diversity

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les infections des voies respiratoires causées par les virus, les bactéries ou les champignons constituent un lourd fardeau pour l'humanité. Elles sont une cause majeure de morbidité et de mortalité au sein de toutes les tranches d'âge dans le monde entier (Xirogianni *et al.*, 2013). Ces infections représentent un groupe hétérogène parmi les problèmes infectieux aigus communs et se caractérisent par des éléments de diagnostic et des symptômes qui sont parfois difficiles à distinguer les uns des autres. Selon leur localisation, on distingue les infections respiratoires supérieures ou hautes et les infections des voies respiratoires inférieures ou basses (Khan *et al.*, 2015; Ndip *et al.*, 2008; Neumark, 2010; Thompson *et al.*, 2013). Avec un total de 3.941.000 de décès dans le monde (Khan *et al.*, 2015), la plupart de ces décès surviennent en Afrique subsaharienne et en Asie du Sud.

Les études sur les bactéries respiratoires autres que les mycobactéries déjà menées au Kenya (Feikin *et al.*, 2012), Nigeria (Taura D.W., 2013), Ghana (Donkor *et al.*, 2012), en Afrique du Sud (Nzenze *et al.*, 2014; Shiri *et al.*, 2013), Maroc (Jroundi *et al.*, 2014), Gambie (Forgie *et al.*, 1991; Mulholland *et al.*, 1999) ont porté pour la plupart sur la caractérisation phénotypique avec peu d'investigations sur le plan moléculaire. Parmi les études effectuées à ce jour au Cameroun sur les bactéries respiratoires (Koulla-Shiro *et al.*, 1996, 1997; Ndip *et al.*, 2008; Pefura Yone, Kuaban, Afane Ze, *et al.*, 2012; Pefura Yone, Kuaban, Leonie, *et al.*, 2012), celles de Koulla-Shiro en 1997 et Ndip en 2008 (Koulla-Shiro *et al.*, 1997; Ndip *et al.*, 2008) essentiellement dans la ville de Yaoundé et de Buea respectivement ne portent que sur les caractérisations phénotypiques (détection bactérienne et/ou profil de résistance) et aucune information sur le typage moléculaire. La caractérisation de l'agent causal d'infections respiratoires est cruciale pour la réduction de la morbidité et la prévention de l'utilisation excessive et inappropriée d'antibiotique à l'origine de résistance antimicrobienne (Xirogianni *et al.*, 2013). La saisonnalité (Chen *et al.*, 2015; Numminen *et al.*, 2015), l'immuno-dépression (von Gottberg *et al.*, 2012; Yone *et al.*, 2012), les maladies cardiaques chroniques et pulmonaires, le tabagisme, l'asplénie (Ortqvist *et al.*, 2005), l'âge et le sexe sont des facteurs pouvant influencer la prévalence des infections des voies respiratoires (Erling *et al.*, 1999).

Parmi les bactéries impliquées dans les infections des voies respiratoires, celles appartenant au genre *Haemophilus* constituent une étiologie majeure (Tchatchouang *et al.*, 2018), pouvant être responsables d'infections plus sévères comme les septicémies et des méningites (Yu-Ching Su, 2014). Avant l'introduction des vaccins conjugués dans la plupart



des pays dans le monde, ces micro-organismes colonisant le nasopharynx chez l'homme (Tikhomirova & Kidd, 2013), étaient des causes de morbidité et de mortalité les plus courantes chez les jeunes enfants. Ces bactéries sont meurtrières et entraînent également des pertes économiques importantes dans les pays sous-développés et en particulier en Afrique subsaharienne.

L'incidence annuelle des infections à *Haemophilus influenzae* varie entre 22 et 24 cas/100 000 enfants âgés de moins de 5 ans. *Haemophilus influenzae* de type b (*hib*) causerait environ 8,13 millions de maladies graves dans le monde et environ 400 000 décès chez les enfants de moins de cinq ans chaque année (Odile B. Harrison, 2011; Watt JP, 2009). Dans les pays en développement où se produit la grande majorité des décès due à *hib*, les infections des voies respiratoires comme la pneumonie est à l'origine d'un plus grand nombre de décès bien plus que la méningite (Stephen Tristram *et al.*, 2007).

La présence de la capsule polysaccharidique est un facteur de virulence pour *Haemophilus influenzae* et 6 types capsulaires existent (a, b, c, d, e et f) (Agrawal & Murphy, 2011) dont le type b responsable d'infection grave. Pour contrôler ces infections, les mesures préventives (vaccination) et curatives à partir des traitements antimicrobiens sont pratiquées. Un vaccin a été recommandé depuis plus d'une décennie dans de nombreux pays à travers le monde. En 2009, le Programme Elargi de Vaccination (PEV) au Cameroun a introduit le vaccin conjugué contre *Haemophilus influenzae* de sérotype b (*hib*) dans une formulation pentavalente (diphtérie, tétanos, coqueluche, hépatite B et *hib*) chez les enfants âgés de 0 à 11 mois pour la prévention (Gaingne, 2009; Massenet *et al.*, 2013).

Depuis l'introduction du vaccin contre *hib* dans de nombreux pays, le poids des infections liées à *Haemophilus* est de plus en plus dominé par les non *hib*. Au Cameroun, après la mise en place du vaccin, aucun cas de méningite à *hib* n'a été enregistrée dans le grand Nord (Massenet & Tapindjin-Gake, 2010), ce qui montre l'impact positif du vaccin. Par ailleurs, l'échec du vaccin a été observé dans d'autres pays (Royaume-Uni, Koweït) (Lee *et al.*, 2008; Purohit *et al.*, 2014) et les espèces *Haemophilus* impliquées dans les infections respiratoires ont fait l'objet de très peu d'études au Cameroun car la plupart des données porte uniquement sur la caractérisation phénotypique. L'identification des souches non capsulées de *H. influenzae* est parfois difficile, comme l'identification erronée de *H. haemolyticus* en tant que souches non capsulées de *H. influenzae* (R. Anderson *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014) en raison de leur grande similarité sur le plan morphologique, de biochimique et génétique (Raydel Anderson *et al.*, 2012). L'identification des véritables espèces d'*Haemophilus* au cours d'infection est

actuellement un domaine d'étude en expansion, ainsi que la compréhension de leur pathogénie. En effet, leur colonisation commence par les voies respiratoires supérieures suivie d'une propagation dans l'arbre respiratoire, entraînant potentiellement des infections invasives (van Belkum *et al.*, 2007). L'identification erronée de *H. haemolyticus* a un impact potentiel sur l'évaluation de la prévalence des souches de *H. influenzae* résistant aux antibiotiques (Witherden *et al.*, 2013). Les souches non capsulées de *H. influenzae* sont associées aux infections des voies respiratoires entraînant souvent la prescription d'antibiotiques, tandis que *H. haemolyticus* est rarement associé à une maladie (Pickering *et al.*, 2014) et qu'un traitement antibiotique probabiliste peut sélectionner des souches résistantes.

La résistance aux antibiotiques s'est développée dans le monde entier et est plus accentuée dans les pays sous-développés ou en voie de développement due à l'utilisation inappropriée d'antibiotiques ou de l'automédication (Ajibola *et al.*, 2018; Moise *et al.*, 2017; Ngu *et al.*, 2018). En plus du type capsulaire, le profil génotypique est plus étroitement associé à la résistance aux antibiotiques (Desai *et al.*, 2015; Haşcelik & Kittana, 2018; Moustououi *et al.*, 2000). Avec le poids des infections respiratoires supporté par les pays d'Afrique subsaharienne, la surveillance épidémiologique des *Haemophilus* est essentielle dans cette région du monde. Ainsi, se pose le problème de la caractérisation des *Haemophilus* impliqués dans les infections des voies respiratoires au Cameroun, des sérotypes qui ne sont pas inclus dans le vaccin et qui seraient très variés.

Les caractérisations moléculaires et les techniques sérotypiques avec leurs grandes sensibilités ont été développées ces dernières années permettant d'améliorer les études sur les *Haemophilus*. Lors de la planification des interventions visant à contrôler une maladie, il est essentiel de comprendre son fardeau (Simon Brooker, 2000). En l'absence de données fiables sur ces agents bactériens dans un pays comme le Cameroun, une étude devrait être envisagée dans le but de planifier les efforts contre ces menaces. Réduire la morbidité et la mortalité dues à *Haemophilus* exige une meilleure compréhension de la fréquence de détection, des sérotypes circulants, du profil de résistance aux antibiotiques et de la diversité génétique.

Le profil des souches circulantes d'*Haemophilus* à l'ère post-vaccinale fournirait donc des données pour l'évaluation des programmes de contrôle visant à améliorer la santé au Cameroun. C'est dans ce sillage que nous nous sommes proposés de décrire les bactéries détectées chez les patients souffrant d'infections des voies respiratoires à Yaoundé au Cameroun et de typer les différentes espèces d'*Haemophilus*.

## **Question de recherche**

Quels sont les bactéries et les profils phénotypiques et génotypiques des *Haemophilus* chez les patients souffrant d'infections des voies respiratoires à Yaoundé au Cameroun presque une décennie après introduction du vaccin conjugué contre *Haemophilus influenzae* de sérotype b au Cameroun ?

## **Questions de recherche spécifiques**

- Quelle est la fréquence de détection des bactéries respiratoires chez les patients souffrant d'infections des voies respiratoires à Yaoundé et les facteurs associés ?
- Quelles sont les espèces *Haemophilus* circulant et leur diversité génétique ?
- Quelle est la distribution des sérotypes circulants de *Haemophilus influenzae* à l'ère post vaccinale ?
- Quel est le profil de résistance de ces bactéries aux antibiotiques et les modifications moléculaires associées ?

## **Hypothèse de recherche**

La distribution des bactéries, le profil phénotypique et génotypique des isolats d'*Haemophilus* chez les patients souffrant d'infections des voies respiratoires au Cameroun après introduction du vaccin conjugué contre *Haemophilus influenzae* de sérotype b sont différents.

## **Hypothèses de recherche spécifiques**

- La fréquence de détection des bactéries chez les patients souffrant d'infections des voies respiratoires à Yaoundé est variable et influencée par plusieurs facteurs ;
- Plusieurs espèces d'*Haemophilus* circulent avec une grande diversité génétique ;
- La vaccination a un impact sur la distribution des sérotypes circulants de *Haemophilus influenzae* ;
- Le profil de résistance des *Haemophilus* aux antibiotiques est variable et implique des modifications moléculaires.

## **Objectif général de l'étude**

Ce projet de recherche consistait à détecter les bactéries et caractériser phénotypiquement et génotypiquement les isolats d'*Haemophilus* chez les patients souffrant d'infections des voies respiratoires à Yaoundé au Cameroun.

## **Objectifs spécifiques**

Plus spécifiquement, il s'agissait de :

- déterminer la fréquence de détection des différentes bactéries respiratoires et les facteurs associés ;
- décrire les différentes espèces *Haemophilus* et leur diversité génétique;
- déterminer la distribution des sérotypes circulants de *Haemophilus influenzae* à l'ère post-vaccinale ;
- déterminer le profil de résistance des bactéries *Haemophilus* aux antibiotiques et les modifications moléculaires associées.

**CHAPITRE I:**  
**REVUE DE LA LITTÉRATURE**

## **CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE**

### **I.1 INFECTION DES VOIES RESPIRATOIRES**

Les infections des voies respiratoires ont été identifiées comme l'une des principales causes de mortalité de l'enfant qui peuvent être faciles à prévenir. Elles sont responsables de 40 à 50% des consultations externes par les enfants, 20 à 40% des hospitalisations pédiatriques et 18 à 20% de décès chez les enfants (Science, 2009). Les infections des voies respiratoires sont des affections courantes chez l'Homme et qui représentent un fardeau pour la santé publique (Khan *et al.*, 2015). Selon leur localisation, les maladies peuvent être divisées en infections des voies respiratoires supérieures (ou hautes) et inférieures (ou basses) (Neumark, 2010).

#### **I.1.1 Infections des voies respiratoires supérieures**

Les infections des voies respiratoires supérieures se localisent au niveau de la bouche, le nez, la gorge, le larynx et la trachée. Les infections des voies respiratoires supérieures peuvent être l'une des affections suivantes: rhinopharyngite (rhume), sinusite, pharyngite, laryngite et laryngotrachéite (Grief, 2013).

Les infections des voies respiratoires supérieures sont courantes et importantes. Bien que rarement mortelles, elles sont une cause de morbidité importante et représentent un fardeau économique considérable (West, 2002).

#### **I.1.2 Infections des voies respiratoires basses**

Les infections des voies respiratoires basses, notamment la bronchite, la bronchiolite et la pneumonie sont les maladies à gros impacts et entraînent des pertes économiques importantes dans les pays à revenu faible, intermédiaire et en particulier ceux d'Afrique subsaharienne (Bates *et al.*, 2013; WHO, 2008) . En Afrique subsaharienne, les infections des voies respiratoires basses se classent au troisième rang des causes de mortalité après le VIH/SIDA et le paludisme. Les infections des voies respiratoires basses sont la principale cause de décès dans neuf pays africains ("Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013," 2015). Une analyse systématique réalisée en 2015 a révélé que ces infections avaient causé 2,74 millions de décès et 103 millions d'années de vie ajustée en fonction de l'incapacité dans le monde, ce qui en faisait la cinquième cause de décès dans le monde et deuxième cause principale d'années de vie ajustée en fonction de l'incapacité (GBD, 2017). Par rapport à d'autres régions, le fardeau de ces infections est plus lourd en Afrique subsaharienne et en Asie, où la mortalité est la plus élevée chez les enfants de moins de 5 ans.

Par exemple, 546,8 et 511,3 décès sur 100 000 ont été signalés en Somalie et au Tchad, respectivement. Entre temps, le taux de mortalité le plus bas a été enregistré en Finlande (0,65 décès pour 100 000 habitants) en Europe occidentale (GBD, 2017).

### **I.1.3 Étiologie des infections des voies respiratoires**

Une grande variété d'agents pathogènes peut causer des infections des voies respiratoires. La plupart des infections respiratoires sont causées par des virus et des bactéries.

Les virus les plus fréquemment signalés sont les virus respiratoires syncytiaux, virus grippaux A et B, virus Para influenza, rhinovirus humain et adénovirus, responsables de la plupart des épisodes d'infections chez l'enfant. Au cours de la dernière décennie, plusieurs nouveaux virus associés aux infections des voies respiratoires ont été découverts dans des échantillons de voies respiratoires humaines (Satish & NM, 2016).

Plusieurs bactéries ont été identifiées comme étant l'étiologie de ces infections, notamment *Streptococcus pneumoniae* (pneumocoque), *Haemophilus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter*, *Streptococcus Viridans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et les espèces de *Proteus* (GBD, 2017; Tang *et al.*, 2019; M. Uzoamaka *et al.*, 2017).

Les mycobactéries responsables de la tuberculose jouent un rôle prépondérant sur le poids des infections respiratoires. En effet, 10,4 millions de personnes ont développé la tuberculose et 1,4 million de personnes en sont morts en 2015 (WHO, 2016).

## I.2 GÉNÉRALITES SUR LES *Haemophilus*

### I.2.1 Définition du genre

Petits bacilles polymorphes à Gram négatif (parfois en coccobacilles), les bactéries du genre *Haemophilus* sont des aéro-anaérobies facultatifs, immobiles, parasites obligatoires, exigeant pour leur croissance un ou deux facteurs à savoir la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) ou coenzyme I et/ou l'hémine présents dans le sang, dénommés respectivement facteurs V et X. Le genre est composé d'espèces diverses primitivement commensales des muqueuses de l'homme et des animaux. Le pourcentage des bases azotés G et C est compris entre 37 et 44%. Ces coccobacilles possèdent généralement une nitrate réductase et leur température optimale de croissance est de 35 à 37°C (Quentin *et al.*, 2000).

### I.2.2 Taxonomie

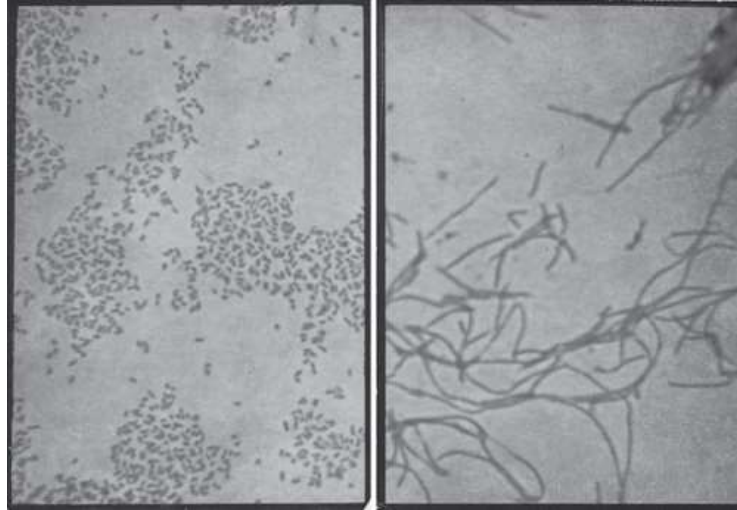
Les *Haemophilus* font partie de la classe des *Gamma Proteobacteria* et appartiennent à la famille des *Pasteurellaceae* comportant le genre *Haemophilus* (Cooley *et al.*, 2009; Naushad *et al.*, 2015; Winslow *et al.*, 1917).

Domaine :	Bacteria
Règne :	Eubacteria
Phylum :	Proteobacteria
Classe :	Gammaproteobacteria
Ordre :	Pasteurellales
Famille :	Pasteurellaceae
Genre :	Haemophilus

### I.2.3 Morphologie cellulaire

Les bactéries de l'espèce *Haemophilus* se présentent sous forme de petits bâtonnets immobiles ou coccobacilles. La formation de filaments est influencée par l'environnement et se développe à mesure que les cultures vieillissent et se trouvent dans des conditions de croissance moins optimales (Figure 1). Les capsules sont présentes chez certaines espèces, notamment *H. influenzae*, *H. paragallinarum* et *H. parasuis*, et présentent un intérêt particulier pour *H. influenzae* et *H. paragallinarum*, où elles jouent un rôle dans la pathogenèse, la détermination de la spécificité de type et l'induction de immunité anti-infectieuse. Des souches de *H. parainfluenzae* capsulées occasionnelles ont été décrites (Winslow *et al.*, 1917).





**Figure 1: Morphologie cellulaire d'une souche de *H. influenzae* (à gauche) et d'une souche de *H. parainfluenzae* (à droite), illustrant l'ampleur du pléomorphisme pouvant être observé chez les bactéries appartenant à ce genre (Winslow *et al.*, 1917).**

#### **I.2.4 Composition de la membrane cytoplasmique**

Les phospholipides membranaires d'*Haemophilus spp.* sont similaires à celles d'autres bactéries à Gram négatif, phosphatidyléthanolamine étant le type principal. De plus petites quantités de phosphatidylglycérine ont également été détectées. Il a été suggéré que des traces de lysophosphatidyléthanolamine pourraient être un marqueur caractéristique de *Pasteurellaceae* en général (Winslow *et al.*, 1917).

#### **I.2.5 Composition de la paroi cellulaire**

Les parois cellulaires ressemblent à celles d'autres bactéries à Gram négatif en termes de structure, de composition et d'activité endotoxique. Le lipopolysaccharide de *H. influenzae* est tronqué et marqué par une absence ou un taux réduit de longues chaînes O de polysaccharide et peut donc être décrit plus précisément en tant que lipooligosaccharide. Il se compose d'un lipide A d'ancrage à la membrane, d'un noyau interne d'acide 2-céto-3-désoxyoctulosonique à phosphorylation unique, lié à trois molécules d'heptose, et d'un oligosaccharide de noyau externe consistant en un hétéropolymère de glucose et de galactose et d'un sialylé lactosamine terminale. La composition et la liaison de ces unités saccharidiques dans le noyau externe du lipooligosaccharide de *H. influenzae* et, partant, dans les épitopes exprimés, présentent une hétérogénéité intra et inter-souches marquée. Le squelette du lipide A est un glucosamine disaccharide substitué par deux groupes phosphate (Winslow *et al.*, 1917).

Comme chez les autres membres de la famille des *Pasteurellaceae*, le nombre d'acides gras contenus dans la paroi des cellules d'*Haemophilus* est comparativement faible (Winslow *et al.*, 1917).

Les analyses des motifs de polyamine de cellules entières de souches représentatives d'espèces de la famille des *Pasteurellaceae* révèlent une diversité inattendue par rapport à celle observée pour d'autres bâtonnets à Gram négatif. Au moins sept types différents de polyamines sont présents parmi les membres de la famille. Toutes les espèces actuelles d'*Haemophilus*, à l'exception de *H. felis*, présentent une prédominance du 1,3-diaminopropane. Cependant, l'étendue de la diversité intra-spécifique n'est pas encore totalement connue (Winslow *et al.*, 1917).

De 25 à 35 protéines de la membrane externe ont été détectées dans les souches de *H. influenzae*, quelques-unes seulement représentant 80% du total des protéines de la membrane. Les principales protéines de la membrane externe sont P1 (PM 43–50 kDa), P2 (un doublet de PM 43–50 kDa avec activité porine), P4 (une lipoprotéine de PM 30 kDa), P5 (2 conformères de la même protéine) et P6 (une lipoprotéine de PM 16,6 kDa). La protéine initialement appelée P3 comprend à la fois la forme non modifiée de P1 et la forme modifiée de P5. Le polymorphisme de taille des protéines P1, P2 et P5 constitue la base du typage protéique de la membrane externe de *H. influenzae*. Bien que la P2 soit conservée dans les souches de *H. influenzae* sérovar b, elle est extrêmement diverse et montre une dérive antigénique dans les souches non capsulées (Winslow *et al.*, 1917).

### **I.2.6 Caractères coloniaux et cultureux**

Les surfaces des colonies des espèces *Haemophilus* sur un milieu suffisamment riche sont généralement non pigmentées ou légèrement jaunâtres, plates et convexes, et atteignent un diamètre de 0,5 à 2,0 mm en l'espace de 48 heures à 37 °C. *H. influenzae* subit une variation spontanée de phase dans l'opacité des colonies. Il a été identifié un locus de gène qui contribue à la variation d'opacité et est associé à la capacité de coloniser le nasopharynx des rats. La plupart des espèces produisent des colonies lisses, mais certaines variations sont observées, en particulier chez *H. parainfluenzae* et *H. aphrophilus*. Certaines espèces présentent une hémolyse  $\beta$  sur gélose au sang (voir tableau I). La croissance dans les bouillons montre généralement une turbidité uniforme, mais les souches de *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus* et *H. parainfluenzae* présentent une croissance granulaire avec des dépôts importants, en raison de l'agrégation des cellules (Weiser *et al.*, 1995).

**Tableau I: Caractéristiques différentielles des espèces du genre *Haemophilus* (Winslow *et al.*, 1917)**

Caractéristiques	1. <i>H. influenzae</i>	2. <i>H. aegyptius</i>	3. <i>H. aphrophiilus</i>	4. <i>H. arrium</i>	5. <i>H. dluceyi</i>	5. <i>H. haemoglobinophilus</i>	6. <i>H. haemolyticus</i>	8. <i>H. paracuniculus</i>	9. <i>H. paragalinarum</i>	10. <i>H. parahaemolyticus</i>	11. <i>H. parainfluenzae</i>	12. <i>H. paraprohaemolyticus</i>	13. <i>H. paraphrophilus</i>	14. <i>H. parasuis</i>	15. <i>H. segnis</i>	a. " <i>H. somnus</i> " <sup>a</sup>	b. " <i>H. ogini</i> " <sup>a</sup>
V-factor requirement	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
ALA- $\delta$ -porphyrins	-	-	W	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole production <sup>a</sup>	d	-	-	-	-	+	d	+	-	-	d	-	-	-	-	+	-
Urease <sup>a</sup>	d	+	-	-	-	-	+	+	-	+	d	+	-	-	-	-	d
Ornithine decarboxylase <sup>a</sup>	d	-	-	-	-	-	-	+	-	-	d	-	-	-	-	-	+
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemolysis	-	-	-	-	d	-	+	-	-	+	- <sup>b</sup>	+	-	-	-	-	-
D-Glucose, acid production	+	W	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+
D-Glucose, gas production	-	-	+	-	-	-	d	-	-	d	d	-	+	-	-	-	-
Acid from:																	
D-Fructose	-	-	+	+	-	-	W	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+
Sucrose	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	W	-	-
Lactose	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	d	-	-	-
D-Xylose	+	-	d	-	-	+	d	-	d	-	-	-	d	-	-	+	W
D-Ribose	+	W	+	-	-	d	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
D-Mannose	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-
D-Mannitol	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	W
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	+	-
$\beta$ -Galactosidase (ONPG test) <sup>b</sup>	-	-	+	+	-	d	-	+	+	-	d	d	+	-	d	d	
$\alpha$ -Fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	+	-	-	
Catalase	+	+	-	+	-	+	+	+	-	d	d	+	-	+	d	-	-
CO <sub>2</sub> enhances growth	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	d	+	+
Alkaline phosphatase	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
IgA1 protease	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>Pour variations chez *H. influenzae* et *H. parainfluenzae* en fonction du biotype ; + : positif; - : négatif; d : variable ;<sup>b</sup>Quelques souches de *H. parainfluenzae* biovar II montrent une faible (w) hémolyse.

### **I.2.7 Espèces du genre *Haemophilus***

Neuf espèces du genre *Haemophilus* décrites démontrent la spécificité de l'hôte pour l'homme. Ils peuvent être divisés en trois groupes partageant certains traits phénotypiques: le groupe *H. influenzae*, constitué des trois espèces dépendantes du facteur X, à savoir, *H. influenzae*, *Haemophilus aegyptius* et *H. haemolyticus*; le groupe *H. parainfluenzae*, constitué des cinq espèces indépendantes du facteur X, à savoir *H. parainfluenzae*, *Haemophilus parahaemolyticus*, *Haemophilus paraphrohaemolyticus*, *Haemophilus pittmaniae* et *Haemophilus sputorum* et un groupe comprenant uniquement *Haemophilus ducreyi*. Les caractéristiques phénotypiques différenciant les neuf espèces décrites d'*Haemophilus* des autres espèces de *Pasteurellaceae* sont présentées dans le tableau I (Nørskov-Lauritsen, 2014).

Le génome des espèces *Haemophilus* varie entre 1,8 et 2,8 Mb, *H. influenzae* étant la plus petite et *H. ducreyi* la plus grande parmi les espèces ayant pour habitat naturel l'homme (Winslow *et al.*, 1917). *H. influenzae* est le premier organisme vivant dont le génome a été entièrement séquencé. La séquence de 1,83 Mb de la souche Rd (variante d'une souche capsulaire de Serovar d) contient un total de 1743 gènes, dont plus de 40% n'ont pas d'homologue apparent de la fonction connue chez d'autres procaryotes analysés (Fleischmann *et al.*, 1995). La diversité génétique globale du genre *Haemophilus*, telle que révélée par les études d'hybridation ADN-ADN, est considérable. Les rapports de liaison à l'ADN de l'espèce type *H. influenzae* suivants ont été observés: *H. aegyptius*, 70%; *H. haemolyticus* 48–52%; *H. parainfluenzae*, 15–33% et *H. parasuis* 26% (Winslow *et al.*, 1917).

#### **I.2.7.1 *Haemophilus influenzae***

Coccobacilles ou petites tiges régulières  $0,3-0,5 \times 0,5-3,0 \mu\text{m}$ . Le pourcentage en mole de bases azotées G+C de l'ADN est de 39. Les colonies sur gélose au chocolat sont lisses, basses, convexes, grisâtres et translucides et atteignent un diamètre de 0,5 à 1,0 mm en 24 heures. Les souches capsulées produisent généralement des colonies plus grosses et plus mucoïdes (1–3 mm), qui ont tendance à fusionner sans ligne de démarcation visible. Sur des milieux d'agar transparents, les colonies de souches capsulées présentent une irisation lorsqu'elles sont examinées sous une lumière transmise obliquement (Winslow *et al.*, 1917).

Parmi les isolats capsulés, six sérovars (a-f) ont été identifiés et la figure 2 montre la structure des polysaccharides capsulaires de ces sérovars. Au total, 41 déterminants antigéniques capsulaires et somatiques ont été détectés dans une souche de *H. influenzae* sérovar b par immunoélectrophorèse croisée. Un nombre considérable de ces déterminants sont

communs aux déterminants antigéniques de souches de *H. haemolyticus*, de *H. parainfluenzae* et de diverses entérobactéries (Schiotz *et al.*, 1979).

Serovar	Structure
a	4)-β-D-Glc-(1→4)-D-ribitol-5-(PO <sub>4</sub> →
b	3)-β-D-Rib-(1→1)-D-ribitol-5-(PO <sub>4</sub> →
c	4)-β-D-GlcNac-(1→3)-α-D-Gal-1-(PO <sub>4</sub> →
	$\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ R \end{array}$
d	4)-β-D-GlcNac-(1→3)-β-D-ManANAc-(1→
	$\begin{array}{c} 6 \\ \uparrow \\   \\ R \end{array}$
e	3)-β-D-GlcNac-(1→4)-β-D-ManANAc-(1→
e'	3)-β-D-GlcNac-(1→4)-β-D-ManANAc-(1→
	$\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ 2 \\ \uparrow \\ \beta\text{-D-fructose} \end{array}$
f	3)-β-D-GalNac-(1→4)-α-D-GalNac-1-(PO <sub>4</sub> →
	$\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ \text{OAc} \end{array}$

R = OAc (0.8)  
H (0.8)

R = L-serine (0.41)  
L-threonine (0.14)  
L-alanine (0.41)

**Figure 2: Structure des polysaccharides capsulaires de *H. influenzae*.**

Le ribose (Rib) et le fructose sont présentés sous forme d'anneau furane. Le glucose (Glc), galactose (Gal), N-Acétylglucosamine (GlcNac) et N-acetylmannosamine (ManANAc) sont sous forme d'anneau pyrane (Winslow *et al.*, 1917).

Les souches de *H. influenzae* peuvent être affectées à l'un des huit biovars (I à VIII) en fonction de trois caractéristiques biochimiques, production d'indole et activités d'uréase et d'ornithine décarboxylase (Kilian, 1976; Nørskov-Lauritsen, 2014). La majorité des souches avec une capsule de sérovar b sont de biovar I, une observation qui a d'abord suggéré que les souches de sérovar b étaient distinctes des souches non capsulées, la plupart d'entre elles appartenant aux biovars II et III. Tous les isolats examinés jusqu'ici avec une capsule de sérovar d et e sont du biovar IV (Kilian, 1976).

*H. influenzae* possède une activité neuraminidase et pratiquement toutes les souches produisent une endopeptidase extracellulaire (IgA1 protéase) capable d'induire le clivage spécifique d'une liaison peptidique proline-sérine ou proline-thréonine dans la région charnière de l'immunoglobuline A1 humaine (Winslow *et al.*, 1917).

*H. influenzae* est présent dans les nasopharynx de la majorité des enfants en bonne santé. Le taux de portage chez les adultes est un peu moins élevé. On le rencontre rarement dans la

cavité buccale humaine et n'a été détecté chez aucune espèce animale, à l'exception des chimpanzés. Les souches capsulées sont hébergées de manière intermittente dans le nasopharynx d'une minorité d'individus en bonne santé (3 à 7%). Les sérovars b et f sont les sérovars les plus fréquemment rencontrés, alors que les souches de sérovar c sont rares (Winslow *et al.*, 1917).

*H. influenzae* a été isolé à l'origine de cas de grippe endémique et était alors considéré comme son agent causal. Il est fréquemment isolé lors des infections chroniques des voies respiratoires humaines supérieures et inférieures, des sinus paranasaux, des oreilles moyennes et de la conjonctive, conditions dans lesquelles *H. influenzae* joue un rôle important, bien que souvent probablement secondaire. Les souches impliquées dans de telles conditions sont généralement non capsulées et appartiennent aux biovars II ou III, comme la majorité des isolats provenant des voies respiratoires supérieures des sujets en bonne santé. Les souches capsulées du sérovar b sont l'une des trois causes les plus fréquentes de méningite bactérienne chez l'enfant et occasionnellement, provoquent une épiglottite aiguë (laryngite obstructive), une cellulite, une ostéomyélite et des infections articulaires (Winslow *et al.*, 1917).

### **I.2.7.2 *Haemophilus aegyptius***

Le nom commun de la bactérie est le bacille de Koch-Weeks, longues tiges minces de  $0,2-0,3 \times 2,0-3,0 \mu\text{m}$ . La croissance des souches fraîchement isolées sur la gélose au chocolat est lente. Après 48 heures, les colonies atteignent un diamètre d'environ 0,5 mm et sont lisses, basses, convexes, grisâtres et translucides. L'espèce ne pousse pas sur la gélose tryptique de soja (Difco) avec les facteurs X et V ajoutés, contrairement à *H. influenzae*, elle forme des colonies ressemblant à des comètes dans une gélose semi-solide. La présence de la capsule n'a pas été démontrée ici. Les bactéries de cette espèce produisent une endopeptidase extracellulaire séparant l'IgA1 et ont une activité neuraminidase. Les caractéristiques qui peuvent être utiles pour distinguer *H. aegyptius* de *H. influenzae* incluent une croissance plus médiocre sur la plupart des milieux, un manque de production d'indole et une fermentation de D-xylose, une morphologie bacillaire distincte, une activité hémagglutinante, une croissance ressemblant à une comète en semi-solide, les milieux, et la sensibilité à la troléandomycine. Cependant, aucune de ces caractéristiques ne différencie sans équivoque les deux espèces. Certaines souches n'ont pas l'enzyme ferrochélatase, qui insère le fer dans la protoporphyrine IX, et nécessite donc un protohème en tant que facteur X. La bactérie provoque une conjonctivite infectieuse aiguë ou subaiguë sous les climats chauds. Elle n'a pas été trouvée chez des individus en bonne santé. Des clones particuliers étroitement apparentés à *H. aegyptius*

ont été associés à la fièvre purpurique brésilienne. Les clones ont été désignés par *H. influenzae* biogroupe *aegyptius* (Winslow *et al.*, 1917).

### **I.2.7.3 *Haemophilus ducreyi***

Cette bactérie se présente sous forme de bâtonnets minces en paires ou en chaînes, mesurant  $0,5 \times 1,5-2 \mu\text{m}$ , avec un pourcentage G+C de 38% et n'est pas capsulée. La croissance est faible sur la plupart des milieux. Les colonies sur gélose au chocolat après 72 heures sont de petite taille (0,5 mm de diamètre), plates, lisses, grisâtres et translucides, mais souvent avec quelques colonies plus grosses séparées ayant une apparence par ailleurs identique (dimorphisme). La croissance sur gélose au sang est très rare et il n'y a pas de croissance satellite autour des colonies de *Staphylococcus*. Elle produit une hémolysine associée aux cellules ayant une activité cytotoxique (Alfa *et al.*, 1996) et une cytotoxine soluble (Cope *et al.*, 1997). L'une des deux toxines ou les deux entraînent une faible hémolyse sur les plaques de gélose au sang.

Les isolats cliniques semblent généralement être asaccharolytiques. Cependant, dans des conditions de croissance favorables, certaines souches présentent une réaction positive tardive pour la fermentation du glucose. L'espèce est inerte dans la plupart des tests biochimiques traditionnels, mais produit un large éventail de peptidases. Elle provoque la maladie humaine d'origine vénérienne appelée chancre mou et ulcères cutanés. Le portage chez des individus en bonne santé n'a pas été encore détecté (Winslow *et al.*, 1917).

### **I.2.7.4 *Haemophilus haemolyticus***

Les *Haemophilus haemolyticus* sont des coccobacilles non capsulés, avec des formes filamenteuses occasionnelles et causent des infections (Raydel Anderson *et al.*, 2012). Les colonies sur la gélose au chocolat sont lisses, convexes, grisâtres et translucides et atteignent un diamètre de 0,5 à 1,5 mm en 24 heures. Ces bactéries produisent des zones hémolytiques claires sur gélose au sang de bovin ou de mouton. Cependant, l'activité hémolytique peut être perdue lors de la sub-culture. Elles colonisent le nasopharynx d'une minorité de la population humaine en bonne santé et souvent dans les dépôts bactériens sur les dents sous le bord gingival (plaque dentaire sous-gingivale) (Winslow *et al.*, 1917).

### **I.2.7.5 *Haemophilus parainfluenzae***

C'est une bactérie pléomorphe généralement de longues formes filamenteuses avec un pourcentage en mole G+C de 40 à 41. Des souches occasionnelles possédant une capsule ont été décrites (Sims, 1970). Les colonies sur la gélose au chocolat sont blanches grisâtres ou

jaunâtres opaque et atteignent un diamètre de 1 à 2 mm après 24 heures. Certaines souches produisent des colonies plates et lisses avec un bord entier, d'autres ont un bord en dents de scie, d'autres encore se développent en colonies très rugueuses et ridées. Les formes irrégulières des colonies ont généralement une texture cohérente. Les souches se développant sous forme de colonies de type rugueux se transforment souvent en type lisse après certains transferts *in vitro*. Certains isolats présentent une  $\beta$ -hémolyse hebdomadaire sur une gélose au sang, mais la propriété est souvent perdue après plusieurs sub-cultures. La croissance dans les milieux en bouillon peut être granulée ou non.

Huit biovars ont été identifiés sur la base de trois réactions biochimiques: la formation d'indole et les activités uréase et ornithine décarboxylase (tableau I) (Bruun *et al.*, 1984; Doern & Chapin, 1987; Kilian, 1976; Oberhofer & Back, 1979). Il n'est pas clair si les souches présentant les caractéristiques du biovar V appartiennent bien à l'espèce *H. parainfluenzae*. Ils sont phénotypiquement similaires à *H. segnis* et *H. paraphrophilus*. La majorité des isolats humains peuvent être attribués aux biovars I à III. *H. parainfluenzae* est omniprésent dans la cavité buccale et le pharynx et peut être présent dans la flore vaginale normale (KILIAN & THEILADE, 1975; Liljemark *et al.*, 1984; Sims, 1970; Tuyau & Sims, 1975). Des bactéries ressemblant à *H. parainfluenzae* ont été isolées chez des singes, des porcs, des lapins et des rats. Bien que l'espèce fût rapportée avoir une activité neuraminidase (Tuyau & Sims, 1974), ceci ne peut pas être confirmé avec des substrats chromogéniques bien définis. Cette bactérie est peu pathogène, mais est parfois impliqué dans l'endocardite et les infections des voies respiratoires inférieures chez l'homme (Winslow *et al.*, 1917).

#### **I.2.7.6 *Haemophilus segnis***

C'est une bactérie pléomorphe, avec une prédominance de formes irrégulières et filamenteuses. Les colonies sur la gélose au chocolat sont lisses ou granuleuses, convexes, blanc-grisâtres et opaques, et atteignent un diamètre d'environ 0,5 mm après incubation pendant 48 heures. La croissance dans le milieu de fermentation est lente et les réactions sont négatives ou faiblement positives. La fermentation du saccharose est généralement plus forte que la fermentation du glucose. Cette bactérie est un commensal de la flore buccale humaine, en particulier de la plaque dentaire, et peut être isolée dans le pharynx. Elle a été isolée en culture pure d'un abcès du pancréas (Kilian, 1976).



### **I.3 BESOINS DES *Haemophilus* AUX FACTEURS DE CROISSANCE**

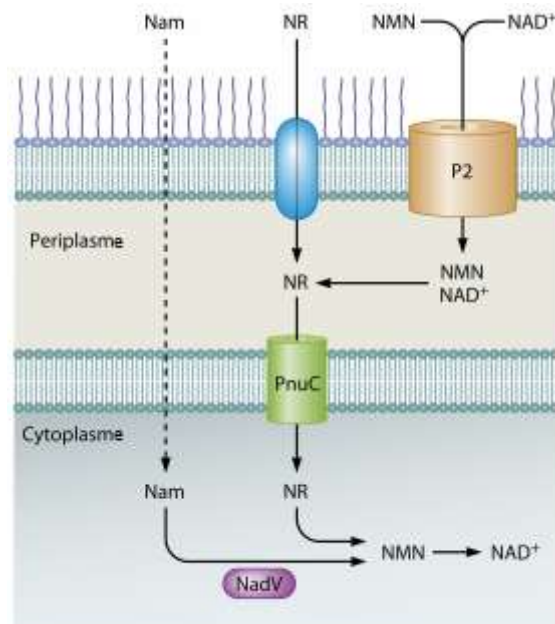
Deux voies métaboliques défectueuses entraînent une dépendance à des facteurs de croissance spécifiques, traditionnellement appelés X (hème) et V (nicotinamide adénine dinucléotide, NAD).

#### **I.3.1 Facteur X et biosynthèse de l'hème**

La voie de biosynthèse de l'hème est commune aux animaux, aux plantes et les bactéries. La formation de protoporphyrine commence par la condensation de deux molécules d'acide aminolévulinique linéaire dans le cycle pyrrole à cinq chaînons, le porphobilinogène. Quatre molécules de porphobilinogène se condensent et se circularisent en uroporphyrinogène III, qui est modifié par substitutions dans les étapes enzymatiques successives. Enfin, le proto-hème se forme à partir de la protoporphyrine par chélation du fer ferreux. Le génome de *H. influenzae* code pour la ferrochélatase (*hemH*), et la protoporphyrine est l'équivalent biochimique minimal du facteur X. Les souches occasionnelles ne parviennent pas à synthétiser le proto-hème à partir de la protoporphyrine, et le proto-hème est l'équivalent minimal du facteur X. Pendant de nombreuses années, les principaux obstacles à la mise au point d'un schéma de classification et d'identification satisfaisant pour *Haemophilus* avaient des problèmes méthodologiques d'identification d'exigence du facteur X (Nørskov-Lauritsen, 2014).

#### **I.3.2 Facteur V et biosynthèse du NAD**

Le NAD est synthétisé par une voie *de novo* et par la voie de récupération de la pyridine, qui recycle les produits de dégradation de NAD vers NAD. En revanche, le nombre réduit de ces processus chez les *Pasteurellaceae* est limité à l'absorption du NAD (Gerlach & Reidl, 2006), et toutes les *Pasteurellaceae* acquièrent cet élément nutritif essentiel de l'environnement, soit sous forme de NAD, soit sous la forme d'un nombre limité de précurseurs de NAD. Cependant, certaines espèces de *Pasteurellaceae* sont capables d'utiliser du nicotinamide dans une réaction catalysée par l'enzyme nicotinamide phosphoribosyltransférase (NadV) (figure 3). La définition actuelle de la dépendance au facteur V est donc synonyme d'absence de l'enzyme NadV. La dépendance au facteur V est un test extrêmement précieux pour la caractérisation initiale des membres présumés de *Pasteurellaceae* (Nørskov-Lauritsen, 2014).



**Figure 3: Utilisation du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) chez les *Pasteurellaceae*.**

Le nicotinamide mononucléotide (NMN) et le NAD pénètrent dans le périplasma par la porine générale OMP P2 et sont dégradés en nicotinamide riboside NR); le NR exogène pénètre probablement dans le périplasma par une porine différente. Le NR est internalisé par une perméase cytosolique située sur la membrane (PnuC) et sert de substrat à une enzyme de resynthèse qui utilise l'ATP pour générer du NAD. La nicotinamide (Nam) diffuse librement à travers les membranes cellulaires et peut servir de substrat aux membres de la famille qui expriment une nicotinamide phosphoribosyltransférase (NadV) fonctionnelle (Nørskov-Lauritsen, 2014).

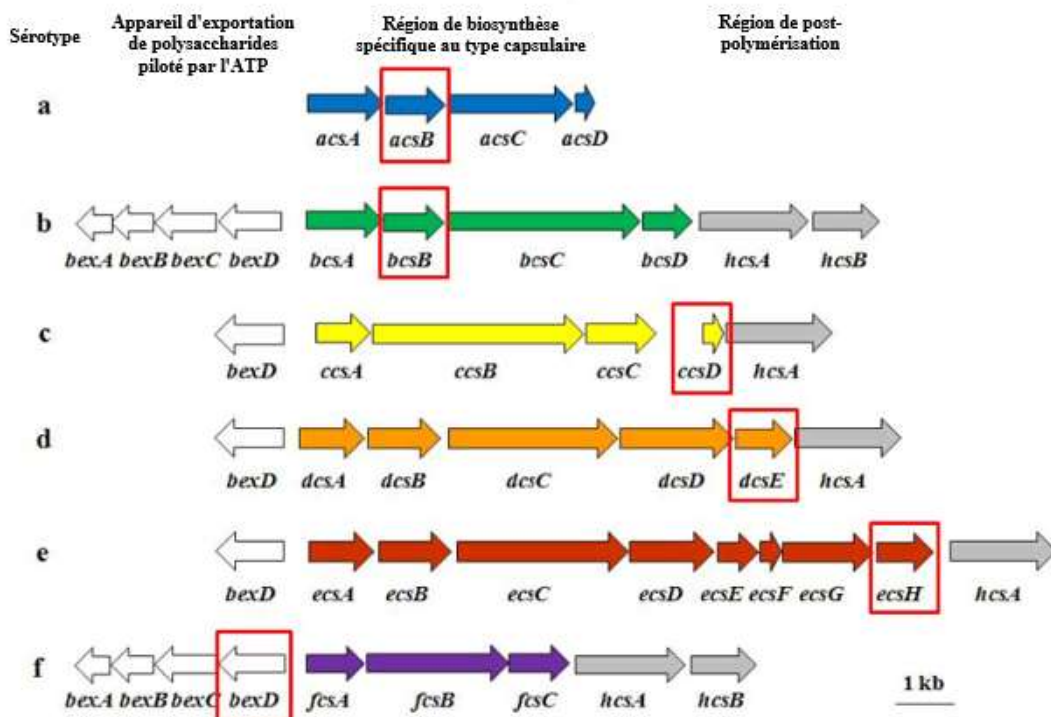
#### I.4 LES FACTEURS DE VIRULENCE

Les *Haemophilus* et en particulier *H. influenzae* produisent plusieurs facteurs de virulence qui permettent à la bactérie de coloniser l'épithélium respiratoire humain et sont responsables de la pathogenèse (Nørskov-Lauritsen, 2014).

##### I.4.1 La capsule polysaccharidique

La capsule est un facteur de virulence bien caractérisé qui rend les souches *H. influenzae* plus résistantes à la phagocytose et augmente leur capacité à provoquer une maladie invasive (Noel *et al.*, 1992; Weller *et al.*, 1977). Sur la base de modèles animaux pour l'infection utilisant des mutants isogéniques transformés avec un ADN capsulaire spécifique du sérotype, il a été démontré que le sérotype le plus virulent était le b, suivi du a. Les quatre sérotypes restants (c à f) ont une capacité de virulence réduite (Zwahlen *et al.*, 1989; Zwahlen *et al.*, 1983). Les

gènes codant pour la capsule polysaccharidique sont situés dans le locus *cap* qui est formé de trois régions fonctionnelles (figure 4).



**Figure 4: Loci des capsules pour les sérotypes a, b, c, d, e et f de *H. influenzae* (CDC, 2011).**

Le locus de la capsule des six sérotypes de *H. influenzae* (Hia-f) comprend trois régions codant des fonctions pour la synthèse, la modification et la translocation des polysaccharides de la capsule. *bexDCBA* dans la région d'exportation portée par l'ATP (flèches blanches) code pour les composants protéiques d'un appareil d'exportation de polysaccharide. *hcsA* et *hcsB* se situent dans la région de modification post-polymérisation (flèches grises) et peuvent participer à la modification et à l'exportation du polysaccharide en capsule. La région spécifique du sérotype (flèches colorées) contient des gènes pour la synthèse de capsules et est unique pour chaque sérotype. Les gènes spécifiques aux sérotypes a, b, c, d, e et f sont nommés *acs*, *bcs*, etc. À l'exception de l'analyse spécifique du sérotype Hif, les gènes cibles des analyses spécifiques du sérotype se trouvent dans cette région et sont mis en évidence par les zones rouges.

La région I comprend les composants d'un appareil d'exportation de polysaccharides portés par l'ATP (*bexDCBA*). La région III, formée des gènes *hcsA* et *hcsB*, participe à la modification et à l'exportation des polysaccharides capsulaires. Ces régions sont communes aux six sérotypes. La région spécifique au sérotype (région II) contient des gènes pour la synthèse capsulaire et est unique pour chaque sérotype. Cette région est nommée *acs* à *fcs*, en

fonction du type capsulaire. Les souches capsulées présentent deux divisions phylogénétiques décrites et présentent une localisation chromosomique différente de leur locus capsulaire et des différences génétiques dans les régions flanquantes de ce locus. Les souches de la division I présentent un locus *cap* flanqué de répétitions de l'élément d'insertion IS1016, qui n'apparaissent pas dans les souches de division (Kroll *et al.*, 1991; Kroll *et al.*, 1989; S. W. Satola *et al.*, 2003; Sarah W. Satola *et al.*, 2003).

#### **I.4.2 La protéase d'immunoglobuline A1**

Certains agents pathogènes de la muqueuse humaine expriment des protéases d'immunoglobuline (Ig) A fortement associées à la virulence chez les *Haemophilus*. Les IgA protéases sont un exemple frappant d'évolution convergente car 3 lignées indépendantes de ces endopeptidases post-prolines hautement spécifiques (types sérine, métallo- et cystéine) sont présentes dans les bactéries pathogènes humaines, ce qui indique un rôle clé des IgA protéases dans l'interaction hôte-pathogène (Kilian *et al.*, 1996; Mistry & Stockley, 2006; Murphy *et al.*, 2015). Découvertes il y a 30 ans, les protéases IgA clivent la région charnière de l'IgA1 humaine en dissociant ses domaines Fab de liaison à l'antigène du domaine Fc, inhibant ainsi les fonctions de l'IgA, telles que l'agglutination, l'inhibition de l'adhésion bactérienne aux cellules épithéliales et l'opsonisation (Kilian *et al.*, 1988; Kilian *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 2015). Les IgA protéases ont été nommées en raison de leur spécificité pour les IgA1 humaines. Depuis lors, il a été démontré que les IgA protéases contribuaient à l'infection bactérienne par plusieurs mécanismes supplémentaires, notamment la stimulation de la production de cytokines pro-inflammatoires, la modification de la signalisation du facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  et la médiation de la persistance intracellulaire (Beck & Meyer, 2000; Clementi *et al.*, 2014; Lorenzen *et al.*, 1999). L'augmentation du niveau d'activité de l'IgA protéase est corrélée à l'élévation du caractère envahissant des souches des *Haemophilus influenzae* non typables chez l'homme.

#### **I.4.3 Les lipooligosaccharides**

Le lipooligosaccharide de *H. influenzae* est analogue au lipopolysaccharide de nombreuses bactéries à Gram négatif. Cette molécule consiste en un glycolipide associé à la membrane externe formé par le lipide A, lié par l'acide 2-céto-3- désoxyoctulosonique à un noyau d'oligosaccharide composé principalement d'heptose neutre et d'hexose. *H. influenzae* incorpore dans le lipooligosaccharide des molécules telles que le digalactoside, la phosphorylcholine et l'acide sialique qui ont été identifiées comme des structures mimant l'hôte, aidant ainsi au camouflage bactérien vis-à-vis du système immunitaire et leur conférant

un avantage lors de l'adhésion et de l'invasion (Mandrell & Apicella, 1993; Schweda *et al.*, 2007). La présence de digalactoside confère une résistance au sérum humain en éliminant le dépôt de C4b sur la surface bactérienne, dépendant des anticorps et à médiation par le complément, en raison du mimétisme moléculaire avec l'antigène pk présent dans les cellules hôtes (Erwin *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2007; Weiser & Pan, 1998). L'incorporation de la phosphorylcholine dans le lipooligosaccharide joue un rôle important dans la persistance de ces bactéries dans les voies respiratoires.

#### **I.4.4 Les adhésines**

La fixation des bactéries à l'épithélium des cellules l'hôte constituent une étape importante dans le développement de l'infection et constituent un processus médié par des adhésines bactériennes et par des récepteurs spécifiques situés à la surface des cellules du macroorganisme. Chez les *H. influenzae* non typables, deux principaux groupes de protéines d'adhésion sont obtenus: les protéines de haut poids moléculaire HMW1/HMW2 et les adhésines *Hia*. Les protéines de haut poids moléculaire sont présentes dans 75 à 80% des souches non typables. Les gènes les codant sont disposés en grappes dans le chromosome avec les gènes responsables de l'expression des protéines de la membrane externe (Grass *et al.*, 2003). HMW1 et HMW2 sont codés par deux loci distincts dénommés *hmw1* et *hmw2*. Chaque locus est constitué de trois gènes codant pour l'adhésine (*hmwA*), une protéine de la membrane externe intégrante nécessaire au transport de HMW1 et HMW2 à travers la membrane externe (*hmwB*) et la protéine cytoplasmique stabilisant l'adhésine avant son exportation du cytoplasme (*hmwC*). Le niveau d'expression des protéines de haut poids moléculaire est associé au développement de l'otite moyenne chez les enfants et de la bronchite chez les patients atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique. L'adhésine *Hia* est présente dans environ 20% des souches non capsulées (Kostyanev & Sechanova, 2012).

#### **I.4.5 Les pili**

Les pili sont un autre facteur de virulence de *H. influenzae*. On les trouve dans les souches capsulées de sérotype b et dans près de la moitié des souches non capsulées. Ils sont constitués d'une grosse protéine (HifA) et deux petites (HifD et HifE). Le pili assure la liaison de la cellule bactérienne à la cellule eucaryote en se liant à des glycoprotéines et des glycolipides à sa surface. *H. influenzae* possède une copie de chacun des gènes codant pour les protéines immunitaires (*hifA*, *hifD* et *hifE*). Dans la grappe contenant ces gènes, il y a deux autres gènes (*hifV* et *hifS*) qui contiennent des informations sur la synthèse des protéines impliquées dans l'assemblage des protéines fimbriales et les empêchant de destruction lors de

l'exportation cellulaire. Les *H. influenzae* non typable ont une autre protéine fimbriale appelée P5-fimbrine, semblable à l'une des protéines de la membrane externe (P5) (Kostyanov & Sechanova, 2012).

#### **I.4.6 Les protéines de la membrane externe**

Les protéines de la membrane externe de *H. influenzae* sont au nombre de six à huit. Certains d'entre elles, telles que P2 et P6, font actuellement l'objet d'études intensives en tant qu'antigènes pouvant être inclus dans les préparations vaccinales contre les souches non typables. Les anticorps anti-P2 ont un effet bactéricide et protecteur. P2 sont les protéines de la membrane externe les plus courantes. Ce sont des porines dont la partie externe est très variable et diffère d'une souche à l'autre. Leur partie interne, située dans la membrane externe, a une séquence conservative d'acides aminés. La partie externe de ces protéines peut varier dans le temps en raison de modifications uniques des gènes structurels de P2. Cela conduit à une forme chronique de certaines infections causées par *H. influenzae* (Kostyanov & Sechanova, 2012). P6 est une protéine de membrane externe exprimée à la surface des souches capsulées et non typables. Le gène qui le code est hautement conservé, ce qui détermine le degré élevé de similarité de sa séquence nucléotidique chez différentes souches (Chang *et al.*, 2011).

#### **I.5 MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES ET TYPAGE DES *Haemophilus***

Au sein d'une espèce bactérienne, les souches d'origine distincte peuvent être distinguées à partir des marqueurs épidémiologiques qui sont des caractères discriminants phénotypiques ou génotypiques (moléculaires). L'approche expérimentale mettant en évidence ces caractères et les éléments de classification des bactéries, constituent ensemble un système de typage épidémiologique sur la base de ces marqueurs (van Belkum *et al.*, 2007).

Face aux situations épidémiques, comme par exemple lors de l'épidémie de fièvre purpurique brésilienne (Harrison *et al.*, 1989), ou pour documenter les infections nosocomiales, il peut être utile de typer les isolats afin d'identifier l'origine d'une infection ou d'une épidémie et suivre sa diffusion ou son évolution. Ces techniques ont été essentiellement appliquées au typage de *H. influenzae* biogroupes *Influenzae* et *Aegyptius*. Plusieurs systèmes de typage ont été développés pour différencier les souches : la biotypie, la détermination des profils des protéines majeures de la membrane externe par électrophorèse en gel de polyacrylamide, la sérotypie basée sur la détermination du type capsulaire pour les souches sérotypables, la lipooligosaccharide sérotypie qui détermine le type de lipo-polysaccharide pour les souches non capsulées, *Outer Membrane Protein* sérotypie basée sur la mise en évidence de l'antigène

hétérogène de surface que constituent les protéines de la membrane externe, la ribotypie basée sur le polymorphisme des gènes qui codent pour les ARN ribosomiaux 16 + 23S, l'amplification de l'ADN bactérien au hasard, la restriction enzymatique du génome bactérien avec électrophorèse en champ pulsé (Quentin *et al.*, 2000). Les marqueurs phénotypiques sont des indicateurs dans les réactions biochimiques, physiologiques et immunologiques, morphologiques. Les investigations sur l'ADN à partir des marqueurs génotypiques ont progressivement remplacées celles à partir des marqueurs phénotypiques au cours de ces dernières années via l'épidémiologie moléculaire par séquençage.

Plusieurs méthodes moléculaires ont été utilisées pour caractériser les souches de *Haemophilus*. Mais les résultats les plus intéressants ont été de loin obtenus par *Multilocus enzyme electrophoresis*, *Multilocus Sequence Typing* et *Ribosomal Multilocus Sequence Typing*. Ces différentes approches méthodologiques sont basées sur le séquençage.

### **I.5.1 Séquençage du génome entier**

Les technologies de séquençage ont subi une réelle révolution depuis plus d'une décennie avec l'apparition des séquenceurs de nouvelle génération (NGS). Quelques années avant cette avancée, le séquençage du premier génome humain s'achevait et avait duré plus d'une dizaine d'années et coûté environ 3 milliards de dollars (Venter *et al.*, 2001). De nos jours, la technologie NGS Illumina produit le séquençage d'un génome humain en une journée et pour moins d'un millier de dollars. Cette révolution consiste donc en une augmentation conséquente du débit de séquençage, conjointement à une diminution drastique de son coût (Reis-Filho, 2009).

La particularité des technologies NGS est qu'elles ne sont pas en mesure de fournir la séquence complète d'un génome mais seulement de courts extraits, appelés lectures, de quelques centaines de nucléotides selon la technologie de séquençage utilisée. Les lectures couvrent le génome original à une certaine profondeur et pour espérer que l'intégralité du génome soit séquencée, un grand nombre de lectures doit donc être généré car la position d'une lecture est sélectionnée aléatoirement au sein du génome visé (G, 2017). Dix lectures en moyenne contiennent chaque position du génome équivalent à une couverture de 10 fois. Un certain nombre d'erreurs de séquençage est généré par les séquenceurs NGS dû à une substitution (mauvais choix de nucléotides) ou à une délétion et insertion dans la lecture des nucléotides. Les données sont de courtes lectures de 100 à 250 nucléotides possédant

majoritairement un taux d'erreur de type substitution de l'ordre de 0.1 à 1% ce qui fait que la technologie Illumina domine actuellement largement le marché (G, 2017).

La séquence complète d'ADN du génome d'un organisme peut être déterminée en une seule fois par le processus de séquençage du génome entier. Ce processus est une méthode complète pour analyser des génomes entiers. L'information génomique a joué un rôle déterminant dans l'identification des troubles héréditaires, la caractérisation des mutations qui entraînent la progression du cancer et le suivi des épidémies. La diminution rapide des coûts de séquençage et la possibilité de produire de grands volumes de données avec les séquenceurs actuels font du séquençage du génome entier un outil puissant pour la recherche en génomique. Il fournit une vue de haute résolution, base par base du génome. Il capture les grandes et les petites variantes qui pourraient autrement être omises et identifie les variants potentiellement responsables en vue d'études ultérieures sur l'expression des gènes et les mécanismes de régulation. Il fournit de grands volumes de données dans un court laps de temps pour permettre l'assemblage de nouveaux génomes. Le séquençage du génome entier microbien est un outil important pour la cartographie des génomes de nouveaux organismes ou la comparaison de génomes sur plusieurs échantillons par exemple, pour générer des génomes de référence précis, pour l'identification microbienne et pour d'autres études génomiques comparatives. L'analyse du génome de l'agent pathogène dans son ensemble pourrait fournir une résolution sans précédent en distinguant même des lignées de bactéries très liées et révolutionner l'analyse des épidémies dans les hôpitaux (Quainoo *et al.*, 2017). Suite aux améliorations récentes des technologies de séquençage, le séquençage du génome entier est en passe de devenir un outil essentiel dans le contrôle de la résistance aux antibiotiques (Koser *et al.*, 2014; Quail *et al.*, 2009).

### **I.5.2 L'approche *Multilocus enzyme electrophoresis***

Les études basées sur l'approche *Multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) ont montré que les populations de *H. influenzae* capsulées sont hautement clonales, avec des preuves limitées de l'impact majeur de la recombinaison au sein des loci conservés et que les isolats d'un seul sérotype ont généralement une diversité génétique restreinte (Musser *et al.*, 1990). Ainsi, les isolats des sérotypes c, d, e et f forment des grappes monophylétiques et les isolats des sérotypes a et b ne font partie que de deux groupes phylogénétiques très divergents (isolats des groupes I et II). Les isolats non capsulés sont plus diversifiés que les isolats capsulés et leur structure de population peut être davantage influencée par la recombinaison (Musser *et al.*, 1986; Porras *et al.*, 1986).



Bien que la technique MLEE soit une technique puissante et valide, elle n'est pas idéale, car la comparaison des résultats obtenus dans différents laboratoires est problématique et la relation entre la variation de la séquence des nucléotides et la variation de l'isoenzyme est généralement inconnue (E. Meats *et al.*, 2003).

### **I.5.3 L'approche Multilocus Sequence Typing**

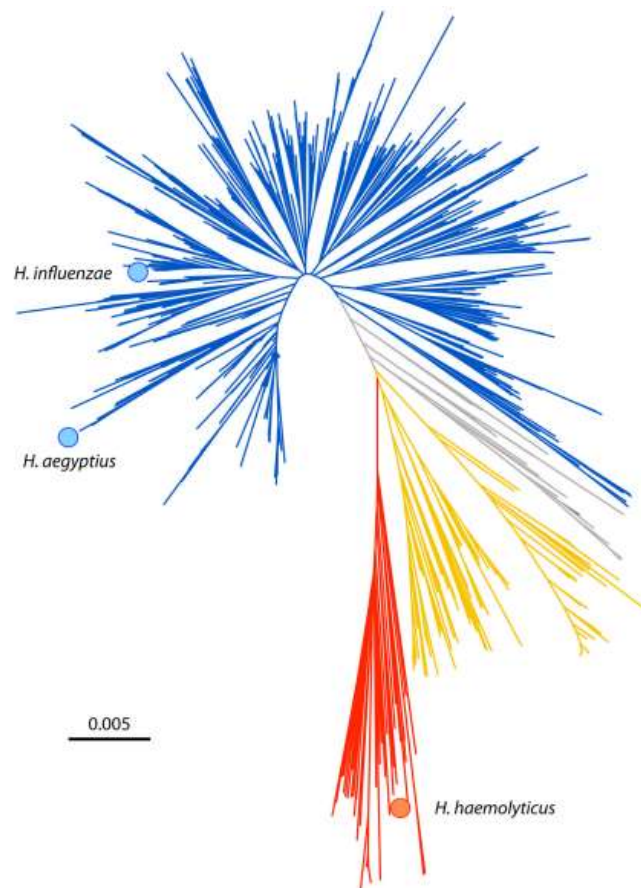
L'approche *Multilocus Sequence Typing* (MLST) est une méthode de typage qui a été largement utilisée dans la recherche bactérienne et est considéré comme la référence en matière de typage bactérien. Cette méthode repose sur la détection de variants dans un ensemble de gènes internes, typiquement entre 2 et 13 gènes choisis pour leur stabilité dans le génome. Variants de gènes appelés allèles, ils sont partagés sur une base de données en ligne, ce qui permet aux scientifiques de comparer leurs données d'une manière standardisée. L'approche MLST a été développée pour la caractérisation sans ambiguïté des isolats d'*Haemophilus influenzae* capsulés et non capsulés en séquençant des fragments internes de sept gènes conservés (de ménage) : adénylate kinase (*adK*), ATP synthase F1 sous-unité gamma (*atpG*), fumarate réductase (*frB*), fuculokinase (*fucK*), malate déshydrogénase (*mdh*), glucose-6-phosphate isomérase (*pgi*) et protéine *RecA* (Enright & Spratt, 1999; Maiden *et al.*, 1998).

Des numéros d'allèles différents sont attribués aux différentes séquences d'un locus, et les numéros d'allèles de chacun des sept locus définissent le profil allélique, qui caractérise avec précision chaque isolat. Des profils MLST ont été décrits pour un certain nombre de pathogènes bactériens importants (Maiden *et al.*, 1998).

Le MLST a un grand avantage sur les autres méthodes de typage. Les isolats caractérisés dans différents laboratoires peuvent être facilement comparés et les profils alléliques des isolats et les informations épidémiologiques associées peuvent être conservés dans une seule base de données pouvant être analysée via Internet (Enright & Spratt, 1999; Maiden *et al.*, 1998).

La délimitation la plus fiable de *H. influenzae* repose actuellement sur des séquences concaténées de fragments des 7 gènes conservés en utilisant l'approche *H. influenzae* MLST (Emma Meats *et al.*, 2003) ou un schéma alternatif à cinq gènes qui comprend un fragment du gène de l'ARNr 16S (McCrea *et al.*, 2008). Le schéma alternatif est basé sur une MLST générale développée pour la famille des *Pasteurellaceae* (Nørskov-Lauritsen *et al.*, 2005), mais les amorces ont été améliorées pour cibler spécifiquement le groupe *H. influenzae*. Si le schéma MLST *H. influenzae* est utilisé, le gène fuculokinase *fucK* est omis car ce gène n'est généralement pas présent chez *H. haemolyticus* (Brauer *et al.*, 2007; Nørskov-Lauritsen *et al.*,

2009; Ridderberg et al., 2010) (36, 86, 197). La figure 5 illustre une comparaison de 900 types de séquences de *H. influenzae* tirées du site Web *MLST* avec des souches typiques de *H. influenzae*, *H. aegyptius* et *H. haemolyticus* en plus de 35 isolats de *H. haemolyticus* et des souches d'organismes apparentés qui ont été exclus de *H. influenzae*. Les souches de référence de *H. haemolyticus* et *Haemophilus non influenzae* sont situées dans un groupe commun (en rouge, figure 5) qui est clairement séparé des groupes phylogénétiques I (bleu) et II (jaune) de *H. influenzae*.

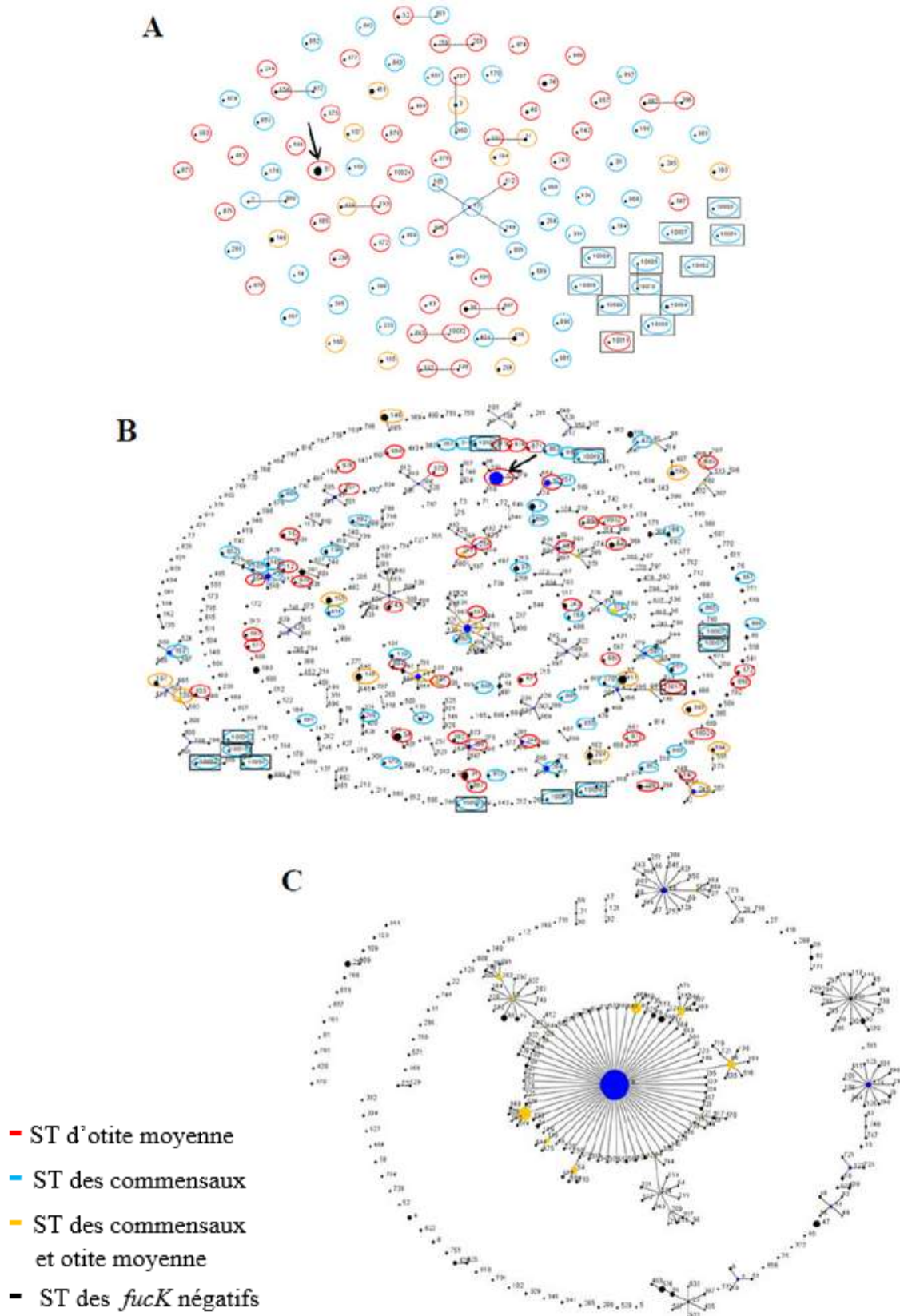


**Figure 5: Dendrogramme Neighbor-joining illustrant les liens phylogénétiques entre les souches types de *H. influenzae*, *H. aegyptius* et *H. haemolyticus* à partir des fragments de gènes concaténés *adk*, *atpG*, *frdB*, *mdh*, *pgi* et *recA* (Nørskov-Lauritsen, 2014).**

Les souches de *H. haemolyticus* et des bactéries apparentés sont négatives pour *fucK*. Le groupe phylogénétique I est indiqué en bleu, le groupe phylogénétique II en jaune et *H. haemolyticus* et les organismes apparentés en rouge. Les souches dont l'attribution est équivoque aux groupes phylogénétiques sont indiquées en gris.

Le programme eBURST v3 est utilisé pour déterminer les relations entre les séquences *MLST* à partir du jeu de données final. Les données *MLST* de l'ensemble de données final de

170 isolats de *H. influenzae* non typable (non capsulé) ont été analysées avec eBURST v3 (Figure 6A). La plupart des ST ne sont pas suffisamment apparentées à un autre ST de l'échantillon pour former un complexe et ne sont donc pas liées, et il n'y a que peu de regroupement par maladie (otite moyenne/commensal). Ce niveau élevé de diversité reste cohérent lorsque tous les 537 ST de *H. influenzae* non typable (836 isolats) de la base de données MLST, ainsi que les 12 ST négatives pour *fucK* (15 isolats), ont été analysées (Figure 6B). Encore une fois, peu de regroupement est évident, et les quelques complexes sont relativement petites (la plus grande étant composée de 19 ST). La grande diversité des souches *H. influenzae* non typable peut être comparée à celle des souches typables (voir le graphique eBURST de toutes les ST typables de la base de données MLST, Figure 6C). Près de la moitié (126 ou 45%) des 281 ST parmi les souches typables ont un seul complexe clonal, et le reste formant des groupes plus petits. Les ST de type b prédominent, constituant les 2/3 de toutes les ST des souches capsulées de la base de données (187 sur 281). Ceci inclut le complexe clonal central observé sur la figure 6C, dans lequel toutes les 126 ST sont du type b.



**Figure 6: Analyses eBURST des isolats de *H. influenzae* (LaCross *et al.*, 2013).**

Légende : La définition la plus conservatrice du complexe clonal a été utilisée, selon laquelle les ST ne sont incluses dans le groupe que si elles partagent des allèles dans au moins six des

sept loci avec au moins une autre ST dans ce groupe. La taille des cercles est proportionnelle à l'abondance des ST correspondantes dans l'ensemble de données et l'emplacement relatif des ST non connectées est aléatoire. La légende en bas illustre les aspects des ST identifiées. Les flèches noires épaisses indiquent ST57. A : Analyse des 109 ST trouvées dans les 170 isolats non capsulés du jeu de données final. B : Analyse des 537 isolats non capsulés ST trouvées dans la base de données MLST et des 12 ST négatives de *fucK* de la partie A. Le plus grand complexe clonal comprend 19 ST. C : Analyse eBURST de la totalité des 281 ST typables de la base de données MLST. Le complexe clonal central est composé de 126 ST de type b.

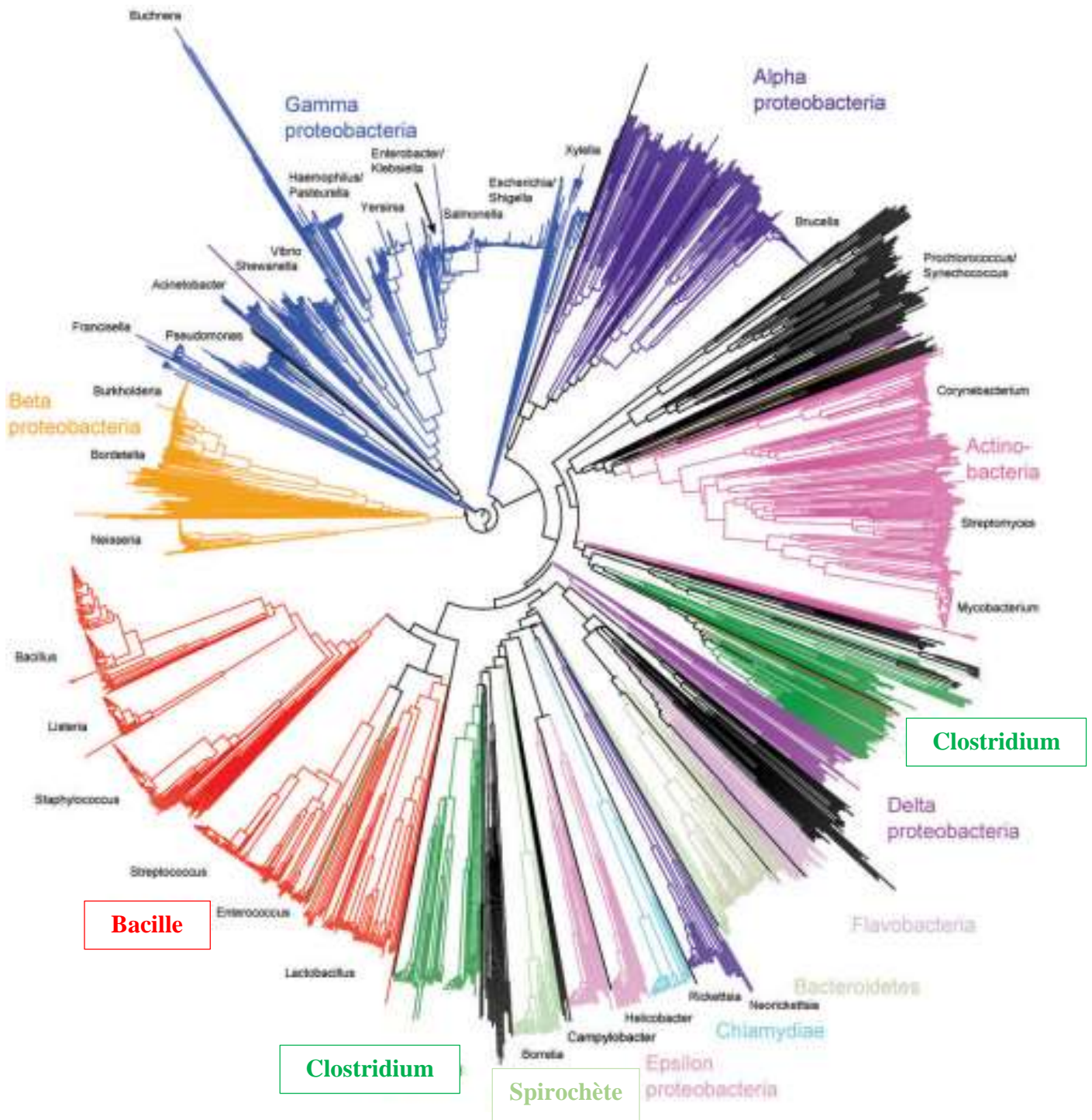
#### **I.5.4 Ribosomal MultiLocus Sequence Typing**

La *Ribosomal Multilocus Sequence Typing* (rMLST) est une approche qui montre la variation des 53 gènes codant pour les sous-unités protéiques du ribosome bactérien (gènes *rps*) comme moyen d'intégrer la taxonomie et le typage microbiens (Jolley *et al.*, 2012). La méthode fonctionne à tous les niveaux taxonomiques, depuis l'identification des espèces au typage au niveau des sous-espèces.

Comme pour le typage par MLST, la rMLST utilise des séquences de référence curée pour identifier les variants de gène de manière efficace et rapide. Les loci *rps* sont des cibles idéales pour un schéma de caractérisation universel car ils sont: présents dans toutes les bactéries, répartis autour du chromosome et codent pour des protéines qui sont sous sélection stabilisante pour une conservation fonctionnelle. Ensemble, les loci *rps* présentent une variation qui classe les bactéries en groupes à tous les niveaux taxonomiques et à la plupart des typages, offrant une résolution significativement supérieure à celle des phylogénies des gènes d'ARNr 16S de petite sous-unité. Une base de données extensible accessible sur le Web, comprenant des données sur le génome entier de plus de 1900 isolats bactériens, y compris 28 génomes bruts assemblés *de novo* à partir des archives de lecture de séquences de l'Institut européen de bioinformatique, a été assemblée (Jolley *et al.*, 2012).

La variation du gène *rps* répertoriée dans la base de données <https://pubmlst.org/rmlst/> permet une identification rapide et informatisée de la position phylogénétique de toute séquence bactérienne au niveau du domaine, phylum, classe, ordre, famille, genre, espèce et souche (Figure 7). Les regroupements générés avec les données *rMLST* sont cohérents avec les schémas de nomenclature actuels et sont indépendants de l'algorithme de classification utilisé. Cette approche est applicable aux autres domaines de la vie, offrant potentiellement une approche

rationnelle et universelle de la classification de la vie basée sur l'une de ses caractéristiques fondamentales, le mécanisme de traduction (Jolley *et al.*, 2012).



**Figure 7:** Arbre phylogénétique (Neighbour-joining) du domaine bactérien entier reconstruit à partir des séquences de gène de protéines ribosomales concaténées.

Cette analyse a porté sur 1565 séquences de génomes comportant au moins 52 gènes de protéines ribosomales (Jolley *et al.*, 2012). Les couleurs varient selon les catégories de bactéries.

## **I.6 DIAGNOSTIC DES INFECTIONS À *Haemophilus***

La détection des *Haemophilus* au laboratoire se fait par la culture, les tests immunologiques et les tests d'amplification d'acide nucléique. L'identification des *Haemophilus* peut se faire par des tests biochimiques, la détection de gène spécifique par amplification et selon aussi une approche protéomique. Mais en routine, les méthodes conventionnelles sont les plus utilisées dans les pays sous-développés ou en voie de développement.

### **I.6.1 Méthodes conventionnelles**

Pour déterminer l'étiologie des infections, les échantillons biologiques (écouvillons, tissus et liquides biologiques) sont prélevés sur le patient avant l'administration d'antibiotiques. Le diagnostic présomptif précoce peut être établi en identifiant les bâtonnets à Gram négatif pléomorphes par la coloration de Gram de l'échantillon. Pour les cas de liquides céphalorachidiens, les kits de détection d'antigènes, tels que l'agglutination au latex, sont également utiles pour confirmer les résultats de la microscopie, en particulier dans les situations où des antibiotiques ont été administrés avant la collecte de l'échantillon, et dans des situations de terrain éloignées où la microbiologie peut être difficile à réaliser. Avec des techniciens qualifiés et des kits bien conservés, l'agglutination au latex présente d'excellentes performances pour la détection de *H. influenzae*, même dans des conditions difficiles. L'identification des bactéries est obtenue par culture directe sur gélose cœur-cerveille ou dans un bouillon cœur-cerveille. La culture est généralement faite à partir de l'ensemencement des prélèvements biologiques sur gélose au chocolat au sang supplémenté de polyvitex et incubés 18 à 24 heures à 35-37 °C sous atmosphère enrichie de CO<sub>2</sub> (Intra *et al.*, 2016). La caractérisation des *Haemophilus* est réalisée par l'analyse de la morphologie des colonies, des tests biochimiques standard et des exigences des facteurs X et V. Pour le sérotypage capsulaire, les isolats de *H. influenzae* sont analysés par agglutination sur lame en utilisant des sérums polyvalents de sérotypage capsulaire *H. influenzae* de sources commerciales. Les isolats positifs pour la présence d'une capsule de polysaccharide sont confirmés par agglutination à l'aide d'antisérums spécifiques des types a, b, c, d, e et f (Gessner *et al.*, 2017).

### **I.6.2 Méthodes moléculaires**

Les méthodes moléculaires, notamment la PCR conventionnelle multiplex, la PCR en temps réel et d'autres, se sont révélées être un complément pratique et utile pour l'identification étiologique des infections, en particulier dans les zones où l'utilisation d'antibiotiques au sein de la communauté est courante. La plupart des tests d'amplification sont conçus pour cibler les gènes *fucK*, *licA* et *ompP2* afin de détecter toutes les souches de *H. influenzae* (Gessner *et al.*, 2017; Kenneth L. Meyler *et al.*, 2012; K. L. Meyler *et al.*, 2012; Varela *et al.*, 2014). Les PCR ont été conçues pour amplifier respectivement les gènes *tonB*, *hypD* et *siaT* pour identifier respectivement *H. parainfluenzae*, *H. haemolyticus* et *H. influenzae* (Matar *et al.*, 2001; Price *et al.*, 2017).

### **I.6.3 Sérotypage des *Haemophilus influenzae***

Le sérotypage est une méthode d'identification des souches bactériennes basée sur leurs antigènes de surface.

En routine, le sérotypage de *H. influenzae* est effectué par agglutination sur lame en utilisant des antiséras anti-capsulaires de lapin spécifiques pour l'ensemble des 6 sérotypes (Shively *et al.*, 1981). Cependant, il a été démontré que le sérotypage par agglutination sur lame produisait des résultats incohérents par le fait que certaines souches de *hib* ne produisent pas de capsule si le gène *bexA* a été perturbé. Dans ce cas, sérotypage par agglutination sur lame ne peut pas distinguer les mutants déficients en capsule de sérotype b des non typables (LaClaire *et al.*, 2003; Satola *et al.*, 2007).

Le sérotypage par PCR ciblant les gènes spécifiques au sérotype est préférable (Falla *et al.*, 1994). Il a été démontré que la méthode de sérotypage par PCR avait une sensibilité et une spécificité supérieures à celles du sérotypage par agglutination sur lame qui est considérée comme un standard de référence pour le sérotypage de *H. influenzae* (S. W. Satola *et al.*, 2003). Bien que la PCR puisse détecter des souches sérotypables déficientes en capsules, cette méthode ne permet pas de différencier les souches qui ont conservé une copie perturbée de l'opéron *cps* de celles qui l'ont complètement perdu et le séquençage est une alternative avantageuse à toutes les autres approches d'identification.

### **I.6.4 Identification par protéomique**

Récemment, le profilage protéomique par spectrométrie de masse *Matrix-Assisted Laser-Desorption-Ionization Time-Of-Flight* (MALDI-TOF) a été utilisé avec succès pour l'identification de plusieurs microorganismes. Cette méthodologie consiste à l'ionisation des



protéines et permet la génération d'un spectre de masse basé sur l'analyse du temps de vol des particules ionisées. La comparaison entre le spectre généré et les spectres dans la base de données de référence permet l'identification (Randell, 2014).

### **I.7 TRAITEMENT DES INFECTIONS À *Haemophilus***

Le traitement des infections à *Haemophilus* dépend de leurs profils de sensibilité aux antibiotiques. Ces profils étant obtenus par la réalisation des antibiogrammes. L'antibiogramme des *Haemophilus*, en particulier de *H. influenzae*, est délicat et fait l'objet de recommandations du Comité français de l'antibiogramme (CASFM/EUCAST) ((CASFM), 2015).

*H. influenzae* est sensible aux principales familles d'antibiotiques : pénicillines (ampicilline), céphalosporines de troisième génération principalement, aminoglycosides, phénicolés (chloramphénicol), cyclines (tétracycline), sulfamides et association, rifamicines (rifampicine) et quinolones. Dans les années 1970, l'émergence de souches résistantes, en particulier à l'ampicilline par production d'une bêta( $\beta$ )-lactamase plasmidique de type TEM a été observée et est devenue un problème croissant. Cette résistance n'est pas toujours décelée par antibiogramme par diffusion sur gélose. Il est donc indispensable de rechercher ce type de résistance par une technique ciblant la production de  $\beta$ -lactamase (sur disque de nitrocéfine) (Quentin *et al.*, 2000).

Les souches de type sauvage d'*Haemophilus* sont sensibles à des concentrations thérapeutiquement réalisables d'un large éventail d'antibiotiques. Les concentrations minimales inhibitrices représentatives (CMI) des antibiotiques courants (en  $\mu\text{g/mL}$ ) de *H. influenzae* sont variées. Pour les  $\beta$ -lactamines, les CMI sont: 1-2 pour benzyl pénicilline; 0,5 pour ampicilline, amoxicilline et céfuroxime ; 0,06 pour céfotaxime; 0,03 pour ceftriaxone; 1 pour imipénème et 4 pour cefaclor. En ce qui concerne les phénicolés, 0,5 est indiqué pour le chloramphénicol. Les CMI pour les sulfamides sont de 0,5 pour triméthoprim et 4 pour sulfaméthoxazole. Par ailleurs, on note une CMI de 1 pour tétracycline (cycline), rifampicine (rifamicine) et gentamicine (aminoglycoside); 0,5-8 pour érythromycine (macrolide) et 0,015 pour ciprofloxacine (quinolone) (Butt *et al.*, 1997; Winslow *et al.*, 1917).

Les différentes espèces d'*Haemophilus* sont habituellement résistantes aux lincosamines (lincomycine, clindamycine) et peu sensibles *in vitro* aux macrolides (érythromycine, oléandomycine) (Quentin *et al.*, 2000). La bacitracine a si peu d'effet sur *H.*

*influenzae* et d'autres espèces d'*Haemophilus* qu'elle est utilisée en concentration de 5 à 19 U/mL (Winslow *et al.*, 1917).

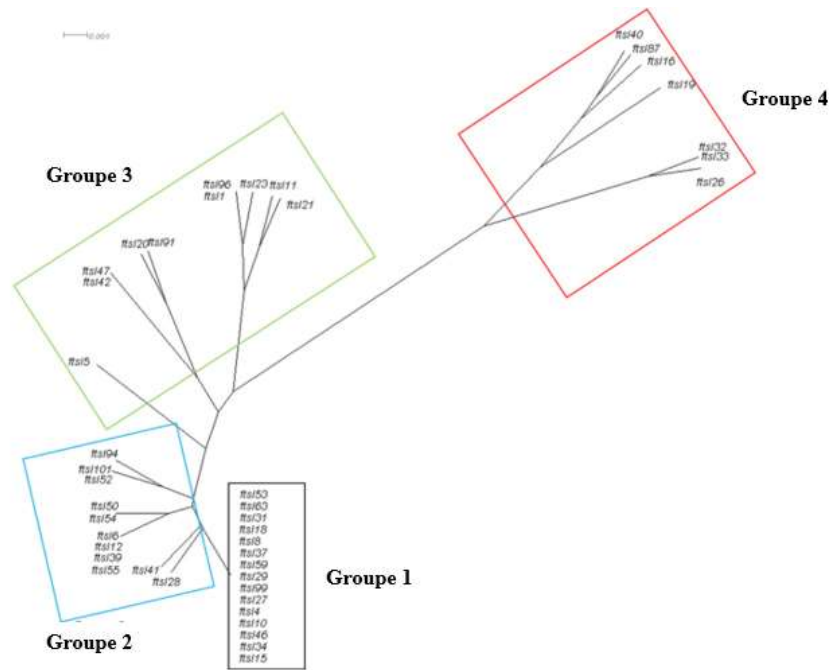
## **I.8 MÉCANISMES DE RÉSISTANCE DES *Haemophilus* AUX ANTIBIOTIQUES**

La sensibilité ou la résistance des *Haemophilus* aux antibiotiques exprimée de manière phénotypique dans un organisme est provoquée par un ensemble de mécanismes complexes. Les principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques sont: l'imperméabilité, la modification de la cible, la production enzymatique et l'efflux (Reygaert, 2018). Ces mécanismes peuvent être naturels ou acquis à partir d'autres bactéries. Certains gènes et produits de l'expression génétique sont associés aux mécanismes de résistance de ces bactéries aux antibiotiques.

### **I.8.1 Mécanisme de résistance aux bêta-lactamines**

Les bêta( $\beta$ )-lactamines inhibent la synthèse du peptidoglycane des bactéries en se fixant aux protéines de liaison des pénicillines (PLP3). En général, la résistance aux  $\beta$ -lactamines est médiée par la production de  $\beta$ -lactamases (plasmidiques ou chromosomiques) qui inactivent les bêta-lactamines en hydrolysant le noyau  $\beta$ -lactame; une diminution de la perméabilité de la membrane externe aux antibiotiques hydrophiles par modification des porines (modification de la perméabilité de la paroi bactérienne); l'altération des PLP3 entraînant une faible affinité pour l'antibiotique; et l'expression des pompes à efflux qui éjectent activement les antibiotiques de la cellule (James & Reeves, 1996; Quentin *et al.*, 2000; Wilke *et al.*, 2005).

Chez les *Haemophilus*, la résistance à l'ampicilline et à d'autres antibiotiques à base de  $\beta$ -lactamines se limite généralement à la production d'une  $\beta$ -lactamase ou à une  $\beta$ -lactamase négative résistante à l'ampicilline. Cette dernière est due à l'altération de la PLP3 marquée par des mutations. Sur la base de ces mutations, 4 groupes *ftsI* représentant les différents profils de résistance aux  $\beta$ -lactamines sont observés (Figure 8) (Deghmane *et al.*, 2019). Une très faible proportion des souches possèdent les deux mécanismes et sont appelées souches à amoxicilline-clavulanate-résistant  $\beta$ -lactamase positives (S. Tristram *et al.*, 2007). Les  $\beta$ -lactamases détectées incluent les types TEM-1, TEM-15, TEM-34, TEM-182 et ROB-1 généralement associés à des plasmides (Sondergaard & Norskov-Lauritsen, 2016).



**Figure 8: Arbre phylogénétique représentant les 4 groupes *ftsI* à partir de la séquence d'alignements multiples d'acides aminés CLUSTALW déduit des séquences d'ADN de tous les allèles *ftsI* définis (Deghmane *et al.*, 2019).**

Légende : Les quatre groupes définissent chacun des niveaux de résistance faible ( groupe 1) à élevé (groupe 2 à 4).

### I.8.2 Mécanisme de résistance aux aminoglycosides

Les aminoglycosides (gentamicine, amikacine, streptomycine, kanamycine, ...) agissent sur les bactéries en se liant à des protéines spécifiques de la sous-unité 30S du ribosome bactérien. Les aminoglycosides provoquent également un mauvais décodage des codons de l'ARN messager et, par conséquent, des acides aminés incorrects sont incorporés dans des chaînes peptidiques en croissance produisant des protéines bactériennes défectueuses dont l'accumulation est létale pour la bactérie (Cavallo & Martinetto, 1981; Leggett, 2017).

Les mécanismes moléculaires sous-jacents à la résistance à cette classe d'antibiotiques incluent l'efflux actif, la réduction de la perméabilité de la membrane externe, les mutations dans la molécule cible et l'inactivation par des enzymes qui sont les plus courantes. Ce dernier mécanisme est médié par trois groupes d'enzymes: phosphotransférases, acétyltransférases et nucléotidyltransférases (Doi & Arakawa, 2007).

### I.8.3 Mécanisme de résistance aux rifamicines

La rifampicine inhibe l'initiation de la chaîne de l'ARN polymérase ADN dépendante de la bactérie en se liant à la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase (*RPOB*). Les mutations

ponctuelles localisées dans le gène *rpoB* rendent l'enzyme moins sensible. La majorité des sites de mutation sont regroupés en trois zones distinctes, numérotées selon les coordonnées protéiques d'*Escherichia coli*. Le groupe I (acides aminés 507 à 533) et II (acides aminés 563 à 572) arborent la plupart des mutations, tandis que la position 687 définit le groupe III. Dans le groupe I, les substitutions aux positions aspartate516 et asparagine518 sont généralement rencontrées (Cruchaga *et al.*, 2003). La résistance à la rifampicine peut être due aux modifications des mécanismes d'absorption et d'efflux de médicaments, et aux modifications de sa perméabilité à la membrane externe (Abadi *et al.*, 1996; Cruchaga *et al.*, 2003; Goldstein, 2014).

#### **I.8.4 Mécanisme de résistance aux phénicolés**

Le chloramphénicol est un bactériostatique qui inhibe la synthèse des protéines. Il empêche l'élongation de la chaîne protéique en inhibant l'activité de la peptidyl transférase du ribosome bactérien. Il se lie spécifiquement à certains résidus de l'ARNr 23S de la sous-unité ribosomale 50S, empêchant ainsi la formation de liaisons peptidiques (Dinos *et al.*, 2016).

Le mécanisme le plus courant de résistance au chloramphénicol chez les bactéries est son inactivation enzymatique par acétylation principalement par l'intermédiaire d'acétyltransférases ou, dans certains cas, par les chloramphénicolphosphotransférases. La résistance au chloramphénicol peut également être due à une mutation/modification du site cible, à une diminution de la perméabilité de la membrane externe et à la présence de pompes à efflux qui agissent souvent en tant que transporteurs extrudés de médicaments multiples, réduisant ainsi la concentration intracellulaire efficace du médicament (Fernández *et al.*, 2012; van Hoek *et al.*, 2011).

La résistance des *Haemophilus* au chloramphénicol est marquée généralement par la production de chloramphenicol acétyltransférase (CAT) à médiation plasmidique codée par le gène *cat*. Le gène *cat* est retrouvé sur des plasmides conjugatifs. Ces plasmides sont souvent porteurs de gènes codant pour la résistance à la tétracycline et à l'ampicilline. Ces plasmides conjugatifs peuvent également être incorporés au chromosome. Ce gène *cat* se situe sur le chromosome de *H. parainfluenzae* et n'est pas transmis par un plasmide, contrairement à *H. ducreyi* et à *H. influenzae*. Certaines souches résistantes sont caractérisées par une barrière à la pénétration de l'antibiotique et une barrière de perméabilité associée à la perte d'une protéine de la membrane externe (Burns *et al.*, 1985; Roberts *et al.*, 1985; Roberts *et al.*, 1980; Tinguely *et al.*, 2013).

### **I.8.5 Mécanisme de résistance aux sulfamides : inhibiteurs du métabolisme de l'acide folique**

La résistance aux inhibiteurs du métabolisme de l'acide folique comprend: les voies métaboliques alternatives; l'imperméabilité de la paroi cellulaire; production d'une enzyme chromosomique résistante; surproduction d'une enzyme chromosomique susceptible; et la production d'une enzyme résistante aux inhibiteurs à médiation plasmidique (Abotsi *et al.*, 2017).

Triméthoprime et sulfaméthoxazole (utilisés seuls ou en association) exercent un effet antimicrobien en interférant avec le métabolisme cellulaire et la réplication en bloquant séquentiellement la production de tétrahydrofolate. Au cours du métabolisme cellulaire normal, le dihydrofolate est réduit en tétrahydrofolate par l'enzyme dihydrofolate réductase. Le tétrahydrofolate étant un cofacteur important dans de nombreuses réactions cellulaires, fournit des fragments simples de carbone pour la production de thymidylate, purine nucléotides, méthionine, sérine, glycine et autres composés. L'inhibition de la production de tétrahydrofolate empêche la synthèse de thymine et, par conséquent, empêche la réplication de l'ADN. Le triméthoprime est un analogue de substrat du dihydrofolate et bloque la réduction du dihydrofolate en tétrahydrofolate par l'enzyme dihydrofolate réductase, alors que le sulfaméthoxazole est un analogue de substrat de l'acide para-aminobenzoïque, qui participe à la production du dihydroptéroate, un composé précurseur du dihydrofolate, entraînant ainsi le blocage de l'enzyme dihydroptéroate synthétase. Ainsi, l'utilisation combinée de ces composés limite la production de dihydrofolate et empêche la conversion de dihydrofolate en tétrahydrofolate. Les deux antibiotiques (triméthoprime et sulfaméthoxazole) inhibent sélectivement le métabolisme bactérien avec peu de toxicité pour les humains parce que les humains ne synthétisent pas l'acide folique (car les niveaux nécessaires d'acide folique sont obtenus à partir des apports alimentaires) (Bermingham & Derrick, 2002; de Groot *et al.*, 1991; Illarionova *et al.*, 2002; S. Tristram *et al.*, 2007).

La résistance au triméthoprime se produit par une altération de l'affinité entre le triméthoprime et la dihydrofolate réductase. L'affinité diminuée est le résultat de l'altération des gènes qui codent pour la dihydrofolate réductase, qui sont souvent portés par des plasmides ou des transposons et probablement provenant de bactéries étroitement apparentées. Des études ont montré que les substitutions dans la séquence d'acides aminés de la dihydrofolate réductase conduit à la résistance au triméthoprime sans affecter l'affinité des substrats naturels. La résistance au triméthoprime-sulfaméthoxazole chez les souches de *H. influenzae* est commune

et est causée par une augmentation de la production de la dihydrofolate réductase avec modification de l'affinité pour le triméthoprim (S. Tristram *et al.*, 2007).

### **I.8.6 Mécanisme de résistance aux cyclines**

Les tétracyclines inhibent de diverses manières l'initiation de la traduction en se liant à la sous-unité ribosomale 30S, composée de l'ARNr 16S et de 21 protéines. Cette famille d'antibiotiques inhibent la synthèse des protéines en empêchant la fixation de l'aminocyl-ARNt sur le site de l'accepteur ribosomal (Chopra & Roberts, 2001b).

La résistance aux tétracyclines est médiée par les mécanismes tels que la dégradation enzymatique des tétracyclines, des mutations dans l'ARNr, les mécanismes médiés par l'efflux et la production de protéines de protection ribosomales. Le mécanisme le plus important est la production de protéines de protection ribosomales, qui comprennent *Tet (T)*, *Tet (S)*, *Tet (Q)*, *Tet (B)*, *Tet (W)*, *Tet (O)*, *Tet (M)* et *OtrA* (Taylor & Chau, 1996).

Les tétracyclines exercent un effet antimicrobien en se liant à la sous-unité 30S des ribosomes bactériens, empêchant la liaison de l'ARNt aux sites A ou P. La résistance à la tétracycline chez *H. influenzae* (et *H. parainfluenzae*) est associée à un mécanisme d'efflux codé par le gène *tet (B)* qui est habituellement situé sur des plasmides conjugatifs (Chopra & Roberts, 2001a).

Les gènes *tet (M)* et *tet (K)* sont responsables de la résistance à la tetracycline par la production de protéines de protections ribosomales plutôt que par l'efflux, ont été retrouvés chez *H. ducreyi* et *H. aphrophilus*, respectivement. Le gène *tet (M)* chez *H. ducreyi* était induit par un plasmide et pouvait être transféré *in vitro* à *H. influenzae* par conjugaison, ce qui laisse penser que *tet (M)* et d'autres déterminants de la résistance à la tétracycline pourraient être introduits dans *H. influenzae* (Chopra & Roberts, 2001a; Roberts, 1989).

### **I.8.7 Mécanisme de résistance aux quinolones**

Les quinolones ont un large spectre d'activité et exercent un effet antimicrobien en interférant avec la réplication de l'ADN et, par conséquent, avec la reproduction bactérienne. L'ADN gyrase et la topoisomérase IV sont deux enzymes importantes dans le processus de réplication. La résistance aux quinolones chez les *Haemophilus* résulte d'une altération des gènes de la région déterminant la résistance aux quinolones (QRDR) codant pour l'ADN gyrase ou la topoisomérase IV (Perez-Vazquez *et al.*, 2004; Pérez-Vázquez *et al.*, 2007; Carmen Puig *et al.*, 2015) et aussi des gènes de résistance à médiation plasmidique (Abotsi *et al.*, 2017).

Le mécanisme moléculaire de résistance des souches d'*Haemophilus* aux fluoroquinolones a révélé des mutations (substitutions d'acides aminés) dans QRDR de *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*. Ces substitutions sont détectées en position Sérine 84 et Aspartate 88 dans *gyrA*, Sérine 84, Sérine138 et Méthionine198 dans *parC*, Aspartate 420 ; et Alanine 451 dans *parE* (Abotsi *et al.*, 2017; C. Puig *et al.*, 2015; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2011).

### **I.8.8 Mécanisme de résistance aux macrolides**

Les macrolides sont des inhibiteurs de la synthèse des protéines. Ces antibiotiques se lient à la sous-unité ribosomale 50S avec une cible spécifique dans la molécule d'ARN ribosomal 23S et diverses protéines ribosomales, ce qui conduit à l'inhibition de la synthèse des protéines (Gaynor & Mankin, 2003; Mazzei *et al.*, 1993).

La résistance aux macrolides est principalement due à une modification de la cible ou à un efflux actif et rarement à une inactivation d'antibiotiques. La modification du site cible est obtenue par méthylation de résidus spécifiques (A2058, G2160, C2164G, ... du domaine V) dans l'ARNr 23S, par des méthylases spécifiques codées par la classe de gènes *erm* ou par différentes mutations dans les protéines ribosomales L4 et L22 chez certaines espèces bactériennes (Peric *et al.*, 2003; Sutcliffe *et al.*, 1996).

Les macrolides sont des inhibiteurs de la synthèse des protéines, mais ils ne sont pas actifs contre de nombreuses espèces de bactéries à Gram négatif. Les ribosomes de ces souches sont sensibles aux macrolides, mais une diminution de la perméabilité de la membrane cellulaire et /ou des pompes d'efflux de plusieurs médicaments rendent les macrolides inactifs vis-à-vis de ces bactéries à Gram négatif car ils ne peuvent atteindre leur cible (Zgurskaya & Nikaido, 2000). *H. influenzae* est plus sensible aux macrolides que les autres bactéries à Gram négatif. Cependant, le niveau de sensibilité est inférieur à celui des bactéries à Gram positif. La résistance élevée aux macrolides chez *H. influenzae* est rare (Jacobs *et al.*, 1999). Les prévalences de résistance à l'azithromycine et à la clarithromycine parmi les isolats cliniques ont été rapportées inférieures à 3% (Peric *et al.*, 2003).

### **I.8.9 Formation de biofilm**

La formation d'agrégats bactériens et la formation de biofilm sont impliquées dans la survie des bactéries. Cette structure confère aux bactéries une protection contre l'élimination par les défenses de l'hôte ou une thérapie antimicrobienne, facilitant ainsi la persistance des bactéries chez l'hôte (Costerton *et al.*, 1999). Les biofilms sont principalement formés par des cellules microbiennes et des polymères extracellulaires comme les polysaccharides

principalement. De plus, ces structures peuvent également incorporer d'autres substances telles que des ions métalliques, des cations divalents, des macromolécules (protéines, ADN et lipides) et des particules de l'hôte ou de l'environnement (Donlan, 2002).

Les mécanismes et facteurs impliqués dans la formation de biofilm chez *H. influenzae* comprennent les adhésines, l'incorporation de phosphorylcholine et d'acide sialique dans la structure des lipooligosaccharides et la détection du quorum (*quorum sensing*) (Hong *et al.*, 2007; Murphy & Kirkham, 2002; Swords, 2012; Swords *et al.*, 2004).

## I.9 PATHOGÉNÈSE

*H. influenzae* de type b colonise le nasopharynx et peut pénétrer dans l'épithélium et l'endothélium capillaire pour causer une bactériémie. Les infections invasives comme la méningite peuvent résulter d'une propagation directe par drainage lymphatique ou d'une propagation hématogène. Les *H. influenzae* non typables colonisent le nasopharynx et, dans une moindre mesure, la trachée et les bronches et peuvent infecter les muqueuses endommagées par une maladie virale ou le tabagisme. Le lipo-oligosaccharide est en grande partie responsable de l'inflammation; les exotoxines ne jouent aucun rôle (Musher., 1996). La propagation contiguë est la voie prédominante par laquelle *H. influenzae* non typable provoque une maladie localisée, telle que la pneumonie, l'otite moyenne et la sinusite, et par laquelle *H. influenzae* de type b provoque l'épiglottite (Gessner *et al.*, 2017).

*H. influenzae* non typable est présent dans le nasopharynx de la plupart des adultes en bonne santé, mais ne cause une maladie clinique que chez une minorité de sujets infectés. Par conséquent, la nature de la réponse immunitaire/inflammatoire des voies respiratoires peut être très importante dans la pathogenèse de cette bactérie. *H. influenzae* non typable provoque une forte stimulation de l'immunité innée et adaptative (King, 2012).

L'immunité innée sert de première ligne de défense contre l'infection et comprend des défenses structurelles et cellulaires. Les défenses structurelles comportent un certain nombre de composants, dont la toux, la fonction de barrière et l'appareil mucociliaire. L'affaiblissement de la fonction mucociliaire, comme ce qui se produit dans la fibrose kystique et le syndrome des cils immobiles, est associé à une infection pulmonaire à *H. influenzae* (King, 2012).

La réponse immunitaire adaptative se développe après la réponse innée et est particulièrement importante dans les maladies infectieuses chroniques. Elle est médiée à la fois par les lymphocytes B (immunité humorale) et les lymphocytes T (immunité cellulaire). Des



études ont montré que la grande majorité des sujets en bonne santé et des patients atteints de maladie chronique des voies respiratoires présentaient une forte réaction anticorps à *H. influenzae* non typable. Il a également été démontré que le complément est bactéricide pour *H. influenzae* non typable. L'anticorps provoque l'activation du complexe d'attaque terminal du complément, ce qui est très efficace pour tuer *H. influenzae* non typable. Ce mécanisme peut expliquer pourquoi *H. influenzae* non typable est principalement un agent pathogène de la muqueuse qui se propage rarement au-delà des voies respiratoires, contrairement aux formes typables telles que *hib*, protégées par sa capsule polysaccharidique et fréquemment responsables de maladies systémiques. L'hypogammaglobulinémie s'est avérée un facteur de risque important d'infection systémique par *H. influenzae* non typable (King, 2012).

### **I.10 MANIFESTATIONS CLINIQUES**

*H. influenzae* de type b peut provoquer une méningite, une épiglottite, une bactériémie et une cellulite. Les *H. influenzae* non typables peuvent provoquer des otites, sinusites, trachéobronchites et pneumonies. Parmi les autres espèces d'*Haemophilus* et les syndromes qu'elles provoquent, on trouve *H. parainfluenzae* (pneumonie et endocardite), *H. ducreyi* (chancre mou) et *H. aegyptius* (conjonctivite ou fièvre purpurique brésilienne) (Musher., 1996).

### **I.11 PREVENTION DES INFECTIONS À *Haemophilus***

Les mesures d'hygiène générale peuvent réduire la propagation des infections à *Haemophilus*. Des mesures préventives spécifiques sont disponibles pour certains types d'infection. Elles concernent les portages à *H. influenzae* de type b avec pour objectif de l'éliminer chez l'individu isolé ou dans une collectivité (chimio prophylaxie) et l'augmentation des défenses de l'organisme des sujets réceptifs (vaccination).

L'utilisation de la prophylaxie à la rifampicine pour prévenir ou éliminer la colonisation nasopharyngée a été recommandée chez les sujets contacts de cas de méningite. La chimio prophylaxie fait appel à la rifampicine par voie orale (20 mg/kg/jour en une prise pendant 4 jours) chez les enfants de moins de 5 ans (Quentin *et al.*, 2000). Cette mesure est toutefois controversée, car si elle est appliquée à grande échelle, elle pourrait favoriser l'apparition de souches résistants à la rifampicine et également parce que le coût pour prévenir chaque cas potentiel d'infection comme la méningite est élevé (Musher., 1996).

La vaccination repose sur l'utilisation du polysaccharide de type b ou polyribosyl-ribitol-phosphate. La réponse après vaccination est étroitement dépendante de l'âge et la

synthèse d'anticorps antipolysaccharidiques est faible avant 18 mois. Compte tenu de l'âge des enfants touchés par la méningite à *H. influenzae*, il a fallu améliorer ce vaccin pour qu'il soit utilisable et efficace avant 18 mois. Ceci a été fait par couplage du polyribosyl-ribitol-phosphate à une protéine (Quentin *et al.*, 2000). Ce vaccin est administré dans une composition pentavalente chez les enfants âgés de 0 à 11 mois (première dose à 6 semaines, deuxième dose à 10 semaines, troisième dose à 14 semaines et une dose à 9 mois) dans le programme élargi de vaccination au Cameroun. Ce vaccin pentavalent protège contre la diphtérie, le tétanos, la coqueluche, l'hépatite B et les infections à *H. influenzae* de type b (DTC-Hép B-Hib) (Gaingne, 2009; Massenet & Tapindjin-Gake, 2010).

La meilleure façon de prévenir la propagation du chancre mou dû à *H. ducreyi* consiste à utiliser le préservatif lors des rapports sexuels. Les deux tiers des isolats de *H. ducreyi* produisent de la  $\beta$ -lactamase. Tous les isolats sont sensibles *in vitro* à l'érythromycine et d'excellents résultats cliniques ont été obtenus (Musher., 1996).

## I.12 ÉPIDÉMIOLOGIE

### I.12.1 Portage

Les espèces d'*Haemophilus* représentent environ 10% de la flore bactérienne dans les voies respiratoires chez l'homme. Au moins 8 espèces différentes d'*Haemophilus* colonisent la cavité pharyngée de l'homme avec *H. influenzae* et *H. haemolyticus* étant les plus répandues. *H. influenzae* provoque un large éventail de maladies infectieuses tandis que *H. haemolyticus* provoque rarement des maladies invasives (Theodore *et al.*, 2012).

### I.12.2 Transmission

Les *Haemophilus* se propagent directement parmi les individus sans contribution connue de sources environnementales ou de réservoirs animaux. Des souches de *H. influenzae* non typables sont présentes dans le nasopharynx de nombreux sujets en bonne santé, en fonction de la fréquence et de l'intensité avec lesquelles elles sont recherchées. En revanche, *H. influenzae* de type b ne se rencontre que chez 1 à 2% des enfants en bonne santé, et sa propagation aux enfants jusque-là non colonisés dans les premières années est associée à un risque substantiellement accru d'infection. Les familles et les garderies sont des milieux favorables à la dissémination de ces organismes (prosmicuité) (Musher., 1996).

### **I.12.3 *Haemophilus influenzae* non typables**

Les souches de *H. influenzae* non typables sont considérées comme des organismes commensaux les plus courants dans le nasopharynx humain. Environ 20% des nourrissons au cours de la première année de leur vie sont colonisés par des souches non typables de *H. influenzae*, suivis d'une colonisation à haut niveau à l'âge adulte. Contrairement aux adultes qui portent généralement un seul type, les enfants sont souvent colonisés avec plusieurs souches simultanément (Giufre *et al.*, 2015).

Selon les statistiques, les souches non typables de *H. influenzae* sont responsables de 20 à 30% de tous les épisodes d'otite aiguë moyenne et probablement d'un pourcentage plus élevé d'épisodes récurrents. En outre, les souches non typables de *H. influenzae* représentent plus de 40% des otites moyennes avec épanchement (otite moyenne chronique) et environ un tiers des sinusites aiguës ou chroniques sont également causées par ces souches. *H. influenzae* non typable peut être considéré comme la cause de la bronchite chronique, des exacerbations pulmonaires et de la pneumonie d'origine communautaire, en particulier chez les enfants vivant dans les pays en développement, les patients atteints d'une maladie pulmonaire chronique sous-jacente, ainsi que chez les personnes âgées. *H. influenzae* a parfois été introduit comme agent responsable de maladies systémiques telles que la méningite, la septicémie et l'arthrite septique (Murphy *et al.*, 1999; Sethi *et al.*, 2002).

La colonisation nasopharyngée par *H. influenzae* non typable entraîne un risque de maladies des voies respiratoires. Le tabagisme entraîne une hyperplasie des cellules caliciformes, une hypersécrétion de mucus et une diminution de la fonction ciliaire des cellules épithéliales respiratoires, augmentant vraisemblablement la localisation et la survenue des maladies des voies respiratoires à médiation des *H. influenzae* non typables. Les anomalies anatomiques sous-jacentes ou les immunités compromises rendent les patients plus vulnérables aux maladies systémiques causées par les *H. influenzae* non typable. Bien que les maladies associées à *H. influenzae* non typable puissent être traitées avec succès avec les antibiotiques  $\beta$ -lactamines couramment utilisés tels que l'ampicilline ou l'amoxicilline, la résistance de la bactérie à ces antibiotiques augmente de plus en plus. Les problèmes économiques, notamment le coût des consultations chez le médecin et des médicaments, sont estimés à environ 1 milliard de dollars par an aux États-Unis (Behrouzi *et al.*, 2017).

#### **I.12.4 *Haemophilus influenzae* sérotype b**

Avant l'introduction du vaccin conjugué contre *H. influenzae* sérotype b (*hib*), l'incidence annuelle de la méningite à *hib* chez les enfants de moins de 5 ans en Amérique du Nord et du Sud, en Europe du Nord, en Australie-Îles du Pacifique et au Moyen-Orient était d'environ 15 à 60 pour 100 000. En Afrique, l'incidence de la méningite pédiatrique documentée était plus élevée, allant de 30 à 60 cas sur 100 000 par an, malgré la probabilité que de nombreux cas n'étaient pas documentés. En revanche, les incidences annuelles documentées étaient de 3 à 25 pour 100 000 en Europe du Sud et de 1 à 10 en Asie. Les différences d'incidence peuvent concerner diverses questions, notamment l'accès des patients aux soins, l'utilisation de la ponction lombaire (par rapport au diagnostic et au traitement présomptifs) et la disponibilité d'un laboratoire de bactériologie pour le diagnostic. Toutefois, il est peu probable que ces facteurs expliquent les importantes différences d'incidence qui ont été documentées, en particulier du fait que plusieurs études en Asie et en Europe du Sud ont été bien mises en œuvre et ne risquent donc pas d'être affectées par ces problèmes. Une autre hypothèse serait que les traitements à base d'antimicrobiens dans la population (Asie du Sud-Est et Europe du Sud) pourraient être moins touchés par la maladie, car l'utilisation d'antibiotiques précoce et fréquente ralentit la progression de la maladie, réduit le portage ou rend plus difficile le diagnostic de la maladie existante (Gessner *et al.*, 2017; Gessner, 2002).

Outre la méningite, *hib* peut provoquer d'autres syndromes invasifs, notamment une bactériémie ou une septicémie avec ou sans pneumonie et l'épiglottite, ainsi que de l'arthrite septique. Pour des raisons mal comprises, en Europe du Nord, en Amérique du Nord et en Australie, l'épiglottite était une manifestation courante de la maladie invasive à *hib*, parfois aussi commune ou presque que la méningite. Par conséquent, dans ces régions, l'incidence des maladies invasives totales était 1,5 à 2,7 fois plus élevée que celle de la méningite, tandis qu'en Afrique, en Asie et en Europe du Sud, ce ratio était de 1,2 à 1,5 (Gessner *et al.*, 2017; Gilbert *et al.*, 1990).

#### **I.13 STRATÉGIES DE VACCINATION POUR LES INFECTIONS À *Haemophilus influenzae* NON TYPABLES**

Malgré la disponibilité généralisée des antibiotiques, les infections à *H. influenzae* non typables sont considérées comme les principales causes de morbidité et de mortalité, d'où l'importance de la mise au point de candidats vaccinaux contre ces infections. Cependant, il est

difficile de développer un vaccin approprié car les souches *H. influenzae* non typables, en tant que bactéries commensales, sont principalement présentes sur les surfaces des muqueuses, en particulier dans les voies respiratoires et dans la flore naturelle. Ces organismes sont génétiquement très divers; par conséquent, il n'existe aucun marqueur génétique permettant de différencier les souches *H. influenzae* non typables par les systèmes de typage existants.

Il existe des anticorps contre les protéines de la membrane externe et les lipopolysaccharides dans le sérum humain. Par conséquent, la plupart des études sur l'immunité humaine contre les infections à *H. influenzae* non typables a été axée sur l'identification des protéines de la membrane plasmique ayant des propriétés immunogènes et antigéniques essentielles à la colonisation, à l'invasion et à la survie chez l'hôte humain. Parmi les vaccins candidats les plus prometteurs, on compte les protéines de la membrane externe telles que P2, P4, P5, P6, protéines D et E, ces antigènes étant hautement immunogènes et représentant des protéines de surface abondantes dans de nombreux isolats. Ces protéines de bas poids moléculaire de *H. influenzae* sont classées en protéines majeures, notamment P1, P2 et P4-P6, et en protéines mineures, y compris la protéine de liaison à la transferrine 1, 2 (Tbp1 / Tbp2) et la protéine D. La protéine P2 en tant que candidat vaccinal, a été limitée en raison de sa grande hétérogénéité et de la dérive antigénique subséquente au cours d'infections persistantes chez des patients atteints de bronchite chronique [121] (Roier *et al.*, 2012).

Les vésicules de la membrane externe pourraient aussi être considérées comme un nouveau candidat vaccin prometteur. Les vésicules de la membrane externe sont des produits naturels de sécrétion de bactéries à Gram négatif. Ces vésicules ont un diamètre compris entre 10 et 300 nm et sont principalement constituées de composants de la membrane externe, tels que les phospholipides, les protéines de la membrane externe et le lipopolysaccharide ou lipooligosaccharides. De plus, les vésicules de la membrane externe contiennent des composants périplasmiques, qui sont piégés dans la lumière des vésicules de la membrane externe lors du processus de vésiculation. Par conséquent, les vésicules de la membrane externe portent plusieurs antigènes bactériens natifs, qui, combinés à leurs propriétés multi-immunogènes et auto-adjuvantes, les rendent particulièrement intéressants pour le développement d'un vaccin. Une autre caractéristique importante est que les antigènes membranaires des vésicules de la membrane externe exposés à la surface conservent leur stabilité physico-chimique. Pour ces raisons, les propriétés immunogènes et protectrices des

vésicules de la membrane externe ont été testées et prouvées pour plusieurs bactéries à Gram négatif (Roier *et al.*, 2012).

# **CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## **CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **II.1 CARACTÉRISTIQUES DE L'ETUDE**

#### **II.1.1 Type et durée de l'étude**

Il s'agissait d'une étude prospective descriptive transversale sur un an dans chaque site d'étude.

#### **II.1.2 Lieux d'étude**

L'étude a été réalisée à Yaoundé (Capitale politique du Cameroun) au Centre Hospitalier d'Essos et à l'Hôpital Jamot. Les échantillons étaient collectés dans ces deux sites, puis transférés au Centre Pasteur du Cameroun pour des investigations microbiologiques.

L'Hôpital Jamot de Yaoundé situé au quartier Mballa 2, est le centre de référence pour maladies respiratoires dans la ville de Yaoundé et ses environs. Le service de pneumologie impliqué dans ces maladies compte 257 lits. Cette structure hospitalière enregistre en moyenne 1200 hospitalisations par an.

Le Centre Hospitalier d'Essos, connu par la quasi totalité des usagers sous le nom "Hôpital de la Caisse" est situé au quartier Essos à Yaoundé. C'est une extension de la Caisse Nationale de Prévoyance Sociale. Cet hôpital, a une capacité de 230 lits repartis entre plusieurs unités parmi lesquelles une unité de pédiatrie et de prévention infantile. Cet hôpital enregistre environ 1600 hospitalisations chaque année avec 126 hospitalisations liées aux infections respiratoires sévères.

Ces deux hôpitaux sont des sites de surveillance d'infections des voies respiratoires sévères (patients hospitalisés) de la ville de Yaoundé.

#### **II.1.3 Période de l'étude**

Ce projet de recherche s'est déroulé du 13 Janvier 2017 au 12 Janvier 2018 à l'Hôpital Jamot de Yaoundé et du 03 Avril 2017 au 02 Avril 2018 au Centre Hospitalier d'Essos.

#### **II.1.4 Population d'étude**

La population cible était constituée de patients hospitalisés et/ou nécessitant une hospitalisation souffrant d'infection des voies respiratoires.



## II.1.5 Critères d'inclusion, de non inclusion et d'exclusion

### II.1.5.1 Critères d'inclusion

Étaient inclus les patients présentant les signes cliniques d'infection des voies respiratoires hospitalisés et/ou nécessitant une hospitalisation et qui avaient consenti de participer à l'étude. Les signes cliniques étaient principalement la toux, les douleurs thoraciques, le mal de gorge, l'asthénie, l'essoufflement, la respiration sifflante, la rhinorrhée ou tout autre signe clinique associé aux infections des voies respiratoires. Tout patient présentant au moins deux de ces signes cliniques était éligible.

### II.1.5.2 Critères de non inclusion et d'exclusion

N'était pas inclus dans cette étude, tout patient souffrant de maladies non respiratoires. Tout patient qui après avoir donné son consentement souhaitait se retirer de l'étude était exclu.

### II.1.6 Taille de l'échantillon et justification

Dans le cas de cette étude, la taille minimale d'échantillon requise a été calculée à partir de la formule suivante de Lorentz:

$$N = T^2 * P * (1-P) / M^2, \text{ avec}$$

N: Taille d'échantillon minimale pour l'obtention de résultats significatifs pour un événement et un niveau de risque fixé,

T: Niveau de confiance (la valeur type du niveau de confiance de 95 % est 1,96),

P: proportion estimée de la population qui présente la caractéristique

M: Marge d'erreur (généralement fixée à 5 %);

Au regard du taux de détection des *Haemophilus* dans les précédents travaux publiés au Cameroun (Koulla-Shiro *et al.*, 1997; Ndip *et al.*, 2008; Pefura Yone, Kuaban, Leonie, *et al.*, 2012), un taux de détection de 20,64% en moyenne a été rapporté. En prenant un niveau de confiance de 95 % et une marge d'erreur de 5%, la taille minimale d'échantillon était de :

$$N = 1,96^2 * 0,2064 * 0,7936 / 0,05^2 = 251,7 \text{ soit } \mathbf{252 \text{ participants.}}$$

Le recrutement des participants était consécutif dans les deux sites d'étude.

### 11.1.7 Procédure de collecte des échantillons

Le nasopharynx est la principale porte d'entrée et la source de transmission d'*Haemophilus* et bien d'autres pathogènes. La colonisation par *Haemophilus* étant souvent asymptomatique comme les streptococques, le portage naso-pharyngé est considéré comme une condition préalable à la maladie (Bogaert *et al.*, 2004). Les prélèvements naso-pharyngés étaient utilisés dans cette étude. Les prélèvements naso-pharyngés étaient obtenus par voie

transnasale à l'aide d'un écouvillon stérile selon les procédures standard de l'Organisation Mondiale de la Santé (O'Brien *et al.*, 2003).

Les échantillons étaient collectés auprès des patients de la manière suivante : pour chaque patient, une fiche d'identification était remplie, deux écouvillons nasopharyngés étaient collectés et bien étiquetés par participant. Un seul type d'échantillon était prélevé par participant. Selon la clinique, les lavages broncho-alvéolaires, liquides pleuraux, et autres liquides des voies respiratoires étaient prélevés. Les échantillons étaient expédiés avec les fiches d'identification des patients dans un bref délai au Centre Pasteur du Cameroun (CPC) de Yaoundé pour les analyses microbiologiques. Dès réception au CPC, les échantillons ont été divisés en deux aliquots. Une partie a été immédiatement utilisée pour la culture bactérienne, l'autre a été stockée dans un milieu de transport universel et maintenue à -80 °C jusqu'à l'amplification moléculaire.

#### **11.1.8 Considération éthique**

Afin de réaliser ce projet dans le respect strict des considérations standards éthiques, l'autorisation administrative des différents sites d'études (hôpitaux) a été obtenue et une clairance éthique auprès du Comité National d'Éthique de la Recherche pour la Santé Humaine N°2017/03/876/CE/CNERSH/SP.

Tel que décrit dans le protocole soumis à ces institutions de régulation éthique, tous les participants inclus dans ce projet étaient au préalable informés, par une équipe constituées de cliniciens, infirmières et investigateur principal, sur la nature, les objectifs et les différentes méthodes à appliquer à chacune des étapes dudit projet, de même que les risques encourus et la gestion de la confidentialité des données issues des différentes investigations.

Chaque patient majeur impliqué dans l'étude avait donné volontairement son accord et un consentement éclairé signé. Par contre, chaque patient mineur impliqué dans l'étude avait donné volontairement son assentiment verbal si possible, et un consentement éclairé avait été obtenu et signé par son représentant légal (Annexes 1 à 8).

#### **11.1.9 Risques potentiels**

Les risques dans cette étude pour les participants étaient liés aux prélèvements d'écouvillons de gorge ou nasopharyngés notamment une sensation de douleur passagère lors de l'introduction de l'écouvillon dans le nasopharynx. Selon les cas cliniques, l'introduction de l'écouvillon dans le nasopharynx, les lavages broncho-alvéolaires et liquides pleuraux étaient

prélevés. Selon la réglementation, ces prélèvements étaient effectués par le personnel médical de la structure hospitalière, personnel qualifié et habilité à le faire, le plus souvent par le médecin traitant.

#### **11.1.10 Bénéfices**

Les bénéfices potentiels de cette étude étaient à deux niveaux : l'un pour la santé publique et l'autre d'ordre scientifique.

Sur le plan santé publique, cette étude avait pour but d'évaluer l'impact de la vaccination contre *Haemophilus influenzae* b (Vaccin Hib introduit en 2009) à travers la détermination des sérotypes circulants. Elle avait aussi pour but d'évaluer la résistance aux antibiotiques guidant ainsi le personnel médical pour une meilleure prise en charge des patients et d'apporter des éléments à la surveillance de ces infections des voies respiratoires et notamment pour la révision des algorithmes de prise en charge.

Sur le plan scientifique, cette étude avait pour but de décrire les souches bactériennes d'*Haemophilus* notamment les caractéristiques phénotypiques et génotypiques circulant au Cameroun.

#### **11.1.11 Mesures prises pour la confidentialité des données, archivage et le respect de la vie privée des participants**

Les informations personnelles des participants auxquelles nous avons eu accès ont été utilisées uniquement dans le cadre de l'étude. Toutes les précautions ont été mises en œuvre de manière à préserver la confidentialité des données recueillies auprès des sujets de l'enquête. Ces précautions concernaient en particulier le domaine de l'archivage des formulaires de l'enquête, le domaine de la saisie des données informatiques (anonymisation des données avant saisie). La diffusion ou la publication de résultats de cette étude s'est faite dans un strict respect des mesures interdisant l'accès à des informations directement ou indirectement nominatives. Toutes les données seront archivées dans un endroit sécurisé pendant une période selon la procédure interne du Centre Pasteur du Cameroun, après la publication des résultats de l'étude.

## II.2 DÉTECTION DES BACTÉRIES RESPIRATOIRES

### II.2.1 PCR en temps réel

Pour la détection des pathogènes dans les échantillons cliniques, le kit commercial de Reverse Transcriptase PCR en temps réel (RT-PCR) : *Fast-track Diagnostics Respiratory pathogens* (Fast-track Diagnostics, Junglinster, Luxembourg) a été utilisé. Il permet de cibler 10 bactéries: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae/type b*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila/longbeachae*, *Salmonella spp.*, *Moraxella catarrhalis* et *Bordetella pertussis*.

#### II.2.1.1 Extraction de l'ARN

Une extraction de l'ARN suivant *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, Allemagne) a été effectuée.

##### II.2.1.1.1 Principe

L'extraction consiste à lyser l'échantillon (tampon AVL) sous des conditions hautement dénaturantes qui inactivent les RNAses et assurent la conservation de l'ARN. Les conditions de tampon de lyse sont ajustées de façon à assurer une fixation optimale des ARN sur la membrane à base de gel de silice. Le lysat est ensuite chargé sur une colonne de centrifugation. Durant des centrifugations successives, l'ARN se fixe sur la membrane et les contaminants sont éliminés avec deux séries de lavage par l'utilisation de 2 tampons AW1 et AW2. L'ARN purifié est ensuite élué par addition d'eau *RNase-free* (ou du tampon AVE) et centrifugation.

##### II.2.1.1.2 Mode opératoire

- **Lyse**

Sous le poste de sécurité microbiologique (type 2), 140 µL d'échantillon décongelé ont été distribués dans les microtubes de 1,5 mL (Eppendorf) précédemment identifiés. Dans chacun des microtubes, 560 µL de tampon de lyse (AVL) ont été ajoutés et l'ensemble a été bien vortexé pendant 15 secondes. L'incubation a été faite à température ambiante pendant 10 minutes afin d'obtenir la lyse complète sur la paillasse. Une centrifugation brève à 6000 g pendant 30 secondes pour récupérer les éventuelles gouttelettes présentes sur les bords du microtube a été faite.

- **Précipitation de l'ARN**

Aux échantillons précédents, 560 µL d'éthanol absolu ont été ajoutés puis l'ensemble a été bien vortexé pendant 15 secondes et centrifugé brièvement à 6000g pendant 30 secondes pour récupérer les éventuelles gouttelettes présentes sur les bords du microtube.

- **Adsorption**

Sur la colonne chromatographique correspondant à chaque échantillon, 630 µL de chaque mélange précédent ont été déposés. Une centrifugation à 4°C à 6000 g pendant une minute a été faite et la colonne a été transférée sur un autre tube collecteur propre de 2 mL. Le filtrat précédent a été jété dans une poubelle de déchets contaminés. Une deuxième adsorption dans la même colonne a été effectuée avec le reste d'échantillon dans le tube Eppendorf de 1,5 mL.

- **Lavage**

Dans chaque colonne, 500 µL de tampon AW1 ont été ajoutés et l'ensemble a été centrifugé à 4°C pendant une minute à 6000 g. Chaque colonne a été transférée sur un autre tube collecteur propre de 2 mL et 500 µL de tampon AW2 ont été ajoutés dans chaque colonne. Une autre centrifugation à 4°C pendant 3 minutes à 20000 g a été effectuée. Le tube collecteur a été vidé et une centrifugation optionnelle a été faite à 20000 g pendant une minute.

- **Elution**

Après lavage, chaque colonne a été transférée sur un microtube de 1,5 mL étiqueté et 60 µL d'eau distillée *DNase/RNase free* ont été ajoutés dans les colonnes en prenant soins de la déposer sur la résine. L'ensemble a été laissé reposer une à 2 minutes sur la paillasse et centrifugé à 4°C pendant une minute à 6000 g. La colonne a été jétée et le microtube contenant l'ARN était conservé à +4°C si l'amplification était immédiate ou à -20/-80°C si différée.

Un contrôle interne a été ajouté aux échantillons pour vérifier l'étape d'extraction.

## **II.2.1.2 Amplification par RT-PCR**

### **II.2.1.2.1 Principe**

Le kit Fast Track Diagnostic Respiratory Pathogens 33 est un test *in vitro* pour la détection quantitative de l'acide nucléique à partir des prélèvements biologiques (écouvillons de gorge, nasaux, de lavage broncho-alvéolaire, de crachat et de culture) d'origine humaine. Après transcription inverse, l'ADN (tableau II) des différents pathogènes respiratoires est amplifié simultanément dans un même tube par PCR. La présence d'une séquence spécifique

d'un pathogène dans la réaction est détectée par une augmentation de la fluorescence correspondant à la sonde spécifique du pathogène (Gowin *et al.*, 2017).

**Tableau II: Liste des gènes cibles pour le kit FTD**

<b>Bactérie</b>	<b>Gène cible</b>
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Insertion sequence IS481 assay Bord1</i>
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	<i>RNA polymerase beta chain</i>
<i>Haemophilus influenzae</i> spp. -Sérotype <i>b</i>	<i>Outer membrane protein 2 (ompP2)</i> <i>-bsc3</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>khe hemolysin</i>
<i>Legionella</i> spp.	<i>Outer membrane MIP protein (mip)</i>
<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Outer membrane protein B2 (copB)</i>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Adhesin P1</i>
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Tetrathionate subunit B (ttrB)</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Sensor histidin kinase vick</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>LytA</i>

#### **II.2.1.2.2 Mode opératoire**

- **Préparation du mix**

Sur un portoir réfrigéré et en portant des gants sans talc, le mix a été préparé dans 4 tubes de 1,5 mL en fonction des différentes cibles. Le mix pour une réaction a été préparé à partir de 12,5 µL de tampon *Fast Track*, 1,5 µL de mélange d'amorces et sondes, et 1 µL d'enzyme pour les différents mix. Le mélange a été vortexé et centrifugé brièvement pour les 4 tubes de *mix* et 15 µL de chaque *mix* a été distribué selon le plan de plaque de la feuille de paillasse *FTD Respiratory Pathogens 33* (Annexe 9).

- **Dépôt des extraits d'ARN sur la microplaque**

La plaque a été transportée jusqu'en pièce d'extraction où la plaque était mise sur un portoir réfrigéré et 10 µL de chaque extrait d'ARN ajoutés par puit suivant le plan de la plaque. Des contrôles positifs et négatifs ont été inclus dans chaque expérience d'amplification. La plaque a été couverte avec un film adhésif à l'aide de l'applicateur afin d'obtenir une bonne étanchéité et centrifugée brièvement afin de faire descendre l'ensemble du liquide au fond des puits.

- **Amplification**

La microplaque a été transférée en pièce d'amplification et les extraits d'ARN restant ont été conservés à +4°C en attendant leur transfert à -80°C. Une fois la plaque introduite dans le thermocycleur ABI PRISM 7500 qui avait été mis en marche 30 minutes avant, le programme d'amplification comprenait plusieurs cycles : un cycle de transcription inverse à 42 °C pendant 15 minutes, un cycle d'activation de la *Taq* polymérase et pré-dénaturation de l'ADN à 94 °C pendant 3 minutes et 40 cycles d'amplification. Les cycles d'amplification comprenaient une dénaturation à 94 °C pendant 8 secondes et une hybridation à 60 °C pendant 34 secondes.

- **Lecture des résultats d'amplification**

L'interface de l'ABI sur ordinateur a été utilisée pour analyser les résultats de l'amplification. L'ensemble de l'expérience était validé en cas d'amplification des contrôles positifs de chaque pathogène avec un seuil (Ct) inférieur à 33 tandis que les échantillons qui étaient extraits avec le contrôle interne devaient avoir un seuil inférieur à 33 et une non amplification du témoin négatif (Annexe 10).

## **II.2.2 Culture bactériologique**

Les échantillons provenant des patients étaient ensemencés sur des milieux de gélose au sang cuit additionnés de Polyvitex (gélose chocolat P) et sur gélose au sang frais de mouton, puis incubées à 35-37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub> pendant 18 à 24 heures. Les lavages broncho-alvéolaires et les liquides pleuraux ont été aussi ensemencés sur milieux Cysteine-Lactose-Electrolyte-Deficient et incubées à 37 °C en atmosphère normale pendant 18 à 24 heures. Pour ce qui concerne les liquides pleuraux purulents, une boîte de gélose au sang additionnelle a été ensemencée en anaérobiose dans le Genbag jusqu'à 72 heures. Les écouvillonnages nasopharyngés ont été ensemencés et incubée au niveau des sites d'étude et incubés dans une jarre avec bougie, acheminés au Centre Pasteur pour transfert dans l'étuve à CO<sub>2</sub>. Tous les essais étaient effectués sur une subculture d'une seule colonie de bactérie isolée.

L'identification de tous les isolats était confirmée par des tests standards biochimiques (Washington C. Winn *et al.*, 2006) (Annexes 11 à 12).

### **II.2.3 Caractérisation phénotypique des isolats**

Les colonies bactériennes issues de la culture étaient soumises à la coloration de Gram et aux tests biochimiques pour leurs identifications.

#### **II.2.3.1 Coloration de Gram**

La coloration de Gram, également appelée méthode de Gram, est une méthode de coloration utilisée pour distinguer et classer les espèces bactériennes en deux grands groupes.

##### **II.2.3.1.1 Principe**

La coloration Gram consiste à déterminer si une bactérie est Gram positif ou Gram négatif à partir de la structure de la paroi cellulaire. Après une coloration primaire des bactéries et fixation du colorant par un mordant (un oxyde inorganique), certaines bactéries sont capables de retenir le colorant primaire en résistant à la décoloration, tandis que d'autres sont décolorées par le décolorant. Les bactéries qui conservent le colorant primaire sont appelées Gram positif et les bactéries décolorées puis contre-colorées sont appelées Gram négatif (Coico, 2005).

##### **II.2.3.1.2 Mode opératoire**

Après avoir réalisé et fixé les frottis à la chaleur, la procédure de coloration de Gram était la suivante :

Les lames à colorer étaient disposées sur un support au-dessus d'un évier. Les frottis ont été couverts avec quelques gouttes de solution de violet de gentiane (ou cristal violet pour colorer le cytoplasme des bactéries). L'action du colorant était de 30 secondes. L'élimination de la solution de violet de gentiane du frottis s'était faite avec la solution de lugol (ou iode, permet de fixer le violet dans les bactéries). Le lugol a agi pendant une minute et la lame a été rincée soigneusement avec l'eau du robinet. La solution d'alcool-acétone a été utilisée pour décolorer le frottis en la faisant couler sur la lame jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis (10 secondes environ). Le rinçage a été fait avec l'eau du robinet et le surplus d'eau était enlevé. Les lames ont été couvertes avec la solution de fuchsine pour agir pendant 30 secondes. Le rinçage a été fait avec l'eau du robinet, le surplus d'eau était enlevé et les lames séchées à l'air libre. La lecture des lames était faite au microscope à l'objectif à immersion. Les bactéries Gram négatif étaient colorées en rose et les bactéries Gram positif en violet (Annexe 13).



### **II.2.3.2 Test à l'optochine**

Le test de sensibilité à l'optochine (éthyl hydrocupréine chlorhydrate) est utilisé pour l'identification présomptive de streptocoques alpha-hémolytiques en tant que *Streptococcus pneumoniae*.

#### **II.2.3.2.1 Principe**

Sur un milieu gélose au sang selon la diffusion sur disque, le pneumocoque est sensible à l'optochine tandis que tous les autres streptocoques et en particulier les streptocoques alpha-hémolytiques en sont résistants. Cette sensibilité résulte des modifications de la tension superficielle, créant une zone d'inhibition claire.

#### **II.2.3.2.2 Mode opératoire**

Les colonies typiques de *Streptococcus pneumoniae* (pneumocoques) étaient petites et grisâtres et entourées d'une zone verdâtre d'alpha-hémolyse. Une suspension de culture pure colonies présumées de pneumocoques a été ensemencée sur une gélose au sang de mouton. Un disque d'optochine a été déposé sur la surface de gélose ensemencée et la boîte a été incubée à 35-37 °C en présence de 5% de CO<sub>2</sub> pendant 18 à 24 heures.

#### **II.2.3.2.3 Lecture et interprétation**

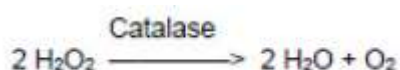
La lecture consistait à mesurer la zone d'inhibition autour du disque d'optochine après incubation. Une zone d'inhibition des colonies alpha-hémolytiques supérieure à 14 mm permettait une identification présomptive de pneumocoque.

### **II.2.3.3 Test à la catalase**

La recherche de la catalase est un test fondamental pour l'identification des bactéries à Gram positif (principalement utilisé pour différencier les cocci à Gram positif). Les membres du genre *Staphylococcus* sont positifs pour la catalase et les membres des genres *Streptococcus* et *Enterococcus* sont négatifs pour la catalase.

#### **II.2.3.3.1 Principe**

Ce test consiste à la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qui est un produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries en H<sub>2</sub>O et en O<sub>2</sub> sous l'action de l'enzyme catalase (EC 1.11.1.6) selon réaction ci-dessous. L'oxygène se dégage sous forme de bulles gazeuses dans le liquide.



### **II.2.3.3.2 Mode opératoire**

Sur une lame de verre, 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été déposé et mis en contact avec une colonie d'une culture pure de streptocoque (18 à 24 heures) à l'aide d'une oese. Il fallait éviter de transférer de la gélose au sang sur la lame car les érythrocytes dans cette gélose pouvaient provoquer une réaction faussement positive. Une souche de contrôle de qualité positif (*Staphylococcus spp*) et négatif (*S. pneumoniae*) était utilisée.

### **II.2.3.3.3 Lecture et interprétation**

L'absence de bulles dans une colonie transférée indiquait un test négatif tandis que toute production de bulles d'une colonie transférée indiquait un test positif

### **II.2.3.4 Vitek 2 pour l'identification des bactéries**

Vitek 2 a été utilisé pour l'identification des bacilles Gram négatifs (sauf les *Haemophilus*) et des streptocoques (sauf les pneumocoques).

#### **II.2.3.4.1 Principe**

L'identification des bactéries sur Vitek 2 repose sur des tests biochimiques automatisés à l'aide de cartes contenant des cupules avec différents réactifs à partir d'une suspension bactérienne. Une suspension bactérienne de 0,5 à 0,6 Mac Farland est effectuée dans un tube en plastique qui est placé sur un portoir spécial. Une paille accolée à la carte est introduite dans le tube. L'appareil prend ensuite en charge toutes les dilutions nécessaires, l'aspiration de la suspension dans chaque cupule et l'incubation de la carte. Le module analytique procède à des lectures toutes les 15 minutes en mesurant le trouble ou le changement de couleur présent dans chaque cupule. Il donne ensuite une identification du germe en fonction des profils biochimiques trouvés (Pincus & Miller, 2005).

#### **II.2.3.4.2 Mode opératoire**

À partir d'une culture pure de 18 à 24 heures, il a été prélevé à l'aide d'un écouvillon stérile quelques colonies bien isolées et dissoutes dans 3 mL d'eau déminéralisée stérile dans un tube en effectuant un Mac Farland de 0,5 à 0,6. Le tube étant placé sur le portoir, la paille de la carte correspondante était placée dans le tube et l'ensemble était dans le module analytique du Vitek (ViteK 2 compact).

#### **II.2.3.4.3 Lecture et interprétation**

L'analyse durait entre 4 et 10 heures et le programme imprimait les résultats obtenus lorsque l'analyse était terminée. Sur la feuille de résultat, apparaissaient le nom du germe

identifié ainsi que le pourcentage de l'identification. Si le message « *Low Discrimination* » apparaissait, cela signifiait que l'automate hésitait entre plusieurs identifications et des tests complémentaires (Galeries de tests biochimiques) étaient effectués afin de choisir le germe adéquat.

### **II.2.3.5 Galeries de tests biochimiques API 20E**

Le système API 20E est un système de microtube miniaturisé et normalisé comprenant 21 tests biochimiques «de base» classiques et 6 tests supplémentaires utilisés pour l'identification des Enterobacteriaceae et d'autres bactéries Gram négatif non fastidieuses.

#### **II.2.3.5.1 Principe**

La bandelette API 20 E est composée de 20 microtubes (ou cupules) qui contiennent des substrats déshydratés et inoculés par une suspension bactérienne puis incubés, le métabolisme produit des changements de couleur qui sont spontanées ou révélées par l'ajout de réactifs (Shayegani *et al.*, 1978).

#### **II.2.3.5.2 Mode opératoire**

À partir d'une suspension bactérienne d'opacité 0,5 sur l'échelle de Mac Farland, chaque microtube a été rempli à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles d'air. Le tube et la cupule ont été remplis pour citrate de trisodium, pyruvate de sodium et gélatine. Pour les caractères biochimiques L-arginine, L-lysine, L-ornithine, thiosulfate de sodium et urée, le tube a été rempli de suspension et la cupule a été recouverte avec de l'huile minérale (huile de paraffine) pour créer une anaérobiose. La boîte d'inoculation a été fermée et incubée à  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 18 à 24 heures (étuve Memmert UNE600).

Après la période d'incubation, une goutte des réactifs L-tryptophane, JAMES, pyruvate de sodium 1 et 2 a été ajoutée aux microtubes correspondant et les réactions étaient interprétées suivant le changement de coloration ou non et l'identification était obtenue en se référant au décodeur *Analytical Profile Index*.

### **II.2.3.6. Test d'agglutination au latex**

Un isolat clinique était probablement identifié comme étant *S. aureus* au moyen de l'agglutination au latex (réactif PASTOREX™ STAPH-PLUS).

#### **II.2.3.6.1 Principe**

Le test consiste à rechercher simultanément le facteur d'affinité pour le fibrinogène, également appelé coagulase liée, la protéine A qui possède une affinité pour le «fragment cristallisable» (Fc) des immunoglobulines gamma (IgG) et les polysaccharides capsulaires de *S. aureus*. Après avoir bien mélangé les isolats de *Staphylococcus* avec le réactif au latex sur une carte d'agglutination, la formation d'agglutinats indique la présence de *S. aureus* (Bio-Rad, 2015).

#### **II.2.3.6.2 Mode opératoire**

Une goutte de réactif latex test (Pastorex; Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) était déposée après homogénéisation dans un des cercles de la carte d'agglutination. Une autre goutte de réactif latex témoin négatif était déposée sur un autre cercle. Avec un bâtonnet en plastique sous le poste de sécurité microbiologique, 1 à 3 colonies de cocci Gram-positifs catalase + étaient prélevées, puis émulsionnées avec la goutte de latex pendant 10 secondes. La même chose était faite pour le réactif latex témoin négatif. Le mélange de la carte était homogénéisé en effectuant un mouvement rotatif. La lecture s'était faite en moins de 30 secondes qui suivaient le début des mouvements rotatifs de la carte.

#### **II.2.3.6.3 Lecture et interprétation**

Une réaction était positive lorsqu'il y avait formation d'agrégats uniquement avec le latex test, visibles à l'oeil nu sous un éclairage normal, en moins de 30 secondes. Les agrégats de particules de latex pouvaient être de taille plus ou moins importante, avec un fond rose plus ou moins laiteux. L'apparition d'une réaction lente et faible pouvait traduire une réaction non spécifique.

Dans le cas d'une réaction négative, la suspension ne présentait pas d'agrégats et gardait son aspect laiteux.

L'indication d'un résultat non interprétable était donnée dans le cas d'une agglutination du réactif contrôle négatif. Dans ce cas, la présence de la coagulase libre était recherchée

### II.2.3.7 Test de la coagulase

Le test à la coagulase était utilisé pour différencier *Staphylococcus aureus* (positif) du staphylocoque à coagulase négatif.

#### II.2.3.7.1 Principe

La coagulase (EC 3.4.23) est une enzyme produite par *S. aureus* qui convertit le fibrinogène (soluble) dans le plasma (réaction ci-dessous) en fibrine (insoluble). *S. aureus* produit deux formes de coagulase, liée et libre. Le test de la coagulase sur lame ou sur carte est effectué pour détecter la coagulase liée ou le facteur d'agglutination. Le test de la coagulase en tube est effectué pour détecter la coagulase libre (Tankeshwar, 2012).

#### Coagulase



#### II.2.3.7.2 Mode opératoire

Il a été préparé à partir du plasma de lapin une dilution au sixième (1/6) avec une solution saline (NaCl à 0,85%). Quelques colonies émulsionnées de staphylocoques à tester ont été introduites dans 1 mL de plasma de lapin dilué pour obtenir une suspension laiteuse dans de petits tubes. Après incubation des tubes à 35-37 °C dans l'étuve à atmosphère normale, ils étaient examinés à 1, 2 et 4 heures pour la formation de caillots en inclinant le tube de 90° (Les caillots pouvaient se liquéfier après leur formation). Les tubes négatifs étaient laissés à la température ambiante pendant 24 heures et réexaminés car certains isolats de *S. aureus* pouvaient produire un caillot retardé qui était rapidement lysé à 37 °C par la staphylokinase.

#### II.2.3.7.3 Lecture et interprétation

Un test était considéré comme positif s'il y avait formation de caillot et négatif si le plasma restait entièrement liquide.

### II.2.3.8 Identification des colonies des espèces *Haemophilus*

Les *Haemophilus* étaient identifiés par la morphologie des colonies, la coloration Gram et l'incapacité de croissance sur la gélose au sang de mouton. À proximité d'une flamme du bec de bunsen, une colonie pure présomptive d'*Haemophilus* était mise en solution et ensemencée sur les milieux gélose au sang de mouton et chocolat polyvitex. Les deux milieux ensemencés ont été incubés dans l'étuve à CO<sub>2</sub> (5-10%) à 35-37°C pendant 18 à 24 heures. Après incubation,

Les croissances bactériennes observées uniquement sur milieu de chocolat polyvitex étaient celles des *Haemophilus*.

#### **II.2.4 Diagnostic de la tuberculose**

La microscopie, la culture sur des milieux solides et liquides et/ou *GeneXpert* ont été réalisés chez des patients présentant des symptômes compatibles ou suggérant une tuberculose. Les échantillons pulmonaires comprenaient: les expectorations, les aspirations bronchiques et les liquides pleuraux. L'examen direct a été fait à l'auramine O. Après décontamination, les échantillons ont été inoculés dans un milieu solide Lowenstein-Jensen et un milieu liquide MB/BacT (bioMérieux) pour la détection de la croissance mycobactérienne (diagnosis, 2014). Le *GeneXpert* a été réalisé conformément aux instructions du fabricant (Cepheid, 2009). Le réactif échantillon a été ajouté aux échantillons cliniques dans un rapport de 2: 1 dans un tube. Le tube avec l'échantillon a été fermé et agité manuellement deux fois pendant une période de 15 minutes à la température ambiante, et laissé reposer pendant 10 minutes à la température ambiante. Ensuite, 2 ml de l'échantillon inactivé ont été transférés sur la cartouche de test et insérés dans la plate-forme de test pour le processus automatique.

#### **II.2.5 Analyses statistiques**

L'ensemble des données a été enregistré dans le tableur Excel de Word Microsoft 2013 à partir duquel les diagrammes et histogrammes ont été conçus. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Statistical Package for Social Sciences (version 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, États-Unis). En plus de l'analyse de l'ensemble des données, des analyses sous-groupe ont été effectuées.

La distribution des variables catégorielles a été comparée en utilisant le test du khi-deux ou les tests exacts de Fisher, selon le cas. Le test du chi carré ou le test exact de Fisher a été utilisé pour évaluer l'association entre la détection bactérienne et des paramètres sociodémographiques et cliniques. Le test t indépendant a été effectué pour la comparaison moyenne entre les groupes. Les résultats de la détection bactérienne par culture et RT-PCR ont été comparés à l'aide du test McNemar. Une valeur de  $p < 0,05$  était considérée comme significative.

## II.3 IDENTIFICATION DES ESPÈCES *Haemophilus* ET DIVERSITE GENETIQUE

### II.3.1 Approche expérimentale

Les échantillons à culture positive pour *Haemophilus* étaient utilisés pour la suite de l'étude. Les espèces d'*Haemophilus* ont été identifiées sur la base de plusieurs approches (phénotypiques et génotypiques). Elles ont été initialement identifiées par la morphologie des colonies, la coloration de Gram et par les facteurs de croissance (facteurs V, X et XV). L'approche moléculaire consistait à l'amplification du gène de la protéine de la membrane externe (*ompP2*), le gène fucose kinase (*fucK*), le gène de la protéine D (*hpd*) et le gène de la protéase immunoglobuline A (*IgA*) par PCR. L'approche protéomique via la spectrométrie de masse a été aussi appliquée pour l'identification. Le séquençage du génome entier a été effectué avec le BLAST de ce dernier et des gènes *gyrA*, *rpoB* ont été faits pour identifier les différentes espèces d'*Haemophilus*.

### II.3.2 Biotypage des *Haemophilus*

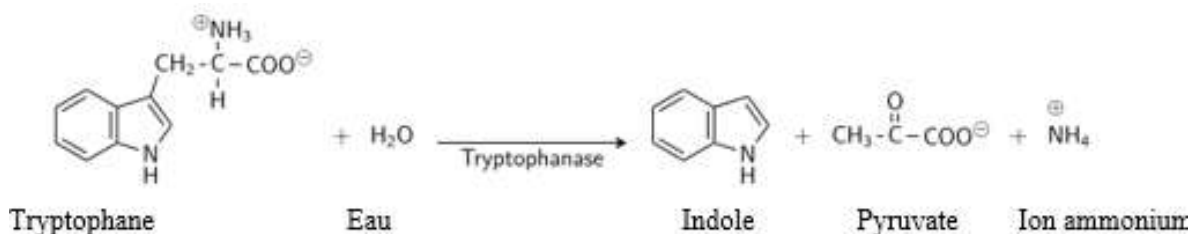
Trois tests sont utilisés en routine pour la détermination des biotypes des *Haemophilus* à partir des cultures de 18 à 24 heures à savoir la production de l'indole, l'activité de l'uréase et de l'ornithine décarboxylase (ODC) (Kilian, 1976).

#### II.3.2.1 Test à l'indole

Le test à l'indole est un test biochimique couramment utilisé pour déterminer la capacité d'un organisme à transformer le tryptophane.

##### II.3.2.1.1 Principe

Le tryptophane est hydrolysé par la tryptophanase (EC 4.1.99.1) pour produire trois produits finaux possibles ; dont l'un est l'indole selon la réaction ci-dessous. La production d'indole est détectée par le réactif de James reconstitué qui réagit avec celui-ci pour obtenir une coloration rouge (MacFaddin, 2000).

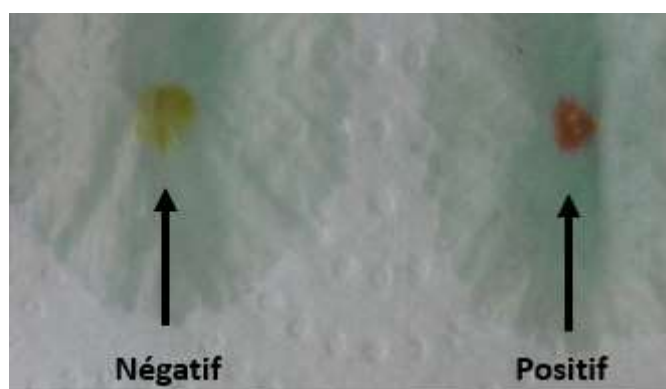


### II.3.2.1.2 Mode opératoire

À l'aide d'un écouvillon, il a été prélevé quelques colonies d'*Haemophilus* et y a été déposé une goutte du réactif de James reconstitué. Une autre approche était de prélever à l'aide d'une oese stérile quelques colonies de culture pure d'*Haemophilus* et de former un spot sur un papier kleenex/buvard blanc puis y ajouter une goutte du réactif de James reconstitué.

### II.3.2.1.3 Lecture et interprétation

Un virage se développait plus ou moins rapidement. Un virage de couleur rouge était caractéristique d'une réaction positive (Figure 9).



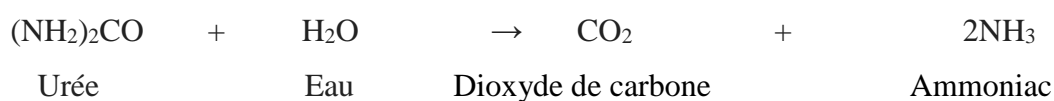
**Figure 9: Résultats du test à l'indole**

### II.3.2.2 Test à l'uréase

L'uréase est une enzyme produite par les bactéries qui hydrolysent l'urée. Elle est produite par plusieurs espèces de bactéries. La détection de l'activité de l'uréase est devenue un outil important pour le biotypage des espèces d'*Haemophilus*.

#### II.3.2.2.1 Principe

De nombreux microorganismes comme *Haemophilus influenzae* ont une enzyme : l'uréase (urée amidohydrolase; EC 3.5.1.5) qui est capable de rompre l'urée qui est un diamide d'acide carbonique en présence d'eau pour libérer l'ammoniac et du dioxyde de carbone suivant la réaction ci-dessous. L'ammoniac se combine avec le dioxyde de carbone et de l'eau pour former du carbonate d'ammonium qui rend le milieu alcalin, changeant l'indicateur rouge phénol (couleur jaune orangé à l'origine) au rose vif (Mobley *et al.*, 1995).





### II.3.2.2.2 Mode opératoire

Quelques colonies d'*Haemophilus* ont été prélevées à l'aide d'une oese et mises au contact d'environ 2 mL d'urée dans un tube stérile. Après avoir bien mélangé, l'incubation a été faite à  $35\pm 2^\circ\text{C}$  en aérobiose (en fermant hermétiquement le tube) pendant 16 à 24 heures.

### II.3.2.2.3 Lecture et interprétation

Un virage de couleur rose était caractéristique d'une réaction positive (Figure 10).



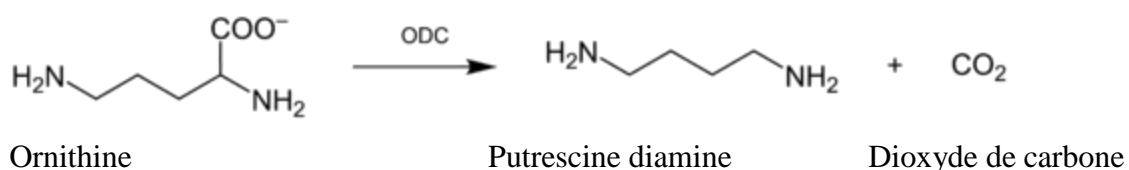
Figure 10: Résultats du test à l'uréase

### II.3.2.3 Test à l'ornithine décarboxylase

Le test à l'ornithine décarboxylase est un test biochimique couramment utilisé pour déterminer la capacité des espèces *Haemophilus* à être biotypées.

#### II.3.2.3.1 Principe

L'acide aminé L-ornithine est décarboxylé par l'enzyme ornithine décarboxylase (ODC, EC 4.1.1. 17) des bactéries pour donner la putrescine diamine et le dioxyde de carbone suivant la réaction ci-dessous. Le glucose est l'hydrate de carbone fermentable qui, au cours des premières étapes de l'incubation, est fermenté par les organismes qui produisent de l'acide, ce qui entraîne un changement de couleur de l'indicateur de pH au jaune. La production de la putrescine élève le pH du milieu vers l'alcalinité et l'indicateur change de couleur du jaune au violet caractérisant une réaction positive. Si l'organisme ne produit pas l'enzyme appropriée (ODC), le milieu reste acide ou de couleur jaune (Kilian, 1976).



### II.3.2.3.2 Mode opératoire

Avec une oese, quelques colonies d'*Haemophilus* ont été collectées et introduites dans un tube contenant le bouillon ornithine décarboxylase (monochlorhydrate de L-Ornithine, extrait de levure, glucose et pourpre de bromo crésol). Le tube était hermétiquement fermé et incubé à 35±2°C en aérobiose pendant 16 à 24 heures. L'ensemble des réactions a été fait avec un contrôle positif et négatif

### II.3.2.3.3 Lecture et interprétation

Un virage de couleur violette était caractéristique d'une réaction positive (Figure 11).



Figure 11: Résultats du test à l'ornithine décarboxylase

### II.3.2.4 Interprétation des biotypes

L'identification des différents biotypes est obtenue à partir des caractères biochimiques qui se résument dans le tableau III suivant :

**Tableau III: Biotypes des *Haemophilus* à partir des tests biochimiques**

Désignation du biotype			Production		
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i> *	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Uréase	Indole	ODC
I	I	IV	+	+	+
II	II	VII	+	+	-
III	III	III	+	-	-
IV	IV	II	+	-	+
V	V	VI	-	+	+
VI	VI	I	-	-	+
VII	VII	VIII	-	+	-
VIII	VIII	V	-	-	-

(+) : réaction positive; (-) : réaction négative ; ODC : ornithine décarboxylase ; \* : classification des biotypes d'*Haemophilus haemolyticus* (Kilian, 1976; Nørskov-Lauritsen, 2014).

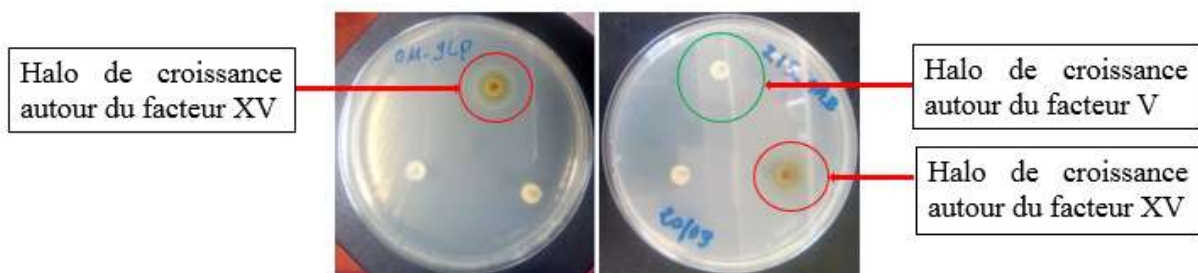
### II.3.3 Test de facteurs de croissance

#### II.3.3.1 Principe

Les bactéries du genre *Haemophilus* ont des exigences variables pour les facteurs de croissance afin de se développer. Ces facteurs de croissance sont le facteur X (hémine) ou uniquement le facteur V (nicotinamide adénine dinucléotide, NAD) ou une combinaison des deux. Par conséquent, les différences importantes dans les besoins en facteurs de croissance des *Haemophilus spp.* permettent leur différenciation (Nørskov-Lauritsen, 2014).

#### II.3.3.2 Mode opératoire

À partir d'un inoculum de 0,5 McFarland (0,5-0,8) préparé à partir du tampon phosphate de 0,15M, les milieux de culture G2 ont étéensemencés à l'aide d'un écouvillon. Par la suite, les disques des facteurs X, V et V+X ont été prélevés et déposés à plat sur le milieu gélose G2ensemencé à l'aide d'une pince stérile. Les boîtes de gélose G2 avec facteurs ont été incubées dans l'étuve à CO<sub>2</sub> à 35-37°C pendant 18 à 24 heures (Figure 12).



**Figure 12: Halo de croissance autour des disques de facteurs de croissance**

#### II.3.3.3 Lecture et interprétation

L'identification de l'espèce repose sur la présence ou l'absence d'un halo de croissance autour du disque de facteurs de croissance V, X et XV telle que décrite dans le tableau IV.

**Tableau IV: Besoins en facteurs de croissance (V, X et XV) en fonction des espèces d'*Haemophilus*.**

Espèces d' <i>Haemophilus</i>	Facteur X	Facteur V	Facteur XV
<i>H. influenzae</i>	-	-	+
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	+
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+
<i>H. ducreyi</i>	-	-	+
<i>H. aegyptius</i>	+	-	+

(-) : Pas de croissance bactérienne ; (+) : Croissance bactérienne

### II.3.4 Identification par spectrométrie de masse

Le spectromètre de masse *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight* (MALDI-TOF) est couramment utilisé pour identifier les espèces bactériennes, y compris les espèces d'*Haemophilus*, en analysant la composition des protéines ribosomales dans un échantillon.

#### II.3.4.1 Principe

Le principe général du MALDI-TOF repose sur le déplacement des ions de masse et de charge différentes soumis à un champ électrique, et la distance parcourue en un temps donné est fonction du rapport masse sur charge ( $m/z$ ). La première étape consiste à mélanger l'échantillon à la matrice, l'évaporation des solvants conduisant à la cristallisation de la matrice avec l'échantillon. Le mélange ainsi formé est déposé sur un support (plaque métallique). Plusieurs techniques de dépôt existent. Les préparations en « couches minces » où l'échantillon est déposé sur une couche de matrice préalablement déposée sur la plaque cible pour former de larges films minces polycristallins. Les préparations en « gouttes épaisses » ou « gouttes sèches » où matrice et échantillon sont mélangés soit dans un tube puis déposés sur la plaque cible, soit directement sur la plaque cible. Les préparations en « sandwich » où l'échantillon est déposé sur un film de matrice avant d'être lui-même recouvert par une dernière couche de matrice. Une fois les échantillons déposés sur la cible, cette dernière est introduite dans le spectromètre de masse. Chaque dépôt est soumis à l'action du rayon laser ultra-violet (UV). Le rôle de la matrice est d'absorber l'énergie provenant du laser ce qui provoque la vaporisation de l'échantillon avec formation d'ions de masses différentes.

Les ions ainsi formés, généralement monochargés dans le cas du MALDI, vont être mis en mouvement sous l'action d'un champ électrique, et l'analyseur va les séparer en fonction de leur rapport  $m/z$ . Ils traversent ensuite un certain nombre de grilles d'extraction avant d'atteindre le « tube de vol » à l'extrémité duquel se trouve le détecteur. Les ions sont séparés selon leur temps de vol, ceux de petite taille atteignant les premiers le détecteur. Le temps de vol (*time of flight*) pour atteindre le détecteur est utilisé pour calculer la masse de chaque particule. La somme des ions analysés va former un spectre caractéristique de l'échantillon. Classiquement, l'axe des abscisses correspond au rapport masse sur charge ( $m/z$ ) et l'axe des ordonnées à l'intensité relative du signal (Carbonnelle & Nassif, 2011).

#### **II.3.4.2 Mode opératoire**

L'identification par le MALDI-TOF se fait en 3 étapes dont la préparation du culot, la préparation de la matrice et l'analyse sur le spectromètre de masse.

##### **II.3.4.2.1 Préparation du culot**

À partir d'une culture bactérienne de 18 à 24 heures, un quart d'ose a été prélevé pour réaliser une suspension avec 300  $\mu\text{L}$  d'eau distillée stérile dans un tube Eppendorf (1,5 ou 2 mL). Ensuite, 900  $\mu\text{L}$  d'éthanol absolu ont été ajoutés et le mélange était centrifugé pendant 3 minutes à 13000 tours/minutes. À cette étape le contenu du tube Eppendorf pouvait être stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

##### **II.3.4.2.2 Préparation de la matrice**

Le surnageant du mélange précédent a été éliminé. Pour un culot qui a été stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$ , une centrifugation à 13000 tours/minutes a été effectuée avant d'éliminer tout le surnageant. Cinquante microlitres d'acide formique à 70% et 50  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile pur (si le culot est assez important, ajouter plutôt 100 $\mu\text{L}$ ) ont été ajoutés au culot. Après centrifugation à 13000 tours/minute, un spot de 1  $\mu\text{L}$  de surnageant de la souche à tester (fait en doublon) a été déposé sur une plaque (sans oublier d'ajouter aussi 1 $\mu\text{L}$  de contrôle positif, *Escherichia coli*) et laissé sécher sous la hotte. Un microlitre de matrice constituée d'acide  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamique (Bruker Matrix HCCA) a été déposé sur chaque spot et laissé sécher avant analyse et lecture sur le spectromètre de masse MALDI-TOF (Annexe 14). La correspondance de scores était la suivante :

- pour une valeur de 2,00 à 3,00 ; l'identification est d'une haute confiance,
- pour une valeur de 1,70 à 1,99 ; l'identification est d'une faible confiance,
- pour une valeur de 0,00 à 1,69 ; aucune identification n'est possible.

## **II.3.5 Identification des *Haemophilus* par PCR**

### **II.3.5.1 Extraction de l'ADN par choc thermique**

#### **II.3.5.1.1 Principe**

Il consiste à fragiliser les parois des cellules bactériennes par des cycles de congélation/décongélation (ou chauffage/refroidissement) provoquant la rupture des membranes cellulaires. Les débris membranaires et protéiques sont précipités par centrifugation et le surnageant contenant les acides nucléiques est utilisé comme extrait.

#### **II.3.5.1.2 Mode opératoire N°1 d'extraction d'ADN**

Sous un poste de sécurité microbiologique, une colonie pure d'*Haemophilus* de 18 à 24 heures a été suspendue dans 50 µL d'eau distillée stérile un tube Eppendorf de 1,5 mL, et vortexée (Fisher Scientific). Cette suspension a été portée à 95°C sur un bloc chauffant (VWR) pendant 10 minutes, puis refroidie immédiatement à -20°C (Congélateur Easytronic) pendant 20 minutes. L'opération a été répétée deux fois afin de lyser les bactéries. Après un dernier chauffage, une centrifugation à 12000 tours/minute à +4°C (Hettich Rotanta 460R) pendant trois minutes a été effectuée. Le surnageant a été transféré dans un second tube Eppendorf étiqueté de manière appropriée et utilisé comme extrait d'ADN pour les manipulations ultérieures. La conservation de ces extraits était réalisée à -20°C (Congélateur Vestfrost) (Freschi *et al.*, 2005).

#### **II.3.5.1.3 Mode opératoire N°2 d'extraction d'ADN**

Sous un poste de sécurité microbiologique, il a été ajouté quelques colonies de culture pure d'*Haemophilus* dans 700 µL d'eau distillée stérile, le tout dans un tube Eppendorf de 1,5 mL, et le mélange a été vortexé. La suspension précédente a été congelée pendant 5 à 10 minutes dans de la carboglace (ou congélateur). Par la suite, la suspension a été portée à ébullition (à 100°C environ) pendant 5 minutes dans un bécher contenant de l'eau distillée (un tourniquet était utilisé pour stabiliser les tubes). Enfin, la suspension a été centrifugée à 12000 tours/minute pendant 10 minutes et le surnageant a été conservé à -20°C ou utilisé immédiatement pour la purification.

### **II.3.5.2 Mode opératoire de purification de l'ADN : QIAquick® PCR purification kit**

Il a été introduit 100 µL du surnageant précédent (extrait d'ADN) et 500 µL de tampon PB dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. L'ensemble a été vortexé et centrifugé (pour faire descendre les gouttes).

Après avoir introduit le mélange précédent dans la colonne à filtre, la centrifugation a été effectuée à 13000 tours/minute pendant 1 minute. Le contenu du tube poubelle a été éliminé. Sept cent cinquante mL de tampon PE reconstitué avec 24 mL d'éthanol absolu (96-100°) a été ajouté dans la colonne et une centrifugation à 13000 tours/minute a été faite. Le contenu du tube poubelle a été éliminé. L'étape d'ajout du tampon PE était répétée.

Pour l'éluat, 50 µL d'eau distillée stérile ont été ajoutés dans la colonne. Après avoir laissé agir une minute, une centrifugation à 13000 tours/minute pendant 1 minute a été faite. L'éluat constituant l'ADN purifié a été utilisé pour les amplifications ou bien conservé à -20°C.

### **II.3.5.3 Amplification des gènes *fucK*, *IgA*, *ompP2* et *hpd***

#### **II.3.5.3.1 Principe**

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est une technique basée sur l'amplification enzymatique *in vitro* de l'ADN permettant d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN dans un mélange réactionnel donné et soumis à des cycles thermiques. Les cycles thermiques répétés consistent en une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase thermostable en présence des déoxynucléosides triphosphates (dNTP). Cette réaction est réalisée grâce à l'utilisation d'un thermocycleur qui maintient les échantillons dans un bloc chauffant, où des modifications rapides et contrôlées de la température sont effectuées au cours des différentes phases du processus d'amplification (Garibyan & Avashia, 2013).

#### **II.3.5.3.2 Mode opératoire**

Les amorces spécifiques au type capsulaire ont été utilisées (tableau V): *fucK*, *IgA*, *ompP2* et *hpd*. Un total de 35,3 µL de mélange réactionnel par échantillon a été préparé qui comprenait 16,03 µL d'eau distillée stérile, 4,29 µL de dNTP (5 mM), 4,29 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,86 µL diméthyl sulfoxyde (DMSO), 0,13 µL de chacune des amorces sens et anti-sens (100 µM), 4,29 µL de tampon de PCR (10X), 0,3 µL de *Taq polymérase* et 5 µL d'ADN purifié.

Le programme d'amplification était le même pour les 4 gènes. La prédénaturation a été effectuée à 94 °C pendant une minute, suivie de 28 cycles comprenant une dénaturation à 92 °C pendant 30 secondes, une hybridation à 55 °C pendant 30 secondes et une élongation à 72 °C pendant 30 secondes et une dernière extension à 72 °C pendant 7 minutes.

**Tableau V: Caractéristiques des amorces des pour l'amplification des gènes *fucK*, *IgA*, *ompP2* et *hpd* (Deghmane *et al.*, 2019).**

Gène	Amorce	Séquence 5'-3'	Taille (pb)	Taille des amplicons (pb)
Fuculose kinase (Emma Meats <i>et al.</i> , 2003)	<i>fucK_For</i>	ACCACTTTCGGCGTGGATGG	20	560
	<i>fucK_Rev</i>	AAGATTTCCCAGGTGCCAGA	20	
Protéase immunoglobuline A (Vitovski <i>et al.</i> , 2002)	<i>IgA_For</i>	GTTCCACCACCTGCGCCTGCTAC	23	1257
	<i>IgA_Rev</i>	GTTATATTGCCCTCGTTATTCA	23	
Protéine de la membrane externe (Binks <i>et al.</i> , 2012)	<i>ompP2_For</i>	G TTCACGTTTCCACATTAAGC	22	186
	<i>ompP2_Rev</i>	CACGACCAAGTTTTACTTCAC	21	
Protéine D (Wang <i>et al.</i> , 2011)	<i>hpd_For</i>	GGTTAAATATGCCGATGGTGTG	23	151
	<i>hpd_Rev</i>	TGCATCTTTACGCACGGTGTA	21	
Protéine de la membrane externe	<i>ompP2_For</i>	ATAACAACGAAGGGACTAACG	21	997
	<i>ompP2_Rev</i>	ACCTACACCCACTGATTTTTC	21	

#### II.3.5.4 Analyse des produits PCR: électrophorèse

L'électrophorèse sur gel des produits de PCR conventionnelle est la méthode standard pour analyser la qualité de la réaction et le rendement.

##### II.3.5.4.1 Principe d'électrophorèse

Elle consiste à séparer les particules chargées les unes des autres en fonction des différences de vitesse de migration sous l'effet d'un champ électrique généré entre deux électrodes (anode et cathode). En raison du potentiel électrique entre ces deux électrodes, les acides nucléiques chargés négativement migrent vers l'anode chargée positivement. La distance parcourue étant fonction de la charge et du poids moléculaire.

##### II.3.5.4.2 Mode opératoire

Dans un gel d'agarose à 2% ou 3% additionné de *gel green* ou de bromure d'éthydiuim (révélateur) préalablement préparé et coulé dans une cuve d'électrophorèse (ABgene), 8 µL de chaque produit d'amplification ont été mélangés à 4 µL de tampon de dépôt et ont été déposés



dans les différents puits du gel. Après une migration à 120 volts pendant 60 minutes, le gel a été photographié sous UV à l'aide d'un transilluminateur. La migration des amplicons (marqueur de poids moléculaire, échantillons, contrôles positifs et négatifs) était faite en parallèle avec celle du marqueur de poids moléculaire (ABgene, Electro-Fast® Marker).

#### **II.3.5.4.3 Interprétation**

Une espèce était considérée comme *H. influenzae* lorsque le gène *ompP2* était amplifié ou les trois gènes *fucK*, *hpd* et *iga* amplifiés simultanément. Les autres espèces considérées non *H. influenzae* étaient négatives aux gènes *ompP2*, *fucK* et/ou *hpd* (Theodore *et al.*, 2012) (Annexe 15)

#### **II.3.6 Séquençage du génome entier**

La technologie Illumina a été utilisée pour le séquençage du génome entier.

##### **II.3.6.1 Principe du séquençage Illumina**

Le séquençage de Illumina est une technique utilisée pour déterminer l'ordre des nucléotides dans l'ADN, également appelé séquençage d'ADN. Cette méthode de séquençage utilise des colorant-terminateurs réversibles qui permettent l'identification de bases simples lorsqu'elles sont introduites dans des brins d'ADN. Ici, les molécules d'ADN sont hybridées à des oligonucléotides qui sont liés à la surface de verre recouverte de polymère d'une cellule de flux. Les matrices sont amplifiées par les enzymes et les réactifs en écoulement dans les canaux de la cellule de débit. Une fois amplifiées, ces molécules forment des groupes d'amplicons, chacun d'entre eux étant dérivé d'une molécule matrice unique. Les grappes sont ensuite utilisées comme matrices pour le séquençage par synthèse à l'aide de désoxyribonucléotides à terminaison réversible fluorescente (Quail *et al.*, 2009).

##### **II.3.6.2 Extraction du culot d'ADN génomique**

Avec 3 mL de tampon phosphate 0,15 M, pH 7,2, une suspension bactérienne d'une densité optique (D.O= 1) a été préparée à l'aide d'un densitomètre (*Ultrospec 10 cell density meter*, Amersham Biosciences). Deux mL de la suspension 1 D.O ont été transférés dans un tube Eppendorf de 2 mL et centrifugés à 13000 tours/minute pendant 5 minutes. Après centrifugation, le surnageant a été éliminé et le culot constituant l'ADN génomique était conservé à -20°C en attendant le séquençage du génome entier.

### II.3.6.3 Mode opératoire du séquençage Illumina

L'ADN génomique a été extrait avec le système MagNA Pure 96 (Roche Molecular System, Pleasanton, USA). La préparation de la banque de séquençage a été réalisée avec le kit de préparation de la banque d'ADN Nextera® XT (Illumina, San Diego, États-Unis) et le séquençage du génome entier a été effectué avec la technologie Illumina (NextSeq 500, Illumina) avec des brins à extrémités appariées de 150 pb et une profondeur de séquençage de 50X (Quail *et al.*, 2009). Tous les assemblages *de novo* ont été générés à l'aide de SPA des 3.10 (CAB, Université d'État de Saint-Petersbourg, Russie). Les séquences sont disponibles sur la base de données PubMLST <https://pubmlst.org/hinfluenzae/> (Jolley *et al.*, 2018). Les données de séquençage du génome entier ont été utilisées pour les différentes analyses moléculaires.

### II.3.7. Identification des espèces *Haemophilus* par BLAST et par *ribosomal Multilocus Sequence Typing*

Le génome entier de chaque isolat avait fait l'objet d'identification par BLAST dans le site *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI) et par *ribosomal Multilocus Sequence Typing* (rMLST) dans le site *Public databases for molecular typing and microbial genome diversity* (PubMLST).

Le BLAST du génome entier et des gènes *rpoB* et *gyrA* extraits dans la base de données PubMLST (<https://pubmlst.org/hinfluenzae/>) et soumis dans NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) où les scores d'identification étaient pris en considération pour les plus élevés.

L'identification des *Haemophilus* par rMLST était effectuée en soumettant le génome entier de chaque isolat séquençé dans la base PubMLST (<https://pubmlst.org/hinfluenzae/>) via l'outil *genome comparator*. Les 53 gènes codant pour les sous-unités protéiques du ribosome bactérien (gènes *rps*) obtenus ont été analysés avec l'outil SplitsTree4 (version 4.14.6) pour la sélection de l'espèce du genre *Haemophilus*.

### II.3.8 Analyse de la diversité génétique

Les caractéristiques phylogénétiques des *Haemophilus* ont été évaluées à partir d'arbres phylogénétiques pour tous les isolats. Les sept gènes de ménage connus d'*Haemophilus influenzae* ont été recherchés: l'adénylate kinase (*adk*), la sous-unité Gamma (*atpG*) de l'ATP synthétase F1, la fumarate réductase *iron sulphur protein* (*frdB*), la fuculokinase (*fucK*), la malate déshydrogénase (*mdh*), glucose-6-phosphate isomérase (*pgi*), protéine recA (*recA*).

Les données de séquençage du génome entier ont été utilisées pour déduire les *sequences types* (ST) conformément au schéma Multilocus Sequence Typing (MLST) (E. Meats *et al.*, 2003). Les données de séquençage du génome entier ont également été analysées à l'aide d'une approche «gène par gène» utilisant la souche de référence annotée (Rd KW20) sur la Base de données BIGSdb (Bacterial Isolate Genome Sequence Database) sur PubMLST (Jolley & Maiden, 2010).

SplitsTree4 (version 4.14.6) a été utilisé pour visualiser les matrices de distance résultantes sous forme de réseaux phylogénétiques (*Neighbour-net networks*) (Huson & Bryant, 2006) pour tous les isolats à partir de l'alignement des séquences protéiques des gènes *ftsI*, *gyrA* et *rpoB*. Les alignements multiples des protéines déduites des gènes *rpoB*, *gyrA* et *ftsI* ont été réalisés avec Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

L'arbre *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) des séquences de *H. influenzae* a été construit à partir des sept loci MLST et a également permis la comparaison de profils alléliques pour les isolats avec des données complètes de MLST. L'ensemble des isolats de *H. influenzae* a été analysé en utilisant "*Gene Comparator*" sur le site PubMLST sur la base du génome entier contre les loci de la souche de référence Rd KW20.

### **II.3.9 Analyses statistiques**

La spécificité analytique a été définie comme étant la capacité du test à distinguer les organismes cibles des organismes non cibles en fonction des techniques d'identification des *Haemophilus*. Le coefficient Kappa de Cohen avec un intervalle de confiance à 95% a été calculé pour décrire dans quelle mesure le rMLST était en accord avec les autres techniques d'identification. Les valeurs de Kappa ont été interprétées comme suit: Kappa = 0,00-0,20, accord faible; Kappa = 0,21-0,40, accord équitable; Kappa = 0,41-0,60, accord modéré; Kappa = 0,61-0,80, bon accord; Kappa = 0,81-1,00, accord presque parfait (Landis & Koch, 1977).

La recherche de relation entre les ST générées dans cette étude et les ST existant dans la base de données mondiale MLST a été évaluée à l'aide de l'eBURST. Les ST générées par MLST ont été soumises à l'analyse eBURST dans le logiciel PhyloViz 2.0 afin de les affecter aux complexes clonaux (Feil *et al.*, 2004; Francisco *et al.*, 2009; Ribeiro-Gonçalves *et al.*, 2016). L'indice de diversité de Simpson qui mesure la diversité entre les isolats a été calculé dans PhyloViz. La plage de cet indice est comprise entre 0 et 1. Des scores élevés (près de 1) indiquent une grande diversité tandis que des scores faibles (proches de 0) indiquent une faible diversité.

## II.4 SÉROTYPAGE D'*Haemophilus influenzae*

Les sérotypes ont été déterminés biochimiquement (séro-agglutination) et confirmés par l'amplification (PCR) des gènes capsulaires et la comparaison des séquences cibles extraites du génome entier.

### II.4.1 Séro-agglutination des isolats d'*Haemophilus influenzae*

#### II.4.1.1 Principe

Le sérotypage par agglutination implique une réaction dans laquelle un antigène du microorganisme réagit avec l'anticorps correspondant. Cette réaction *in vitro* entraîne une formation d'agrégats macroscopiques appelée agglutination. La réaction homologue souhaitée doit être rapide et créer une liaison forte (affinité élevée) présentant une réversibilité faible (avidité élevée). Comme l'antigène du microorganisme peut agglutiner un anticorps produit en réponse à une infection par d'autres espèces bactériennes, des réactions hétérologues sont possibles. De telles réactions inattendues voire imprévisibles peuvent entacher d'incertitude l'identification sérologique. Une réaction d'agglutination homologue positive doit concorder avec l'identification du microorganisme sur la base de ses caractéristiques biochimiques et morphologiques (BD, 2016).

#### II.4.1.2 Précautions ou conditions préopératoires

Avant d'utiliser le réactif *ImmuLex<sup>TM</sup>* (SSI Diagnostica, Danemark), les antisera étaient sortis du réfrigérateur afin qu'ils s'équilibrent à la température ambiante (25°C) avant de procéder aux tests. Une colonie de *H. influenzae* était mise en suspension dans 200 µL de tampon phosphate salin (pH 7,4).

#### II.4.1.3 Test d'auto-agglutination de l'isolat

À l'aide d'un enseigneur, il a été prélevé une pleine anse de culture bactérienne (de 18 à 24 heures) à analyser de la gélose au chocolat et transféré dans une goutte (environ 35 µl) de solution saline (NaCl) stérile à 0,85 %, le tout sur une lame propre stérile. La lame a été agitée pendant une minute par un mouvement de rotation pour observer si une réaction d'agglutination se produisait. Si une agglutination se produisait (auto-agglutination), la culture n'était pas pure et ne pouvait pas être testée. Elle était reisolée sur gélose au chocolat, incubée et testée de nouveau le lendemain. Si aucune réaction d'auto-agglutination n'était observée, le test de séro-agglutination des *Haemophilus influenzae* pouvait être réalisé.

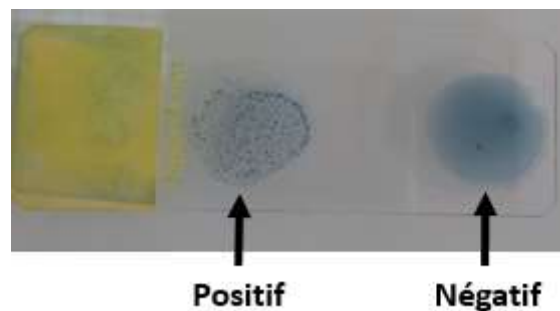
#### II.4.1.4 Test d'agglutination

Une identification sérotypique présomptive des isolats de culture avec le réactif *ImmuLex™ H. influenzae Polyvalent antiserum* a été effectuée puis à des tests avec les 6 antiséras monospécifiques (sérotypes *a*, *b*, *c*, *d*, *e* et *f*) pour les cas positifs à l'identification présomptive.

Une goutte du réactif *ImmuLex™ H. influenzae antiserum* à tester était déposée sur une lame à agglutination et à l'aide d'une micropipette, 10 µL de suspension bactérienne à analyser était transférée dans la goutte d'antisérum et bien mélangée avec un bâtonnet stérile à usage unique. La lame était agitée par un mouvement circulaire pour observer si une réaction d'agglutination se produisait.

#### II.4.1.5 Lecture et interprétation

S'agissant des isolats à tester, une agglutination constituait un résultat positif si cela se produisait dans les 20 secondes (Figure 13). Toute agglutination après 30 secondes était considérée comme une réaction négative.



**Figure 13: Test de séro-agglutination des isolats d'*Haemophilus influenzae***

De gauche à droite, une réaction positive et une réaction négative.

Les antiséras étaient immédiatement rangés au réfrigérateur (+4 °C) après usage pour éviter la perte d'activité de liaison des anticorps.

#### II.4.2 Identification du type capsulaire des *Haemophilus influenzae* par PCR

La nature typable ou non de tous les isolats était confirmée par PCR. La présence ou non du gène à la fois spécifique au gène de transport de la capsule *bexA* et le sérotype (ou type capsulaire) était confirmée par PCR en utilisant des amorces décrites par Falla *et al.* (tableau VI) (Falla *et al.*, 1994). La présence le gène *bexA* déterminait qu'un isolat était capsulé. Des

amplifications ultérieures étaient effectuées ensuite pour déterminer la présence de chacun des six types de capsule individuellement (sérotypes *a*, *b*, *c*, *d*, *e* et *f*).

#### **II.4.2.1 Mode opératoire N°1**

Les amorces spécifiques au type capsulaire ont été utilisées (tableau VI): *bexA*, *hia*, *hib*, *hic*, *hid*, *hie* et *hif*. Un total de 50 µL de mélange réactionnel par échantillon a été préparé qui comprenait 25,2 µL d'eau distillée stérile, 2 µL de dNTP (5 µM), 2,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 5 µL de chacune des amorces sens et anti-sens (10 µM), 5 µL de tampon de PCR (10X), 0,3 µL de *Taq polymérase* et 5 µL d'ADN extrait.

Un isolat non typable (non capsulé) de *H. influenzae* a été utilisé comme contrôle négatif et des souches capsulées de *H. influenzae* correspondantes ont été utilisées comme témoins positifs. L'amplification selon chaque séquence cible était commune comme suit: la dénaturation initiale a été effectuée à 94 °C pendant 5 minutes, suivie de 35 cycles comprenant une dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes, une hybridation à 50 °C pendant 30 secondes et une élongation à 72 °C pendant 1 minute et une dernière extension à 72 °C pendant 7 minutes.

#### **II.4.2.2 Mode opératoire N°2**

Les résultats de cette amplification ont été confirmés par un deuxième protocole (Tableau VI).

Un total de 35,3 µL de mélange réactionnel par échantillon a été préparé qui comprenait 16,03 µL d'eau distillée stérile, 4,29 µL de dNTP (5 mM), 4,29 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,86 µL DMSO, 0,13 µL de chacune des amorces sens et anti-sens (100 µM), 4,29 µL de tampon de PCR (10X), 0,3 µL de *Taq polymérase* et 5 µL d'ADN purifié.

L'amplification selon chaque séquence cible était commune comme suit: la dénaturation initiale a été effectuée à 94 °C pendant une minute, suivie de 28 cycles comprenant une dénaturation à 92 °C pendant 30 secondes, une hybridation à 55 °C pendant 30 secondes et une élongation à 72 °C pendant 30 secondes et une dernière extension à 72 °C pendant 7 min.

**Tableau VI: Caractéristiques des amorces des types capsulaires et des amplicons**

<b>Cible (Type capsulaire)</b>	<b>Amorce</b>	<b>Sequence (5'-3')</b>	<b>Taille (pb)</b>	<b>Taille des amplicons (pb)</b>
<i>bexA</i>	<i>bexA1 For</i>	CGTTTGTATGATGTTGATCCAGAC	24	342
	<i>bexA1 Rev</i>	TGTCCATGTCTTCAAAATGATG	22	
	<i>bexA H11 For</i>	GTCGTTTGTATGATGTTGATC	21	
	<i>bexA H12 Rev</i>	GCTTTGTCCATGTCTTCAAAA	21	
Sérotype a ( <i>hia</i> )	<i>hia For</i>	CTACTCATTGCAGCATTTC	20	285
	<i>hia Rev</i>	GAATATGACCTGATCTTCTG	20	
Sérotype b ( <i>hib</i> )	<i>hib For</i>	GCGAAAGTGAACCTTATCTCTC	23	482
	<i>hib Rev</i>	GCTTACGCTTCTATCTCGGTGAA	23	
Sérotype c ( <i>hic</i> )	<i>hic1 For</i>	TCTGTGTAGATGATGGTTCA	20	390
	<i>hic1 Rev</i>	CAGAGGCAAGCTATTAGTGA	20	
	<i>hic2 For</i>	TCTGTGTAGATGATGGGTCA	20	
	<i>hic2 Rev</i>	CAGAGGCAAGCTATTAGTGA	20	
Sérotype d ( <i>Hid</i> )	<i>hid For</i>	TGATGACCGATAACAACCTGT	20	146
	<i>hid Rev</i>	TCCACTCTTCAAACCATTCT	20	
Sérotype e ( <i>Hie</i> )	<i>hie1 For</i>	ACTAAAATATGGCCCAAACCCAC	23	588
	<i>hie1 Rev</i>	CCGATGAGCCCAAGTATGATGA	22	
	<i>hie2 For</i>	TTTGGTAACGAATGTAGTGGTAG	23	
	<i>hie2 Rev</i>	ATAGCTTTACTGTATAAGTCTAG	23	
Sérotype f ( <i>Hif</i> )	<i>hif For</i>	GCTACTATCAAGTCCAAATC	20	456
	<i>hif Rev</i>	CGCAATTATGGAAGAAAGCT	20	

For : Brin sens ; Rev : Brin anti-sens

#### **II.4.2.3 Révélation**

Après amplification, 8  $\mu$ L de l'amplicon ont été mélangés à 5  $\mu$ L de tampon de charge (1X) pour l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% préparé avec du *gel green*. La visualisation a été réalisée sous transilluminateur UV (marque) et la taille des différentes cibles sont celles rapportées dans le tableau VI (voir annexe 15 pour les gels d'électrophorèse).

#### **II.4.3 Analyses statistiques**

La distribution des variables catégorielles a été comparée en utilisant le test du Khi-deux de Pearson. Ce test a été utilisé pour évaluer l'association entre le type capsulaire et les paramètres sociodémographiques et cliniques. Les variables catégorielles ont été exprimées sous forme de fréquence tandis que les variables quantitatives ont été exprimées sous forme de médiane avec écart interquartile (EI). La valeur seuil de significativité a été fixée à 0,05.



## II.5 ANTIBIOGRAMMES ET ANALYSES DES MODIFICATIONS MOLÉCULAIRES ASSOCIÉES À LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

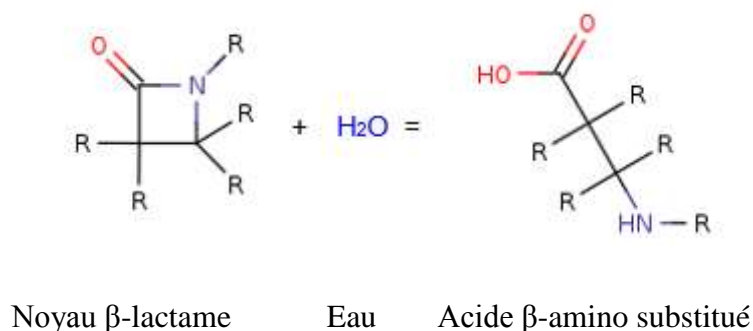
La sensibilité des isolats d'*Haemophilus* aux antibiotiques était testée par la méthode de diffusion ou méthode des disques sur gélose Muller Hinton au sang de cheval défibriné 5% (MHF) et additionnée de  $\beta$ -nicotinamide adénine dinucléotide ( $\beta$ -NAD) à 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en suivant les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM/EUCAST) ((CASFM), 2015). Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées à partir des *Epsilon* tests (E-tests). L'activité céfinase a également été recherchée.

### II.5.1 Détermination de l'activité bêta-lactamase (céfinase)

Les disques de céfinase sont destinés à être utilisés dans le dépistage rapide des colonies isolées de plusieurs bactéries parmi lesquelles les *Hameophilus* pour la production de bêta ( $\beta$ )-lactamase (EC 3.5.2.6).

#### II.5.1.1 Principe

L'activité  $\beta$ -lactamase consiste à une hydrolyse de la liaison amide dans le cycle bêta-lactame des  $\beta$ -lactamines (pénicillines et céphalosporines) et il en résulte une résistance à ces antibiotiques. Certaines bactéries ont la propriété de produire des enzymes capables d'inactiver les antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines. La production de ces enzymes est très souvent le signe d'une résistance aux  $\beta$ -lactamines. Le réactif céfinase est constitué de disque de papier imprégné de céphalosporine chromogène (la nitrocéfine), qui présente un changement de couleur très rapide du jaune au rouge dû au fait que la liaison amide dans le cycle  $\beta$ -lactame est hydrolysée par une  $\beta$ -lactamase. Lorsqu'une bactérie produit une enzyme présente en quantités importantes, le disque de couleur jaune devient rouge dans la zone où l'isolat est étalé (Montgomery *et al.*, 1979; O'Callaghan *et al.*, 1972). La réaction enzymatique est la suivante :



### II.5.1.2 Mode opératoire

À l'aide d'une pince stérile sous un poste de sécurité microbiologique, le disque de nitrocéfine (bioMérieux) était retiré du flacon et placé sur une boîte de Pétri vide ou une lame propre afin que le disque revienne à la température ambiante. Les autres disques inutilisés restant étaient rangés immédiatement dans le congélateur (-20°C). Le disque de nitrocéfine était humidifié avec de l'eau déminéralisée stérile (eau distillée). À l'aide d'une oëse stérile, quelques colonies isolées de culture de 18 à 24 heures d'*Haemophilus* étaient prélevées et étalées sur la surface du disque.

### II.5.1.3 Lecture et interprétation

Une coloration rouge-violacée se développait plus ou moins rapidement (en général une minute) pour les isolats ayant une activité  $\beta$ -lactamase (réaction positive). La réaction était considérée comme négative si aucune coloration n'apparaissait au bout d'une heure (Figure 14).

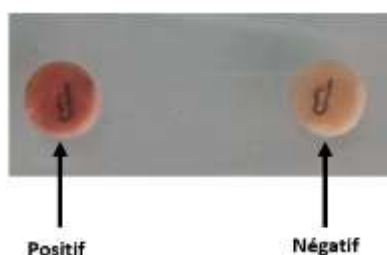


Figure 14: Activité  $\beta$ -lactamase

## II.5.2 Test de sensibilité des *Haemophilus* par la méthode de diffusion

### II.5.2.1 Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture visible du prélèvement réalisée sur milieu chocolat-polyvitex, il a été réalisé une suspension bactérienne en solution salée (NaCl 0,85% Medium) à l'aide d'un densitomètre (Densimat BioMérieux) pour obtenir une dilution densité égale à 0,5 McFarland, ce qui correspondait à un inoculum d'environ  $2 \times 10^7$  colonies formant une unité (CFU)/mL. Pour ce faire, il a été prélevé plusieurs colonies de même morphologie afin d'éviter de sélectionner un variant atypique. Ces colonies ont été mises en suspension en milieu salé avec une oëse stérile ou un écouvillon en coton. L'ajustement de la densité bactérienne au tube 0,5 McFarland, se faisait par ajout soit de la solution saline ou soit des bactéries. L'EUCAST recommande un inoculum de densité de 0,5 McFarland. Cependant, il peut être utile si la lecture de l'antibiogramme est difficile en raison de la densité bactérienne de répéter

l'analyse avec un inoculum 0,5 McFarland dilué au 1/50<sup>ème</sup> (soit 200 µL de l'inoculum 0,5 McFarland dans 4,8 mL d'eau distillée stérile) ; ce qui a été fait.

### **II.5.2.2 Ensemencement de la gélose**

L'inoculum bactérien doit idéalement être employé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation. Son emploi doit être fait au plus tard dans les 60 minutes qui suivent sa préparation. Les ensemencements étaient faits par étalement ou par inondation des milieux de culture. Par étalement, le coton tige était immergé dans la suspension, essoré, puis des stries parallèles (angle de 60° x 3) étaient réalisées à partir de la dilution 0,5 McFarland sur la gélose MHF-β-NAD. Par inondation, l'inoculum 0,5 McFarland dilué au 1/50<sup>ème</sup> était utilisé pour couvrir le milieu de culture et l'excès de liquide était éliminé à l'aide de pipettes Pasteur sur les parois des boîtes de Pétri inclinées sous la hotte. Le dépôt des disques d'antibiotiques ou des bandelettes E-tests ne se faisait que lorsque les boîtes ensemencées étaient bien sèches.

### **II.5.2.3 Dépôt des disques imprégnés d'antibiotique et des bandelettes E-test**

Les disques ou les bandelettes E-tests ont été déposés fermement à la surface de la gélose inoculée et séchée, à l'aide d'une pince stérilisée. Le contact avec la surface de la gélose devait être étroit. Les disques une fois déposés ne pouvaient être déplacés à cause de la diffusion très rapide des antibiotiques. Un maximum de six disques ou de 2 bandelettes E-tests convenait pour les boîtes de pétri de 90 mm de diamètre.

Les antibiotiques (structures en Annexe 16) utilisés étaient: ampicilline (API2, 2 µg), l'amoxicilline+Acide clavulanique (AMC2 / 1, 20/10 µg), céfotaxime (CTX30, 30 µg), ceftriaxone (CRO30, 30 µg), chloramphénicol (CHL30, 30 µg), ciprofloxacine (CIP5, 5 µg), acide nalidixique (NAL30, 30 µg), céfuroxime (CXM30, 30 µg), triméthoprim/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole) (SXT25, 25 µg), gentamicine (GEN15, 15 µg), tétracycline (TET30, 30 µg), rifampicine (RIF30, 30µg), érythromycine (ERY15, 15 µg), triméthoprim (TMP5, 5µg) et sulfonamide (SSS, 300µg).

**Remarque :** Les CMI E-tests étaient déterminées en fonction de la présence ou de l'absence de l'activité β-lactamase des isolats d'*Haemophilus*. Ainsi pour les isolats β-lactamases positives, les CMI pour ceftriaxone (CRO), céfotaxime (CTX) et amoxicilline/acide clavulanique (XL) ont été déterminées. Pour les isolats β-lactamases négatives, les CMI d'amoxicilline et céfotaxime ont été déterminées.

#### II.5.2.4 Incubation des boîtes de Pétri

Les boîtes de Pétri ont été retournées et incubées idéalement dans les 15 minutes qui suivaient le dépôt des disques, sans dépasser 30 minutes. Si elles étaient abandonnées à température ambiante après dépôt des disques, la pré-diffusion des antibiotiques pouvait engendrer des zones d'inhibition faussement agrandies. L'incubation des boîtes était faite à  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  en présence de 4 à 6%  $\text{CO}_2$  en aérobiose pendant 16 à 24 heures.

#### II.5.2.5 Lecture des boîtes après incubation

Un inoculum et un ensemencement corrects devaient conduire à une culture confluyente. La culture devait être répartie sur toute la surface de la gélose de façon à obtenir des zones d'inhibition circulaire (voir figure 15).

La bordure de la zone d'inhibition devait être lue à l'œil nu et au niveau de la complète inhibition de la culture ; la boîte étant placée à 30 cm de l'œil. Les diamètres des zones d'inhibition étaient mesurés au millimètre le plus proche avec un pied à coulisse.

#### II.5.2.6 Interprétation des résultats

L'interprétation des diamètres des zones d'inhibition a été faite par référence au CASFM (annexe 17 : concentrations critiques).

Les phénotypes de résistance aux différentes familles d'antibiotiques étaient déterminés sur la base des valeurs des diamètres d'inhibition des disques d'antibiotiques obtenus sur gélose MHF. Pour chacune des isolats d'*Haemophilus*, les résistances de haut niveau et celles de bas niveau (mono résistance) étaient déterminées vis-à-vis de l'ensemble des antibiotiques testés. La multi résistance était définie comme une résistance à au moins deux classes d'antibiotiques.

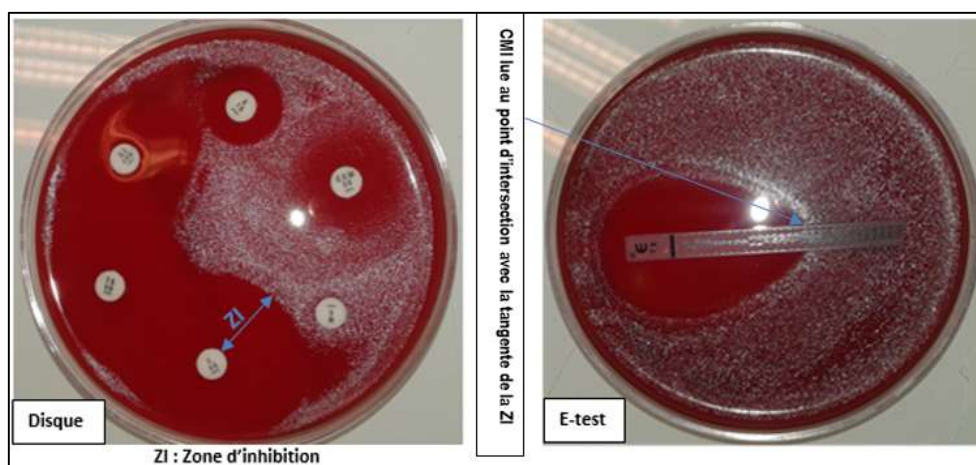


Figure 15: Inhibition de la croissance bactérienne

### **II.5.3 Conservation des isolats d'*Haemophilus***

Le nombre de cryotubes nécessaire était disposé dans un portoir, à raison de deux cryotubes par échantillon de culture des isolats sur gélose chocolat polyvitex à 35° C (18-24 heures). Ces isolats étaient conservés dans le bouillon cœur-cerveille avec 10% glycérol. Les références de chaque isolat à conserver étaient notées sur les cryotubes. A l'aide d'une anse stérile, il a été prélevé plusieurs colonies de la culture pure et introduite dans le milieu de conservation. Les tubes étaient ensuite bien refermés, rangés dans une boîte de congélation et conservés au congélateur à -80°C.

### **II.5.4 Analyse des modifications moléculaires associées des espèces *Haemophilus* à la résistance aux antibiotiques**

L'analyse mutationnelle visait à détecter les modifications génétiques impliquées dans la résistance aux antibiotiques des espèces *Haemophilus* isolées. Les séquences des gènes cibles extraits du génome entier (confère section II.3.6 *Séquençage du génome entier*) étaient utilisées pour déduire les séquences d'acides aminés des isolats résistants en les comparant à celles des isolats sensibles.

À partir des données de séquençage du génome entier, les mutations et séquences de gènes d'enzyme associées à la résistance aux antibiotiques ont été extraites du site web <http://pubmlst.org/hinfluenzae/> et <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Après extraction des séquences nucléotidiques des isolats sensibles et résistants, elles ont été traduites sur le site Web *EMBOSS: transeq-Bioinformatics* ([https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss\\_transeq/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/)) et alignées pour la recherche d'éventuelles mutations dans le site Web *Multiple Sequence Alignment - CLUSTALW – GenomeNet* (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>).

#### **II.5.4.1 Identification des mutations de la PLP3 des isolats d'*Haemophilus* résistants aux bêta-lactamines**

Pour les modifications associées à la résistance aux  $\beta$ -lactamines, trois approches étaient investiguées : la production de  $\beta$ -lactamases, les mutations du gène *ftsI* codant pour la protéine de liaison à la pénicilline 3 (PLP3) ou par une combinaison des deux mécanismes. L'un des mécanismes impliqué dans la résistance des *Haemophilus* aux bêta-lactamines est l'altération de la protéine de liaison à la pénicilline 3 (PLP3) résultant de mutations du gène *ftsI*. Pour identifier les mutations de la PLP3, cette portion a été extraite du génome entier. Lorsque le gène *ftsI* ne pouvait pas être extrait du génome entier, un fragment interne du gène *ftsI* a été

amplifié et séquencé par la méthode de Sanger. Le type de  $\beta$ -lactamases a été classé comme ROB-1 ou TEM-1 par des comparaisons de séquences d'ADN. Les mutations dans le gène *ftsI* codant pour PBP3 ont été déterminées par analyse de séquences.

#### II.5.4.1.1 Amplification du gène *ftsI*

Pour l'amplification du gène *ftsI*, un volume total de 50  $\mu$ L de mélange réactionnel par échantillon a été préparé. Le mélange comprenait : 31,2  $\mu$ L d'eau distillée stérile, 2  $\mu$ L de dNTPs (5  $\mu$ M de chacun), 5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2  $\mu$ L d'amorce sens et anti-sens (*ftsI*, 10  $\mu$ M) avec les caractéristiques du tableau VII, 0,3  $\mu$ L de *Taq polymérase* (High-fidelity), 5  $\mu$ L de tampon (10X) et 5  $\mu$ L d'extrait d'ADN.

**Tableau VII: Caractéristiques des amorces du gène *ftsI***

Amorce	Sequence (5'-3')*	Séquence cible <i>ftsI</i> **
<i>ftsIFor</i>	GTTC <sup>en vert</sup> CCAGTCACGACGTTGTAGTTAATGCGTAACCGTGCAATTAC	936-960
<i>ftsIRev</i>	TTGTGAGCGGATAACAATTTCACCACTAATGCATAACGAGGATC	1640-1617

\* Comprend la région adaptatrice (en vert) permettant la fixation des amorces de séquençage.

\*\* La numérotation des nucléotides se réfère à celle de la séquence *ftsI* de *H. influenzae* Rd KW20 (ATCC 51907), numéro d'accèsion L42023

For : séquence sens

Rev : séquence anti-sens

Le programme d'amplification était celui du tableau VIII ci-dessous:

**Tableau VIII: Programme d'amplification du gène *ftsI***

Etape	Température (°C)	Durée	Nombre de cycle
Dénaturation	94	3 minutes	/
Dénaturation	94	30 secondes	
Hybridation	50	30 secondes	10
Elongation	72	40 secondes	
Dénaturation	94	30 secondes	
Hybridation	60	30 secondes	30
Elongation	72	40 secondes	
Elongation	72	5 minutes	1
Finale			
Conservation	4	$\infty$	/

Une fois le programme terminé, les fragments amplifiés de taille **705 pb** ont été visualisés au transilluminateur UV après migration sur gel d'agarose 1% (30 minutes à 90 volts).

#### **II.5.4.1.2 Purification des produits d'amplification du gène *ftsI***

Sur la plaque de 96 puits d'ultrafiltration (par centrifugation *Millipore Multiscreen™ Assay System*), 300 µL de gel de sépharose CL-6B ont été déposés par puit. Une centrifugation à 1500 tours/minutes pendant 3 minutes (Eppendorf Centrifuge 5810R) a été faite sur une plaque poubelle. Après centrifugation, la plaque poubelle a été vidée et remplacée par une plaque de 96 puits neuve (ABgene Thermo-Fast® 96 Detection plate). Les amplicons ont été déposés sur le gel de sépharose de la plaque 96 puits et une autre centrifugation pendant 3 minutes à 1500 tours/minutes a été faite. L'éluat recueilli dans la plaque *ABgene Thermo-Fast® 96* a été soumis au séquençage *Sanger*.

#### **II.5.4.1.3 Séquençage *Sanger***

##### **II.5.4.1.4 Principe**

C'est un séquençage de première génération pour déterminer la succession des nucléotides composant l'ADN. Il repose sur l'allongement d'un brin d'ADN complémentaire par l'ADN polymérase, en présence d'un brin d'ADN matrice, de 4 désoxyribonucléosides triphosphates (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), d'un oligonucléotide (amorce) hybridé au brin matrice et d'un analogue didésoxyribonucléotide (ddNTP). Lorsqu'un ddNTP est incorporé par la polymérase, celui-ci agit comme un terminateur de chaîne, bloquant tout allongement ultérieure. Cette incorporation se produit de manière aléatoire, avec une fréquence dépendant du rapport de la concentration du ddNTP sur celle du dNTP correspondant (Ahakoud, 2015).

##### **II.5.4.1.5 Mode opératoire**

Les amorces de concentrations 1 µM pour le séquençage étaient les suivantes :

*Seq-ftsI For*            5'-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA-3'  
*Seq-ftsI Rev*            5'-TTGTGAGCGGATAACAATTTC-3'

Le mélange réactionnel de volume total de 20 µL pour le séquençage utilisant le *BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit* par échantillon comprenait 7,8 µL d'eau distillée, 3,2 µL de chacune des amorces, 3 µL de tampon de PCR (5X), 2 µL de *BigDye V3.1* et 4 µL d'éluat (amplicon *ftsI* purifié, quantité minimum de 20 ng).

### II.5.4.1.6 Amplification

Le programme d'amplification de la portion du gène à séquencer a été établi selon le tableau IX ci-dessous :

**Tableau IX: Programme d'amplification de la portion du gène *ftsI* à séquencer**

Etape	Température (°C)	Durée	Nombre de cycle
Dénaturation	96	1 minute	/
Dénaturation	96	10 secondes	
Hybridation	50	5 secondes	25
Elongation	60	4 minutes	
Refroidissement	4	∞	/

### I.5.4.1.7 Purification des produits de séquençage

Le kit de nettoyage *clean-up kit*, NucleoSEQ® (Macherey-Nagel.) a été utilisé pour la purification des produits d'amplification destinés aux réactions de séquence.

#### II.5.4.1.7.1 Principe de base

Les colonnes de NucleoSEQ® sont conçues pour la purification rapide et efficace des acides nucléiques. L'utilisation d'un gel d'exclusion dans un format de colonne de centrifugation pratique permet l'élimination fiable des plus petites molécules des acides nucléiques. Les impuretés, par exemple, des sels, un excès de marqueur, des nucléotides, des traces de solvants organiques, les amorces sont retenues par la colonne tandis que les acides nucléiques d'intérêt sont récupérés avec un rendement élevé. Les colonnes sont pré-remplies avec une matrice d'exclusion de taille (Macherey-Nagel, 2017).

#### II.5.4.1.7.2 Mode opératoire

Il était recommandé de ne pas utiliser plus de 1–2 µL de *Big Dye® Ready reaction mix* dans une réaction de séquençage de 20 µL afin d'éviter de surcharger la colonne.

Les colonnes NucleoSEQ® étaient centrifugées à 750 g pendant 30 secondes pour recueillir la matrice de gel sec au fond de la cartouche. Six cent µL d'eau distillée y étaient ajoutées et il s'en suivait un vortexage pour hydrater la matrice de gel. Les bulles d'air produites étaient éliminées en vortexant ou en tapotant la colonne. L'ensemble était incubé au moins 30 minutes ou pendant une nuit pour hydrater la matrice de gel. L'incubation pouvait être réalisée à température ambiante ou à 4 °C. Les colonnes hydratées pouvaient être conservées à 4 °C pendant 14 jours maximum.



La matrice de gel établie était resuspendue en inversant ou en vortexant la colonne d'essorage à plusieurs reprises. Les bulles d'air ne devaient pas être visibles à cette étape. Le bouchon inférieur était retiré et la colonne d'essorage était placée dans un tube collecteur (fourni avec le kit). La colonne dans le tube collecteur (la charnière du couvercle des colonnes d'essorage doit être orientée vers l'extérieur du rotor) était centrifugée à 750 g pendant 2 minutes pour éliminer le tampon de stockage restant. Après centrifugation, le tube collecteur avec le tampon de stockage était jeté et la colonne d'essorage était placée dans un tube Eppendorf de 1,5 mL pour la collecte. À l'aide d'une micropipette, 20 µL d'échantillon étaient soigneusement chargés goutte à goutte au centre de la résine en gel sans l'endommager et centrifugés pendant 4 à 6 minutes à 750 g. À cette étape, l'échantillon était séché ou utilisé directement en l'introduisant dans le séquenceur.

#### **II.5.4.1.8 Electrophorèse capillaire (séquenceur)**

Le séquenceur était mis à la température sélectionnée pendant au moins 30 minutes avant le début d'une série d'analyse. Puis les 20 µL des produits de la purification des réactions de séquence étaient introduits dans les puits appropriés sur la plaque créée qui était liée à une série dans le séquenceur et le programme était démarré.

#### **II.5.4.1.9 Analyse des séquences et soumission des données**

Les séquences *fstI*<sub>int</sub> étaient comparées entre elle et à celle de la souche de référence Rd KW20. Avant de télécharger (introduire) dans le site Web **PubMLST.org**, les séquences étaient coupées en un fragment de 621 pb correspondant aux nucléotides 977-1597 de la séquence *fstI* pour les *Haemophilus influenzae* exclusivement.

#### **II.5.4.2 Recherche des mécanismes moléculaires de la résistance aux fluoroquinolones**

Les mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones ont été extraites des gènes *gyrA*, *parC* et *parE*, régions déterminant la résistance aux quinolones (QRDR).

#### **II.5.4.3 Recherche des mécanismes moléculaires de la résistance aux rifamicines**

Les mutations associées à la résistance à la rifampicine (mutations aux positions 516 et 518) ont été recherchées au niveau du gène *rpoB*.

#### II.5.4.4 Recherche des mécanismes moléculaires de la résistance aux phénicolés

Pour la résistance au chloramphénicol, les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance bactérienne sont la production de la chlotamphénicol acétyltransférase, la mutation au niveau de la sous-unité ribosomale 50S et la réduction de la perméabilité membranaire. Le gène responsable de la production de l'enzyme chloramphénicol acétyl-transférase (*cat*) dont la séquence nucléotidique *NC\_011409.1* (642 pb) ci-dessous a été recherché :

```
>NC_011409.1:c18211-17570 Haemophilus influenzae plasmid ICEhin1056, complete sequence  
ATGAATTTTACCAGAATTGATCTGAACACCTGGAACCGCAGAGAACATTTTGCTCTTTATCGTCAGCAGATAAAA  
TGCGGATTCAGCCTGACCACAAAACCTCGATATTACAGCTTTGCGTACCGCACTGGCGGAAACGGATTATAAATTT  
TATCCGGTGATGATTTTATCTGATCTCCCGGGTTGTTAATCAGTTTCCGGAGTTCCGGATGGCAATGAAAGATAAT  
GCACTGATTTACTGGGATCAGACCGATCCTGTATTTACTGTTTTTCATAAAGAGACTGAAACATTTTCTGCGCTC  
TTCTGCCGTTATTGTCCGGATATCAGTGAATTTATGGCGGGCTATAATGCGGTGATGGCAGAATATCAGCATAAT  
ACTGCATTGTTCCCGCAGGGAGCGTTACCAGAGAACCACCTGAATATATCATCATTACCCTGGGTGAGTTTTGAC  
GGATTTAACCTGAATATCACCAGTAATGATGATTATTTTGCTCCGGTGTACTATGGCGAAGTTTCAGCAGGAA  
GATAACCGCGTATTATTACCTGTTTCTGTACAGGTACATCATGCCGTTTGTGATGGCTTTCATGCAGCCAGGTTT  
ATTAATACACTTCAGATGATGTGTGATAACATACTGAAATAA
```

Les séquences nucléotidiques de la sous unité 50S ont été extraites des isolats sensibles et résistants, et comparées à la séquence *NC\_000907.1* ci-dessous utilisée comme référence pour investiguer les mutations :

```
>NC_000907.1:1396043-1396396 Haemophilus influenzae Rd KW20 chromosome, complete genome  
ATGGCTCGTGAAAACGTGGTGTTATTGCAAGAGCAGCCATAAGAAAGTTCTTAAGGCTGCTAAAGGTTATTAT  
GGTGCACGTTTCACGCGTGTATCGCGTTGCTTTCCAAGCGGTGATCAAAGCTGGTCAATACGCATACCGTGACCGT  
CGTCAGCGTAAACGTCAATTCCGTCAATTATGGATTGCACGTATCAACGCTGCAGCGCGTCAAAATGGTTTATCT  
TATAGCAAATTTATCAACGGCTTGAAAAAAGCATCTGTTGAAATCGACCGTAAGATTCTTGCTGATATCGCTGTA  
TTCGACAAAGTAGCGTTTCGCTGCATTAGTTGAAAAAGCAAAATCTGCACCTTAA
```

#### II.5.4.5 Recherche des mécanismes moléculaires de la résistance aux macrolides

Les isolats ont été étudiés pour rechercher la présence de gènes conférant une résistance aux macrolides [*erm* (A), *erm* (B), *mef* (A) et *ere* (A)], et les mutations dans les gènes codant pour les protéines ribosomales L4 et L22 et le domaine V de l'ARNr 23S. Concernant le mécanisme de résistance impliquant le domaine V de l'ARNr 23S, les séquences nucléotidiques ribosomales de l'ARN 23S ont été comparées pour la mutation de résistance aux macrolides comme 2058A → G (Ammar *et al.*, 2016; Peric *et al.*, 2003; Vester & Douthwaite, 2001). Les gènes de résistance communs aux macrolides *erm* (B), *mef* (A) et *ere* (A) ont également été recherchés. Ci-dessous l'ensemble des séquences nucléotidiques des gènes extraits et/ou recherchés dans le génome entier :

**>KT819626.1 Haemophilus parainfluenzae strain RK 24 macrolide-efflux protein A (mefA) gene, partial cds**

GCAGTATCATTAACTACTAGTGCCATCCTGCAAATGGCGATTATTTTTTACCTTACAGAAAAACAGGATCTGCC  
ATGGTCTTGTCTATGGCTTCATTAGTAGGTTTTTTACCTATGCGATTTTTGGGACCTGCCATTGGTGTGCTAGTG  
GATCGTCATGATAGGAAGAAGATAATGATTGGTGCCGATTTAATTATCGCAGCAGCTGGTGCAGTGCTTGCTATT  
GTTGCATTCTGTATGGAGCTACCTGTCTGGATGATTATGATAGTATTGTTTATCCGTAGCATTGGAACAGCTTTT  
CATACCCAGCACTCAATGCGGTACACCACTTTTAGTACCAGAAGAACAGCTAACGAAATGCGCAGGCTATAGT  
CAGTCTTTGCAGTCTATAAGCTATATTGTTAGTCCGGCAGTTGCAGCACTCTTATACTCCGTTTGGGATTTAAAT  
GCTATTATTGCCATCGACGTATTGGGTGCTGTGATTGCATCTATTACGGTAGCAATTGTACGTATACCTAAGCTG  
GGTAATCAAGTGCAAAGTTTAGAACCAAATTTTATAAGGGAGATGAAAGAAGGAGTTGTGGTTCTGAGACAAAAC  
AAAGGATTGTTTGCCTTATTACTCTTAGGAACACTATATACTTTTGTATATGCCAATCAATGCCTATTTCCCT  
TTAATAAGCATGGAACACTTTAATGGAACACCTGTGCATATTTCTATTACGGAAATTTCCCTTTGCATTTGGGATG  
CTAGCAGGAGGCTTATTATTAGGAAGATTAGGGGGCTTCGAAAAGCATGTATTACTAATAACAAGTTTCATTTTTT  
ATAATGGGGACCAGTTTAGCCGTTTCGGGAATACTTCTCCAAATGGATTTGTAATATTCGTAGTTTGTCTGTGCA  
ATAATGGGGCTTTCCGTGCCATTTTATAGCGGTGTGCAAACAGCTCTTTTTCAGGAGAAAAATTAAGCCTGAATAT  
TTAGGACGTGATTTTTCTTTGATCGGAAGTATCATGTCACTTGTCTATGCCA

**>KT819628.1 Haemophilus parainfluenzae strain RK 33 23S ribosomal RNA methyltransferase (ermB) gene, partial cds**

ATTGGAACAGGTAAAGGGCATTAAACGACGAAACTGGCTAAAATAAGTAAACAGGTAACGTCTATTGAATTAGAC  
AGTCATCTATTCAACTTATCGTCAGAAAAATTAAGAACTGAATACTCGTGTCACTTTAATTCACCAAGATATTCTA  
CAGTTTTCAATTCCCTAACAAACAGAGGTATAAAATTTGTTGGGAGTATTCTTACCATTTAAGCACACAAAATTATT  
AAAAAGTGGTTTTTGAAGCCATGCGTCTGACATCTATCTGATTGTTGAAGAAGGATTCTACAAGCGTACCTTG  
GATATTCACCGAACACTAGGGTTGCTCTTGCACACTCAAGTCTCGATTGCAATTGCTTAAGCTGCCAGCGGAA  
TGCTTTCATCCTAAACCAAAAGTAAACAGTGTCTTAATAAAACTTACCCGCCATACCACAGATGTTCCAGATAAA  
TATTGGAAGCTATATACGTACTTTGTTTCAAATGGGTCAATCGAGAATATCGTCAACTGTTTACTAAAAATCAG  
TTTCATCAAGCAATGAAACACGCCAAAGTAAACAATTTA

**>KU180707.1 Haemophilus parainfluenzae strain RK 24 ABC transporter (msrD) gene, partial cds**

GACGAAGTAACTCTGCAGGAGGAAAAAGATTTTGCCTTGTAGGCAAGCTAGGTGTTGAGCAATTAATATACAG  
ACTATGAGCGGTGGTGAAGAAACAAGGCTTAAATAGCACAGGCCTTATCGGCACAGGTTTCATGGTATTTTAGCG  
GATGAACCTACGAGCCATTTAGACCGTGAAGGAATTGATTTTTCTAATAGGACAGCTAAAAATTTTACAGGTGCA  
CTGTTAGTTATTAGCCATGACCGCTATTTTTCTTGATGAAATAGTAGATAAAATATGGGAACTGAAAGATGGCAAA  
ATCACTGAGTATTGGGGAAACTATTCTGATTATCTTCGTCAGAAAGAGGAAGAACGTAAGAGCCAAGCTGCAGAA  
TACGAACAATTTATTGCGGAACGTGCCCGATTGGAAAGGGCTGCGGAGGAAAAGCGAAAACAGGCTCGTAAAAATA  
GAACAGAAGGCAAAAGTTCTTCAAAGAAAAAAGTACTGAAGACGGAGGGCGTTTAGCTCATCAAAAATCAATA  
GGAAGTAAGGAAAAAAGATGTATAATGCTGCTAAAACCTTAGAGCACAGGATTGCGGCCCTTAGGAAAAAGTAGAA  
GCTCCGGAAGGCATTTCGAGAATTCGTTTTAGGCAAAGTAAAGCATTGGAGCTCCATAATCCATACCCTATAGTC

**>KT873309.1 Haemophilus parainfluenzae strain RK 24 50S ribosomal gene L22 gene, complete cds**

ATGGAACTATCGCAAAACATCGTTACGCTCGCACTTCTGCCAAAAAGCTCGCTTAGTTGCCGATTTAATTCGT  
GGTAAAAAAGTTGCGCAAGCATTAGAAATCTTAACCTTTTACTAACAAAAAAGCTGCGGCTTTAGTGAAAAAGTA  
TTAGAGTCTGCTATTGCTAACCGCAGAGCATAATGATGGTGCAGATATCGATGATCTTAAAGTTGCTAAAAATCTTC  
GTTGACGAAGGTCTAGCATGAAACGTGTTATGCCACGTGCTAAAGGTCGTGCAGATCGTATTTTAAAACGTACT  
AGCCACATCACTGTGGTTGTGTCAGATCGTTAA

**>HAEM0902/50S ribosomal gene L4 Allele 6**

ATGGAAATTACAAGTTGTAGGTGCAAACGCACTCACTGTTTCTGAAACTACCTTCGGACGTGAGTTTAAACGAAGCG  
TTGATCCACCAAGTTGTTGTTGCTTATGCAGCAGGTGCGCGTCAAGGTACTCGTGCACAAAAAAGCTGCTGCTGAA  
GTGTCTGGTTTCAGGTAAAAAACCTTGGCGTCAAAAAGGTACAGGTGCTGCTCGTCTGGTGTATTAATCACCA  
ATCTGGCGTTCTGGTGGTACAACCTTCGCGGCTAAACCACAAGATCACAGCAAAAAAGTGAACAAGAAAAATGTAC  
CGTGGTGTCTATCAAAAGCATTCTTTCTGAATTAGTTCGTCAAGACCGTCTGGTTGTTGTTGAAAAATTCGAATTA  
GATGCACCAAAAACTAAAGTTTTAGTACAAAAATTAAGATTTAGCCGTTGAAGATGCGTTAATATCACAGCA  
AGTTTTAGATGAAAATCTATTCTTAGCAGCACGTAACCTATATAAAGTTGATGTACGTGATGTTCAAGGTATCGAT  
CCAGTTAGCTTGATCGTTTTCGATAAAGTGATTGTTACTGTTGACGCTGTGAAACAAATTTGAGGAGATCCTAGCA  
TGA

**>HAEM0906/50S ribosomal gene L22, allele 1**

```
ATGGAACTATCGCAAAACATCGTTACGCTCGCACTTCTGCCAAAAAGCTCGCTTAGTTGCCGATTTAATTCGT
GGTAAAAAAGTTGCGCAAGCATTAGAAATTTTAACTTTCACTAACAAAAAAGCAGCAGCTTTAGTGAAGAAAGTT
TTAGAATCAGCTATTGCAAACGCAGAGCACAATGACGGTGACAGATATTGATGATCTTAAAGTTGCTAAAAATCTTC
GTTGATGAAGGTCCTAGCATGAAACGTGTTATGCCACGTGCTAAAGGTCGTGCAGATCGTATTTTAAAAACGTACT
AGCCACATTACTGTGGTTGTGTTCAGATCGTTAA
```

### II.5.4.6 Mécanisme moléculaire de la résistance aux cyclines

Le mécanisme de résistance des isolats d'*Haemophilus* à la tétracycline a été investigué par la recherche des gènes de résistance *tet(B)* et *tet(M)*.

Les séquences des gènes de résistance *tet(B)* et *tet(M)* de plusieurs espèces bactériennes ont été extraites de NCBI et alignées dans CLUSTALW. Les parties conservées entre ces séquences à l'issue de l'alignement ont été utilisées pour détecter les souches d'*Haemophilus* exprimant ces gènes codant pour les protéines protectrices (gène *tet(M)*) et mécanisme d'efflux (gène *tet(B)*) responsables de la résistance à la tétracycline.

Pour la recherche des isolats d'*Haemophilus* exprimant le gène de résistance *tet(M)*, au moins deux portions de la séquence nucléotidique conservée suivante ont été recherchées dans le génome entier :

NG_048215.1- <i>Neisseria-meningitidis</i>	TCTTTTTTATCAATAAGATTGACCAAATGGAATTGATTTATCAACGGTT
NG_048241.1- <i>Escherichia-coli</i>	TCTTTTTTATCAATAAGATTGACCAAATGGAATTGATTTATCAACGGTT
NG_048211.1- <i>Enterococcus-faecalis</i>	TCTTTTTTATCAATAAGATTGACCAAATGGAATTGATTTATCAACGGTT
NG_048248.1- <i>Klebsiella-pneumoniae</i>	TCTTTTTTATCAATAAGATTGACCAAATGGAATTGATTTATCAACGGTT
NG_048219.1- <i>Gardnerella-vaginalis</i>	TCTTTTTTATCAATAAGATTGACCAAATGGAATTGATTTATCAACGGTT
NG_048221.1- <i>Clostridium-septicum</i>	TCTTTTTTATCAATAAGATTGACCAAATGGAATTGATTTATCAACGGTT
NG_048242.1- <i>Vibrio-sp.-RV-16-</i>	TCTTTTTTATCAATAAGATTGACCAAATGGAATTGATTTATCAACGGTT
NG_048217.1- <i>Streptococcus-pneumoniae</i>	TCTTTTTTATCAATAAGATTGACCAAATGGAATTGATTTATCAACGGTT
	*****

Pour la recherche des isolats d'*Haemophilus* exprimant le gène de résistance *tet(B)*, au moins deux portions des séquences nucléotidiques conservées suivantes ont été recherchées dans le génome entier :

AB084245.1- <i>Neisseria-meningitidis</i>	TGGCTTGAAAAATGCTGACCGATTTGGTCGGCGCCAGTGCTGTTGTT
AB084246.1- <i>Neisseria-meningitidis</i>	TGGCTTGAAAAATGCTGACCGATTTGGTCGGCGCCAGTGCTGTTGTT
locus-ECO111_RS28360-Allèle9	TGGCTTGAAAAATGCTGACCGATTTGGTCGGCGCCAGTGCTGTTGTT
	*****
AB084245.1- <i>Neisseria-meningitidis</i>	GTCATTAATAGGCGCATCGCTGGATTACTTATTGCTGGCTTTTCAAGTG
AB084246.1- <i>Neisseria-meningitidis</i>	GTCATTAATAGGCGCATCGCTGGATTACTTATTGCTGGCTTTTCAAGTG
locus-ECO111_RS28360-Allèle9	GTCATTAATAGGCGCATCGCTGGATTACTTATTGCTGGCTTTTCAAGTG
	*****
AB084245.1- <i>Neisseria-meningitidis</i>	CGCTTTGGATGCTGTATTTAGGCCGTTTGCCTTTCAGGGATCACAGGAGCT
AB084246.1- <i>Neisseria-meningitidis</i>	CGCTTTGGATGCTGTATTTAGGCCGTTTGCCTTTCAGGGATCACAGGAGCT
locus-ECO111_RS28360-Allèle9	CGCTTTGGATGCTGTATTTAGGCCGTTTGCCTTTCAGGGATCACAGGAGCT
	*****
AB084245.1- <i>Neisseria-meningitidis</i>	ACGCGTGAAGTGGTTCGGTTGGTTAGGGGCAAGTTTGGGCTTGGTTTAA
AB084246.1- <i>Neisseria-meningitidis</i>	ACGCGTGAAGTGGTTCGGTTGGTTAGGGGCAAGTTTGGGCTTGGTTTAA
locus-ECO111_RS28360-Allèle9	ACGCGTGAAGTGGTTCGGTTGGTTAGGGGCAAGTTTGGGCTTGGTTTAA
	*****
AB084245.1- <i>Neisseria-meningitidis</i>	TAGTGGGGCTATTATTGGTGGTTTTGCAGGAGAGATTTACC GCATAGT
AB084246.1- <i>Neisseria-meningitidis</i>	TAGTGGGGCTATTATTGGTGGTTTTGCAGGAGAGATTTACC GCATAGT
locus-ECO111_RS28360-Allèle9	TAGTGGGGCTATTATTGGTGGTTTTGCAGGAGAGATTTACC GCATAGT
	*****

### **II.5.5 Analyses statistiques**

Les données ont été analysées en utilisant le logiciel SPSS pour Windows pour la recherche des facteurs associés. Pour étudier l'association entre la résistance aux antibiotiques et les différents paramètres sociodémographiques et cliniques, le test du chi-carré (ou le test exact de Fisher) était réalisé. Le test t de Student était utilisé pour la comparaison de moyennes dans l'analyse statistique. Une p value inférieure à 0,05 était considérée comme statistiquement significative.

# **CHAPITRE III: RÉSULTATS ET DISCUSSION**

## **CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION**

### **III.1 DÉTERMINATION DE LA FRÉQUENCE DE DÉTECTION DES DIFFÉRENTES BACTÉRIES RESPIRATOIRES ET DES FACTEURS ASSOCIÉS**

#### **III.1.1 Caractéristiques sociodémographiques et cliniques de la population d'étude**

Un total de 440 patients souffrant d'infection des voies respiratoires ont été inclus dans cette étude, dont 183 au service de pédiatrie du Centre Hospitalier d'Essos et 257 au service de pneumologie de l'Hôpital Jamot de Yaoundé. Le sexe ratio masculin/féminin était de 1,2 et les patients étaient âgés de 0,1 à 94 ans, avec un âge médian de 25,1 ans (intervalle interquartile: 2,8 à 46,7). Chez les enfants, ceux moins de 5 ans étaient les plus nombreux (36,4% : 160/440) tandis que la tranche d'âge de 36 à 55 ans était la plus représentative chez les adultes (23,2% : 102/440). À l'Hôpital Jamot, 93% (239/257) des patients étaient des adultes. Aucune différence d'âge n'a été constatée pour le genre ( $p = 0,063$ ). La durée médiane des symptômes avant la consultation était de 7 jours, avec un écart interquartile de 3 à 30 jours. Les caractéristiques sociodémographiques et cliniques des patients sont résumées dans le tableau X. Les principaux symptômes dans les deux sites d'études étaient la toux (90%), l'asthénie (79,3%), la fièvre (76,8%), la dyspnée (75,5%) et l'essoufflement (63,9%). Quatre types d'échantillons cliniques ont été collectés: 48,6% (214/440) d'écouvillons nasopharyngés, 26,4% (116/440) de liquides pleuraux, 13,2% (58/440) d'expectorations et 11,8% (52/440) de lavages broncho-alvéolaires. La majorité des patients (68,6%) avaient déjà pris des antibiotiques (bêta-lactamines, sulfamides, aminosides, macrolides et quinolones) avant l'inclusion.

**Tableau X: Caractéristiques sociodémographiques et cliniques de la population d'étude.**

Caractéristiques	CHE, N=183 (%)	Hôpital Jamot, N=257 (%)
Genre		
Masculin	91 (49,7)	149 (58)
Féminin	92 (50,3)	108 (42)
Age médian (année)	1,5 (EI: 0,7-4)	41,7 (EI: 31,1-56,6)
Groupe d'âge		
<5	157 (85,8)	3 (1,2)
[5-10[	15 (8,2)	2 (0,8)
[10-18[	11 (6)	13 (5,1)
[18-36[	/	69 (26,8)
[36-56[	/	102 (39,7)
≥56	/	68 (26,5)
Durée des symptômes (jours)	3,5 (EI: 3-5)	30 (EI: 14-90)
Caractéristiques cliniques		
Fièvre	176 (96,2)	162 (63)
Toux	170 (92,9)	226 (87,9)
Asthénie	156 (85,2)	193 (75,1)
Rhinorrhée	149 (81,4)	29 (11,3)
Dyspnée	120 (65,6)	212 (82,5)
Sous antibiotique	103 (56,3)	199 (77,4)
Mal de gorge	90 (49,2)	42 (16,3)
Vomissement	77 (42,1)	30 (11,7)
Essoufflement	73 (39,9)	208 (80,9)
Céphalées	71 (38,8)	62 (24,1)
Myalgies	68 (37,2)	105 (40,9)
Arthralgies	67 (36,6)	59 (23)
Diarrhée	45 (24,6)	24 (9,3)
Conjonctivite	20 (10,9)	6 (2,3)
Douleur thoracique	19 (10,4)	141 (54,9)
Tabagisme actif ou passif	8 (4,4)	55 (21,4)
Usage du pétrole pour la cuisson	2 (1,1)	89 (34,6)
VIH positif	2 (1,1)	80 (31,1)

CHE: Centre Hospitalier d'Essos; EI: Ecart Interquartile; / : Non applicable.



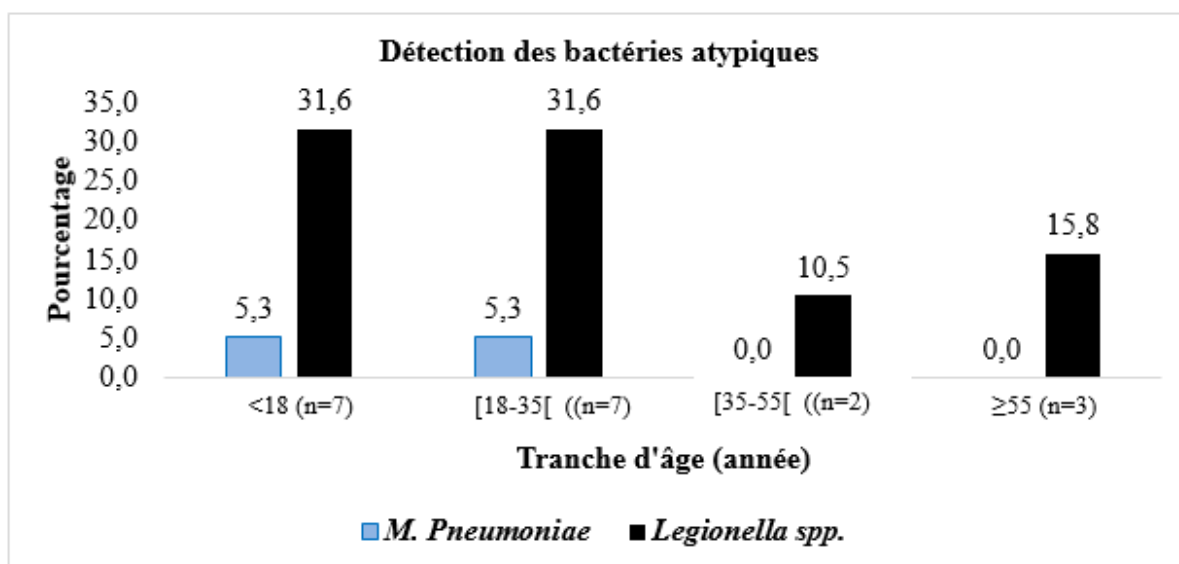
### III.1.2 Détection bactérienne et mycobactérienne

Les bactéries ont été détectées chez 68% (299/440) des patients et pouvaient être groupées en Gram négatif, Gram positif, atypique et mycobactéries. Les *Haemophilus*, pneumocoques et *Moraxella catarrhalis* étaient les bactéries non tuberculeuses les plus détectées. Les tableaux XI et XII ci-dessous présentent les données de recrutement des patients et les résultats de la détection des bactéries par culture et par RT-PCR (Fast Track Diagnostics) à l'exception des mycobactéries.

Les bactéries à Gram positif étaient détectées chez 35,7% (157/440) des patients et étaient constituées de *S. aureus* et des streptocoques parmi lesquels les pneumocoques (*S. pneumoniae*), *S. anginosus*, *S. constellatus* et *S. gordonii*. Elles étaient détectées à 15,5% (68/440) par culture et 34,8% (153/440) par RT-PCR (voir tableau XI).

Les bactéries à Gram négatif détectées chez 47% (207/440) des patients comprenaient les *Haemophilus*, *M. catarrhalis*, *K. pneumoniae*, *C. youngae*, *E. agglomerans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *C. koseri* (voir tableau XII). Les *Haemophilus* étaient les bactéries les plus détectées avec 21,6% par culture et 26,6% par RT-PCR.

*Legionella spp.* et *M. pneumoniae* constituaient les bactéries atypiques détectées uniquement par RT-PCR chez 4,3% (19/440) des patients (figure 16 ; voir tableau XI).



**Figure 16: Répartition des bactéries atypiques selon la tranche d'âge**

Plusieurs paramètres influent la fréquence de détection des bactéries non tuberculeuses. Cette fréquence était plus élevée ( $p = 0,024$ ) chez les patients du CHE (84,2% :

154/183) constitués à 100% d'enfants par rapport à ceux de l'Hôpital Jamot (56,4%: 145/257) constitués à 93% d'adultes. À l'Hôpital Jamot, le délai de consultation et l'absence de myalgie étaient des paramètres associés à la détection bactérienne ( $p = 0,04$  et  $p = 0,017$  respectivement). Dans les 15 jours, 35,7% de la détection bactérienne était faisable. Les bactéries étaient plus détectées chez les patients ne présentant pas de myalgie (27,3%) par rapport aux patients présentant ce signe clinique (14,3%). Au CHE, les variables comme le sexe ( $p = 0,018$ ), la dyspnée ( $p = 0,002$ ), la prise préalable d'antibiotique avant investigation bactériologique ( $p = 0,007$ ) et la conjonctivite ( $p = 0,016$ ) étaient associées à la détection bactérienne. La détection bactérienne était plus élevée dans les prélèvements nasopharyngés ( $p < 0,001$  ; voir tableaux XI et XII).

En ce qui concerne le genre, les bactéries étaient détectées à 56,5% chez les patients de sexe féminin (52/92) contre 38,5% chez les patients de sexe masculin (35/91). Les bactéries étaient moins détectées chez les patients ayant préalablement (38,8%: 40/103) pris un traitement antibiotique par rapport à ceux ne les ayant pas pris (59,5%: 47/79). Suivant les signes cliniques, la détection bactérienne était de 75% (15/20) chez les patients manifestant une conjonctivite contre 44,1% (71/161) de ceux ne la présentant pas. La détection bactérienne était de 64,5% (40/62) chez les patients ne présentant pas de dyspnée contre 39,2% (47/120) des patients qui la manifestaient.

La tuberculose (détection des mycobactéries) était diagnostiquée uniquement chez les patients de l'Hôpital Jamot à 14,8% (38/257). Les paramètres tels que le VIH ( $p = 0,023$ ) et le tabagisme ( $p = 0,043$ ) étaient associés à cette fréquence. Suivant le statut VIH, la tuberculose était diagnostiquée chez 12,2% (16/131) des patients VIH séronégatifs contre 25% (20/80) chez les patients VIH séropositifs. La fréquence de détection de la tuberculose était de 23,6% (13/55) chez les fumeurs contre 11,4% (18/158) chez les non-fumeurs.

Les pneumocoques et *Haemophilus* étaient les bactéries les plus détectées par culture, soit 10,9% et 21,6% respectivement.

**Tableau XI: Détection des bactéries à Gram positifs et atypiques par culture et RT-PCR**

Sites de prélèvement	Nature de Prélèvement	Nombre	Bactéries à Gram positif					Bactéries atypiques	
			<i>Pneumocoque</i>	<i>S. anginosus</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. constellatus</i>	<i>L. species</i>	<i>M. pneumoniae</i>
Hôpital Jamot	Lavage broncho-alvéolaire	52	2(5)	0	0	0 (5)	0	/ (3)	0
	Liquide pleural/pus #	116	9 (18)	1	1	2 (8)	1	/ (4)	0
	Crachat	58	1 (11)	0	0	1 (5)	0	/ (4)	/ (1)
	Ecouvillon nasopharyngé	31	0 (5)	0	0	1 (3)	0	0	0
Centre Hospitalier d'Essos	Ecouvillon Nasopharyngé	183	36 (66)	0	0	13 (27)	0	/ (6)	/ (1)
<b>Total</b>		440	48 (105)	1	1	17 (48)	1	/ (17)	/ (2)
<b>Pourcentage</b>		<b>100</b>	<b>10,9 (23,9)</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>3,9 (10,9)</b>	<b>0,2</b>	<b>/ (3,9)</b>	<b>/ (0,5)</b>

( ): Détection par RT-PCR; /: Bactérie non détectable à la fois par les deux techniques; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; *S. anginosus*: *Streptococcus anginosus*; *S. gordonii*: *Streptococcus gordonii*; RT-PCR : *Reverse Transcriptase Real Time Polymerase Chain Reaction*

#: pour ce qui concerne les 77 liquides pleuraux non-purulents, 4 étaient positifs par culture dont 1 *S. aureus* et 3 pneumocoques. Par RT-PCR, 9 étaient positifs dont 4 *S. aureus* et 5 pneumocoques

**Tableau XII: Détection des bactéries à Gram négatif par culture et RT-PCR**

Sites de prélèvement	Nature de Prélèvement	Nombre	Bactéries à Gram négatif								
			<i>C. youngae</i>	<i>M. catarrhalis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Haemophilus*</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>F. oryzae</i>	<i>C. koseri</i>
Hôpital Jamot	Lavage broncho-alvéolaire	52	0	0 (3)	4(4)	5(13)	1	0	2	1	1
	Liquide pleural/pus #	116	1	0 (2)	1(6)	2 (10)	0	1	0	0	0
	Crachat	58	0	0 (2)	(17)	15 (15)	0	0	0	0	0
	Ecouvillon nasopharyngé	31	0	0 (1)	(3)	3 (3)	0	0	0	0	0
Centre Hospitalier d'Essos	Ecouvillons nasopharyngés	183	0	7 (70)	1(11)	70 (76)	0	0	0	0	0
<b>Total</b>		440	1	7 (78)	7(41)	95(117)	1	1	2	1	1
<b>Pourcentage</b>		<b>100</b>	<b>0,2</b>	<b>1,6 (17,7)</b>	<b>1.6 (9,3)</b>	<b>21,6 (26,6)</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,5</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>

( ): Détection par RT-PCR; \*: *Haemophilus influenzae* pour RT-PCR; *M. catarrhalis*: *Moraxella catarrhalis*; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; *K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*; *C. youngae*: *Citrobacter youngae*; *E. agglomerans*: *Enterobacter agglomerans*; *E. coli*: *Escherichia coli*; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa* ; *C. koseri*: *Citrobacter koseri*; *F. oryzae*: *Flavimonas oryzae*; RT-PCR : *Reverse Transcriptase Real Time Polymerase Chain Reaction*. ; #: pour ce qui concerne les 77 liquides pleuraux non-purulents, 2 étaient positifs par culture dont 1 *Haemophilus* et 1 *K. pneumoniae*. Par RT-PCR, 6 étaient positifs dont 5 *Haemophilus* et 1 *K. pneumoniae*.

### III.1.3 Co-détection bactérienne

Le taux de co-détection bactérienne et/ou mycobactérienne était de 44,5% (133/299). Par culture, le taux de co-détection bactérienne était de 36,1% (48/133) chez patients de l'Hôpital Jamot contre 63,9% (85/133) des patients du Centre Hospitalier d'Essos ( $p < 0,001$ ). Dans les deux sites d'étude, le taux de co-détection bactérienne était de 24,8% par culture (35/141) contre 43% par RT-PCR (111/258). Suivant les deux techniques de détection bactérienne utilisées, les différents profils de co-détection sont représentés dans le tableau XIII ci-dessous. La majorité de co-détection bactérienne impliquait à la fois les pneumocoques et les *Haemophilus* (38,3% ; 51/133). Une co-détection *Haemophilus* + *S. aureus* et deux co-détections *Haemophilus* + streptocoque ont été enregistrées par culture chez des patients non tuberculeux (2,3%: 3/133). La fréquence de co-détection était élevée dans les prélèvements nasopharyngés ( $p < 0,001$  ; 66,2%) par rapport aux autres types d'échantillon.

Le taux de co-détection bactéries/mycobactéries était de 15% (20/133). Le taux de co-détection bactérienne chez les patients tuberculeux était de 52,6% (20/38) contre 28,1% (113/402) chez les non tuberculeux ( $p=0,003$ ). Les *Haemophilus* étaient les bactéries les plus impliquées dans les co-détections chez les sujets tuberculeux à 28,9% (11/38).

### III.1.4 Comparaison des techniques de détection bactérienne

La détection des bactéries non tuberculeuses était faite par culture standard et par RT-PCR. La fréquence de détection bactérienne par culture était de 32% (141/440) et 58,6% (258/440) par RT-PCR ( $p < 0,001$ ). Des cultures positives, 16,3% (23/141) n'étaient pas détectables par RT-PCR. Il s'agissait des streptocoques autres que les pneumocoques, les bactéries à Gram négatif telles que *C. youngae*, *E. agglomerans*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *F. oryzae* et *C. koseri* qui ne sont pas inclus dans le kit d'amplification (voir tableau XIII). Aucune des 54,3% (140/258) d'échantillons positifs par RT-PCR pour la détection bactérienne n'étaient détectables par culture. Les échantillons négatifs en culture étaient constitués des bactéries atypiques (8,6% ; 12/140) *L. pneumophila/longbeachae* et *M. pneumoniae* en plus des pneumocoques, *Haemophilus influenzae*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* et *M. catarrhalis* (tableau XIII).

**Tableau XIII: Co-détection bactérienne**

Bactéries	Culture et RT-PCR positives	RT-PCR positive et culture négative	Culture et RT-PCR positives
	Patients non tuberculeux	Patients non tuberculeux	Patients tuberculeux
<i>Flavimonas orzyhabitan</i>	/	/	1
<i>Streptococcus anginosus</i>	/	/	1
<i>Streptococcus gordonii</i>	/	/	1
<i>Citrobacter youngae</i>	/	/	1
<i>Escherichia coli</i>	/	/	1
<i>Enterobacter agglomerans</i>	/	/	1
<i>H</i>	/	/	7
<i>Ls</i>	/	/	1
<i>H, Sp</i>	17	7	0
<i>Sa, Sp</i>	1	1	1
<i>Mc, Sp</i>	7	4	0
<i>Ls, Sp</i>	1	0	0
<i>Sa, Mc</i>	1	3	0
<i>Sa, Kp</i>	1	1	0
<i>Sa, H</i>	4	2	1
<i>Kp, Sp</i>	1	3	0
<i>Kp, H</i>	3	0	4
<i>Mc, H</i>	7	4	0
<i>Ls, H</i>	1	1	0
<i>Mc, Kp</i>	0	1	0
<i>Ls, Sa</i>	0	1	0
<i>Ls, Kp</i>	0	0	1
<i>Sp, Sa, Ls</i>	0	0	1
<i>H, Sp, Mc</i>	13	5	1
<i>H, Sp, Kp</i>	2	0	0
<i>H, Sp, Sa</i>	2	0	0
<i>H, Mc, Ls</i>	1	0	0
<i>H, Mc, Mp</i>	1	0	0
<i>H, Mc, Kp</i>	1	0	0
<i>H, Kp, Ls</i>	1	0	0
<i>H, Sa, Kp</i>	2	2	0
<i>H, Sa, Mc</i>	0	1	0
<i>Mc, Sa, Kp</i>	0	1	0
<i>Mc, Sa, Sp</i>	0	1	0
<i>H, Sa, Mc, Sp</i>	2	0	0
<i>H, Sa, Kp, Sp</i>	2	0	0
<i>Sa, Ls, Kp, H</i>	0	1	0
<b>Total (%)</b>	<b>71 (53,4)</b>	<b>39 (29,3)</b>	<b>23 (17,3)</b>

/ : Non applicable ; RT-PCR : Reverse Transcriptase Real Time Polymerase Chain Reaction

*Ls: Legionella Spp.; H: Haemophilus; Mc :Moraxella catarrhalis; Kp: Klebsiella pneumoniae; Sa: Staphylococcus aureus; Sp: Pneumocoque (Streptococcus pneumoniae)*

### **III.1.5 Différents types d'infection des voies respiratoires**

Sur les 440 patients enrôlés, 51,6% (227/440) souffraient d'infections respiratoires établies des voies basses et les prélèvements obtenus auprès de ces derniers étaient constitués de crachats, de lavages broncho alvéolaires et de liquides pleuraux (tableaux XI et XII). Parmi ces patients souffrants d'infection des voies basses, 8,6% étaient tuberculeux (38/440). Les prélèvements stériles (lavages broncho alvéolaires et liquides pleuraux) ont été obtenus auprès de 145 patients non tuberculeux comprenant 141 adultes.

Sur la base des délais du diagnostic, 84,8% des patients souffraient d'infections respiratoires chroniques (>10 jours) à l'Hôpital Jamot de Yaoundé contre 95,1% de patients souffrant d'infections respiratoires aiguës chez les patients du Centre Hospitalier d'Essos. La détection bactérienne était élevée (66,3%) chez les patients souffrant d'infection aiguës ( $p < 0,001$ ).

### **III.1.6 Discussion partielle**

Le diagnostic et la gestion des infections des voies respiratoires constituent un défi majeur en Afrique en raison des conditions socio-économique et de l'accès limité à des soins de santé et des hôpitaux de qualité. Afin de formuler des lignes directrices adéquates pour sa gestion, y compris le diagnostic et le traitement, des données sur les bactéries provenant de patients souffrants d'infections des voies respiratoires sont indispensables. Cette partie de l'étude portait sur la détection des bactéries de ces infections en fonction de la méthode, des paramètres sociodémographiques et cliniques. Quatre cent quarante échantillons cliniques de patients présentant des symptômes d'infections des voies respiratoires ont été soumis à des investigations bactériennes utilisant la culture bactériologique classique ou conventionnelle et une RT-PCR commerciale.

Au moins une bactérie (non tuberculeuse) a pu être détectée chez 63,9% des 440 patients présentant cliniquement une infection des voies respiratoires. Cette prévalence de bactéries des voies respiratoires est supérieure aux 45,2% dans l'État d'Enugu, au Nigéria (M. Uzoamaka *et al.*, 2017) et aux 24% en Tunisie (Fekih Hassen *et al.*, 2014). En utilisant la même approche diagnostique, des fréquences bactériennes de 77% et de 85,7% ont été rapportées en Gambie et dans l'État d'Osun au Nigéria, respectivement (Howie *et al.*, 2014; Kuti & Oyelami, 2014). Les prévalences peuvent varier en fonction du protocole utilisé lors des études et selon les zones

géographiques. En effet, la propagation des infections respiratoires varie selon les populations et les pays, aussi en fonction des différences géographiques, climatiques et socio-économiques (Cui *et al.*, 2015; del Valle Mendoza *et al.*, 2015; Huo *et al.*, 2012; Kwofie *et al.*, 2012). De plus, nous avons rapporté la détection de bactéries chez les enfants et les adultes alors que la plupart des études n'incluaient que des enfants. La prévalence plus élevée par rapport à la Gambie et au Nigéria pourrait également s'expliquer par le pourcentage élevé d'échantillons nasopharyngés de patients pouvant être un portage.

Les bactéries les plus courantes étaient les *Haemophilus*, *M. catarrhalis* et *S. pneumoniae*, représentant près de 80,2% des cas par RT-PCR et de 80,1% par culture. Ces bactéries ont déjà été rapportées comme étant les principales causes d'infections des voies respiratoires (notamment chez les enfants de moins de 5 ans) en Zambie (Simusika *et al.*, 2015) et au Sénégal (Assane *et al.*, 2018). Au Niger (Lagare *et al.*, 2015) et en Tunisie (Fekih Hassen *et al.*, 2014), des travaux similaires ont montré les mêmes résultats avec *Haemophilus* et *S. pneumoniae* comme étant les principales bactéries détectées, même si *M. catarrhalis* n'était pas recherché. Nos résultats sont différents de ceux du Kenya (où *S. pyogenes* et *S. viridans* étaient les bactéries les plus détectés) (Matu M *et al.*, 2014) et du Bangladesh (avec *S. pneumoniae* et *K. pneumoniae* comme espèces bactériennes prédominantes) (Bhuyan *et al.*, 2017). D'autres études menées au Nigéria, un pays voisin du Cameroun, ont indiqué que *K. pneumoniae* était l'agent pathogène le plus détecté (Egbe *et al.*, 2011; M. Uzoamaka *et al.*, 2017) ou *S. aureus* en Tunisie (Hamouda *et al.*, 2016). Ces différences pourraient être dues aux conditions environnementales et expérimentales. En fait, l'hétérogénéité spatiale permet la prolifération de communautés microbiennes diverses, car le microbiote varie avec l'âge, ses caractéristiques dépendant du site corporel, du mode de vie de l'hôte et de l'état de santé (Botero *et al.*, 2016).

Les bactéries atypiques représentaient 4,3% [IC 95%: 2,6-6,7] dans l'étude avec 63,2% chez les patients de plus de 20 ans contre 36,8% chez les moins de 5 ans. Une faible prévalence similaire de bactéries atypiques avait été constatée au Gabon (Lassmann *et al.*, 2008), en Égypte (Elkholy *et al.*, 2009; Nevine *et al.*, 2018) et dans une zone tropicale rurale de Madagascar (Hoffmann *et al.*, 2012). Des prévalences plus élevées et variées ont été observées en Égypte avec 18% (Agmy *et al.*, 2013) et en Chine avec 56,9% de positifs, en 2013 (Wu *et al.*, 2014). Les patients de notre étude ayant eu un résultat positif aux bactéries atypiques n'étaient pas seulement âgés de moins de cinq ans ou de plus de 65 ans. Suivant les groupes d'âge, les résultats ne concordent pas avec ceux d'études précédentes qui tendent à montrer que les bactéries atypiques sont davantage détectées chez les enfants ou les personnes âgées (Agmy *et*



*al.*, 2013; Elkholy *et al.*, 2009; Hoffmann *et al.*, 2012; Lassmann *et al.*, 2008; Nevine *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2014). Dans notre étude, la distribution de ces bactéries selon les tranches d'âge était aléatoire.

Bien que *Haemophilus* et *S. pneumoniae* étaient les bactéries prédominantes, leurs distributions variaient considérablement suivant le type d'échantillon clinique. Le taux de détection bactérienne était plus faible dans les fluides drainés d'épanchement pleural par rapport aux autres échantillons cliniques. La fréquence de détection bactérienne dans ces fluides (6,5% en culture) était aussi faible que celle observée en Espagne, où 7% (14/191) des liquides d'épanchements pleuraux parapneumoniques non compliqués étaient positifs en culture (Porcel *et al.*, 2014). Le faible taux de détection pourrait être dû au fait que 79,2% des fluides drainés suite à un épanchement pleural provenaient de patients ayant préalablement pris un traitement antimicrobien.

Dans les fluides drainés d'empyème pleural, le taux de détection bactérienne par culture (35,9%) était faible par rapport aux résultats antérieurs obtenus à l'hôpital Jamot (Yaoundé, Cameroun) il y'a près d'une décennie, où ce taux de détection était de 53,7% (Pefura Yone, Kuaban, Leonie, *et al.*, 2012) également comparé à une étude menée à Lleida en Espagne, rapportant un taux de positivité de la culture de 66% (Porcel *et al.*, 2014). Par ailleurs, notre taux de détection bactérienne dans les fluides drainés de l'empyème pleural était supérieur à celui obtenu à San Sebastian, en Espagne, où ils n'avaient détecté que 10% par culture entre janvier 2005 et décembre 2012 (Marimón *et al.*, 2015). Dans l'étude réalisée à San Sebastian, l'utilisation d'antibiotiques avant les investigations bactériologiques était élevée (81,7%). Cependant, l'étude réalisée à Lleida n'a pas fait état d'une utilisation antérieure d'antibiotiques qui pourrait justifier le taux élevé de culture positive. La plupart des détections bactériennes concernaient des fluides provenant d'un empyème pleural et nous supposons que cela pourrait être dû à l'abondance du milieu en nutriments favorisant la croissance de bactéries pathogènes telles que *S. pneumoniae*. C'est peut-être l'une des raisons pour lesquelles les pneumocoques sont une cause bactérienne fréquente d'empyème. Ainsi, la forte densité et la croissance persistante de *S. pneumoniae* dans le liquide pleural soulignent l'importance de drainer les épanchements infectés (Popowicz *et al.*, 2017).

Dans les lavages broncho alvéolaires, 63,4% des échantillons étaient positifs. Nous avons constaté que les *Haemophilus* étaient les agents pathogènes clés (39,4%), ceci est différent des observations faites dans les aspirations pulmonaires chez des enfants malawiens et gambiens

avec *S. pneumoniae* (Carrol *et al.*, 2011; Howie *et al.*, 2014). Notre résultat dans les lavages broncho alvéolaires est également différent de celui obtenu chez les adultes coréens avec *S. aureus* (Kim *et al.*, 2012) comme la bactérie la plus fréquemment isolée. Dans l'ensemble, les profils bactériens des lavages broncho alvéolaires varient considérablement d'une étude à l'autre (El-Shabrawy & El-Sokkary, 2016). Cette variation pourrait être due au problème de la contamination du liquide par la flore commensale buccopharyngée et au défaut de standardisation des protocoles de prélèvements, à la compétition bactérienne et la densité des bactéries.

La positivité de la détection bactérienne était de 77,6% dans les échantillons nasopharyngés et les bactéries les plus courantes étaient les *Haemophilus*, *S. pneumoniae* et *M. catarrhalis*, représentant respectivement 59,6%, 43,4% et 40,4%. L'isolement des bactéries dans les échantillons nasopharyngés reflète probablement le portage chez de nombreux patients. En effet, le nasopharynx est densément colonisé par une grande variété de micro-organismes, notamment les bactéries commensales communes, ainsi que des agents pathogènes potentiels, tels que *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* (essentiellement les souches non typables) et *Moraxella catarrhalis*. Dans la plupart des cas, ces organismes sont présents sans causer de symptômes cliniques. Lorsque l'immunité de l'hôte est altérée, les micro-organismes peuvent envahir des sites adjacents et/ou envahir la circulation sanguine, ce qui assure leur dissémination et provoque la maladie (Ogeneh *et al.*, 2014; WHO, 2006). En l'absence de personnes en bonne santé (témoins) pour déterminer et comparer la proportion de positivité bactérienne, il n'est pas possible de décider définitivement si les bactéries détectées représentaient le portage ou causaient une infection. Il est connu que les échantillons nasopharyngés (prélèvements non invasifs) peuvent être utilisés pour diagnostiquer des bactéries qui ne tendent pas à coloniser le rhinopharynx (Lagare *et al.*, 2015).

La prise préalable d'antibiotique avant l'investigation bactériologique était rapportée chez 68,6% des patients. La détection bactérienne par culture était plus élevée chez les patients n'ayant pas reçu d'antibiotique (59,5%) comparée aux patients ayant antérieurement reçu un antibiotique (38,8%). Mais aucune différence n'était notée chez les patients de l'Hôpital Jamot. En effet, la culture permet de mettre en évidence les microorganismes viables à un certain seuil ce qui est différente de l'approche moléculaire qui nécessite l'acide nucléique et qui est plus sensible. Cette étude pose le problème de l'utilisation inappropriée d'antibiotiques par la plupart des patients. L'automédication reste un problème pour les diagnostics de routine car elle réduit

la sensibilité de la culture bactérienne standard. Les antibiotiques ne devraient pas être systématiquement utilisés dans le traitement des infections respiratoires (prescription probabiliste), compte tenu des étiologies virales connues et souvent prédominantes (Assane *et al.*, 2018). Ces traitements sous l'effet de la pression de sélection, ont pour conséquence de contribuer à l'émergence de résistance bactérienne aux antibiotiques (Ouedraogo *et al.*, 2017).

Les données ont montré que la détection bactérienne avait une spécificité en fonction du temps mis entre la survenue de l'infection et celui de l'investigation bactérienne. À l'hôpital Jamot, les patients étaient venus en consultation 14 à 90 jours après les premiers symptômes, alors que le délai de consultation au Centre Hospitalier d'Essos était de 3 à 5 jours (consultations pédiatriques). En effet, il a été montré que plus il y a de jours entre le début des symptômes et le prélèvement de l'échantillon, plus il est difficile de détecter un agent microbien (Shafik *et al.*, 2012). Dans les pays à faible revenu, le retard à consulter constitue un frein au bon diagnostic et à une bonne prise en charge précoce, car la plupart des patients ne sont pas en mesure de supporter les coûts des soins médicaux (Bank, 2014; O'Donnell, 2007). Cela aggrave parfois leur situation de santé au moment de leur arrivée à l'hôpital, en particulier lorsqu'ils ont déjà commencé une automédication, ce qui est fortement proscrit (Ouedraogo *et al.*, 2017).

Le taux de co-détection globale était de 44,5%. Pour les bactéries non tuberculeuses, le taux de co-détection par culture était de 24,8% contre 43% par RT-PCR ( $p < 0,001$ ). Le taux de co-détection bactérienne était plus élevé dans cette étude comparé aux 21% enregistrés en Gambie (avec un taux similaire de co-détection des *Haemophilus* et de pneumocoques) (Howie *et al.*, 2014) et aux 18,9% chez les patients hospitalisés atteints de pneumonie en Belgique (De Schutter *et al.*, 2011). Le taux de co-détection bactérienne chez les patients tuberculeux était de 52,6%. Ce taux est élevé par rapport à ceux rapportés aux Philippines avec 28,4% (Shimazaki *et al.*, 2018) et similaire aux 33% enregistrés au Cambodge (Attia *et al.*, 2019). Contrairement à ces études asiatiques, une différence de co-détection bactérienne était observée entre les patients tuberculeux et non tuberculeux à Yaoundé (Cameroun). La forte prévalence de la co-détection bactérienne chez les patients tuberculeux ou non tuberculeux peut s'expliquer par plusieurs raisons. Premièrement, la RT-PCR a été utilisée pour détecter les acides nucléiques bactériens à partir d'échantillons cliniques. L'utilisation de la RT-PCR dans des échantillons respiratoires augmente le rendement diagnostique de l'infection bactérienne chez les patients atteints d'infection respiratoire, mais elle peut également augmenter les probabilités de détecter les cas de portage pour les prélèvements non stériles. Cet argument suggère que l'approche moléculaire est la méthode la plus sensible pour détecter les co-détections représentant des infections quasi-passées et actuelles. Deuxièmement, la majorité des patients étaient

séropositifs (52,6%) pour les tuberculeux. Le taux de tabagisme enregistré pourrait augmenter le risque d'infection bactérienne, ainsi *Haemophilus* est couramment détecté chez les fumeurs et les patients atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique (Finney *et al.*, 2014). Troisièmement, la prévalence élevée de maladies respiratoires sous-jacentes pourrait avoir accru le risque de co-infection par les *Haemophilus*. *Haemophilus* était la bactérie la plus détectée chez les patients tuberculeux. Ce résultat diffère des précédents qui montrent que la bactérie la plus détectée chez les patients atteints de tuberculose était *M. pneumoniae* au Botswana (Lockman *et al.*, 2003) et *S. pneumoniae* en Afrique du Sud (Nyamande *et al.*, 2007).

La distribution des bactéries variait selon les techniques utilisées. La détection bactérienne à l'aide de la combinaison RT-PCR et culture était supérieure à celle obtenue avec les tests réalisés uniquement avec la culture dans des laboratoires de routine. La RT-PCR a augmenté le rendement de détection des bactéries de 49,8% (140/281). Comme indiqué précédemment (Marimón *et al.*, 2015), l'utilisation de l'outil moléculaire a considérablement amélioré la détection bactérienne dans les échantillons respiratoires. Dans la présente étude, seules 141 cultures positives ont été obtenues chez les 440 patients (32%) par rapport aux 258 (58,6%) par RT-PCR ( $p < 0,001$ ). En concordance avec une étude récente menée en Suède (Ullberg *et al.*, 2017), en utilisant la RT-PCR, nous avons pu détecter les agents pathogènes non cultivables et fastidieux comme *Legionella spp.* et *M. pneumoniae*, qui ne peuvent être pas recherchés de manière systématique en routine par culture. La détection rapide d'agents pathogènes peu communs à partir d'échantillons respiratoires à l'aide d'un outil moléculaire pourrait s'avérer très contributive dans la routine clinique. La plupart des co-détectées ont été effectuées par RT-PCR. Ces résultats suggèrent que la RT-PCR est une méthode très utile pour détecter les co-infections représentant des infections quasi-passées et actuelles. Le développement de tests d'amplification d'acide nucléique a révolutionné la bactériologie clinique (Laupland & Valiquette, 2013). Ce sont des méthodes de diagnostic alternatives prometteuses. Par rapport à la culture, ces tests sont capables de fournir des résultats en quelques heures, sont sensibles et ne nécessitent pas d'organismes viables (Endimiani *et al.*, 2011; Lung & Codina, 2012).

Les *Haemophilus* et les pneumocoques étaient les bactéries les plus détectées à la fois chez les patients VIH positifs et les patients négatifs. Ceci est en accord avec le fait qu'elles sont les causes les plus fréquemment identifiées de pneumonie bactérienne acquise dans la communauté dans les deux groupes (Huang & Crothers, 2009). Il n'y avait aucune différence statistique dans la détection bactérienne entre les deux groupes. Ces données suggèrent qu'ils

ne sont pas des agents pathogènes opportunistes dans notre contexte. Nos résultats sont conformes aux résultats obtenus au Ghana, où il n'y avait pas de différence significative entre la prévalence bactérienne dans les deux groupes de patients (Doe, 2009). Cependant, ces bactéries sont les agents pathogènes opportunistes les plus fréquents chez les patients souffrant d'infections respiratoires aux États-Unis, en Europe occidentale (Huang & Crothers, 2009) et dans certains pays africains chez les enfants (Marais *et al.*, 2006) et adultes (Hirschtick *et al.*, 1995). La difficulté d'expliquer ces observations chez les patients séropositifs pourrait être due au fait que les taux de CD4 n'étaient pas inférieurs à la valeur seuil correspondant au statut immunitaire compromis (nombre de CD4 <200 cellules /  $\mu$ l) (Hirschtick *et al.*, 1995). Les taux de CD4 chez les patients séropositifs pour le VIH n'ont pas été recherchés tout comme dans l'étude menée au Ghana (Doe, 2009).

La fréquence de détection des mycobactéries était de 14,8% et était faible par rapport à la prévalence nationale du Cameroun. La prévalence de la tuberculose au Cameroun est passée de 26,4% en 2006 et à 20,6% en 2014 (Noeske *et al.*, 2016). Cette différence de données pourrait être due aux biais dans le recrutement des patients puisque tous les cas d'infections respiratoires ont été inclus. Les mycobactéries étaient plus détectées chez les patients infectés par le VIH par rapport aux patients VIH séronégatifs ( $p = 0,023$ ) et 25% des patients séropositifs pour le VIH étaient positifs pour la tuberculose (IC à 95%: 16-36). Ce résultat est conforme à celui de la littérature où la tuberculose est l'une des maladies infectieuses les plus répandues dans le monde et la cause de mortalité la plus fréquente chez les patients VIH positifs (Beltran-Leon *et al.*, 2018). En fait, le VIH est le principal facteur de risque connu qui favorise la progression de la tuberculose active chez les personnes atteintes d'infection à *Mycobacterium tuberculosis* (Swaminathan, 2016). La fréquence de la co-infection tuberculose/VIH dans la présente étude était proche du taux national qui est de 34%. Ceci place le Cameroun parmi les 30 pays à forte charge tuberculose/VIH, dans les régions sous surveillance de l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO, 2017). Ainsi, au cours des deux dernières décennies, cette infection est devenue la principale infection opportuniste compliquant l'épidémie de VIH dans le monde, notamment en Asie et en Afrique (Swaminathan, 2016).

La fréquence de détection de la tuberculose était plus élevée chez les fumeurs (23,6%) comparativement aux 11,4% des non-fumeurs ( $p = 0,043$ ), suggérant que le tabagisme est un facteur de risque pour développer la tuberculose. En fait, le tabagisme a été signalé comme un paramètre favorisant les infections tuberculeuses dans de nombreux pays, par exemple en Éthiopie (Shimeles *et al.*, 2019) et en Afrique du Sud (Brunet *et al.*, 2011; den Boon *et al.*,

2005). Le tabagisme a été signalé à Taïwan comme augmentant le risque de récurrence de la tuberculose chez les adultes ayant terminé avec succès un traitement antituberculeux (Yen *et al.*, 2014). La fumée du tabac altère la clairance muco-ciliaire, diminue les performances des macrophages alvéolaires, entraîne l'immunodépression des lymphocytes pulmonaires, diminue l'activité cytotoxique des cellules *natural killer* et altère de l'activité des cellules dendritiques pulmonaires (Janah *et al.*, 2014).

Lorsque l'on examine la distribution bactérienne suivant les groupes d'âge, le taux de détection diminuait avec l'âge ( $p = 0,024$ ). La plupart de cultures positives était détectée chez les enfants de moins de cinq ans; cela pourrait être attribué à leur faible immunité. Les données disponibles sur la détection des bactéries chez les enfants atteints d'infections respiratoires montrent que la fréquence d'*Haemophilus spp.*, de pneumocoques et de *Moraxella catarrhalis* est élevée chez les moins de 5 ans (O'Grady *et al.*, 2016).

Dans notre étude, les bactéries détectées étaient plus élevées chez les patients de sexe féminin (56,5%) que chez ceux de sexe masculin (38,5%). De même, dans une étude menée à Nakuru au Kenya, les femmes étaient plus susceptibles d'être touchées que les hommes. Les bactéries ont été isolées dans une proportion plus élevée chez femmes (32,1%) par rapport aux hommes (20%) respectivement, même si cette distribution n'était pas significativement différente ( $p = 0,231$ ) (Matu M *et al.*, 2014). Mais beaucoup de données disponibles ne montrent pas de telles tendances. Les différences, le cas échéant, pourraient être dues aux spécificités sociodémographiques et biologiques de la population.

Les signes cliniques suivants étaient associés à la culture bactérienne: conjonctivite, dyspnée et l'absence de myalgie. Ceci est différent d'une étude réalisée au Kenya où la fièvre, une fréquence respiratoire élevée, la toux et le stridor étaient associés à la croissance bactérienne. En réalité, les différences dans les résultats de cette étude pourraient être attribuées à la différence dans la population étudiée et éventuellement à la différence physiologique des sujets de l'étude (Matu M *et al.*, 2014).

## III.2 IDENTIFICATION ET DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES *Haemophilus*

### III.2.1 Caractéristiques de la population d'étude à culture positive pour les *Haemophilus*

Quatre-vingt-quinze isolats d'*Haemophilus* provenant de 440 patients (21,6%) souffrant d'infections des voies respiratoires ont été collectés, dont 62,1% chez les patients de sexe féminin (59/95). Comme indiqué dans le tableau XIV, 77% des isolats d'*Haemophilus* (74/95) provenaient d'enfants.

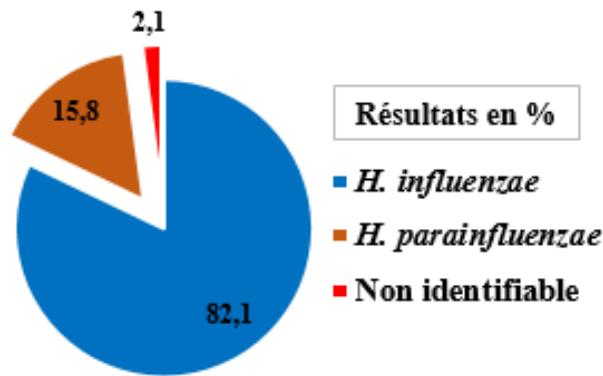
**Tableau XIV: Caractéristiques de la population d'étude**

Caractéristiques des patients	Hôpital Jamot (%)	CHE (%)	Total (%)
Genre			
Masculin	10 (40)	26 (37,1)	36 (37,9)
Féminin	15 (60)	44 (62,9)	59 (62,1)
Age médian (EI)	37.7 (27.4-54.7)	2.4 (0.8-4.1)	3.2 (1.1-10.6)
Groupe d'âge (an)			
< 5	2 (8)	64 (91,4)	66 (69,5)
5-17	2 (8)	6 (8,6)	8 (8,4)
>17	21 (84)	0	21 (22,1)
<b>Total (%)</b>	<b>25 (100)</b>	<b>70 (100)</b>	<b>95 (100)</b>

CHE: Centre Hospitalier d'Essos; EI: Ecart interquartile

### III.2.2 Test des facteurs de croissance

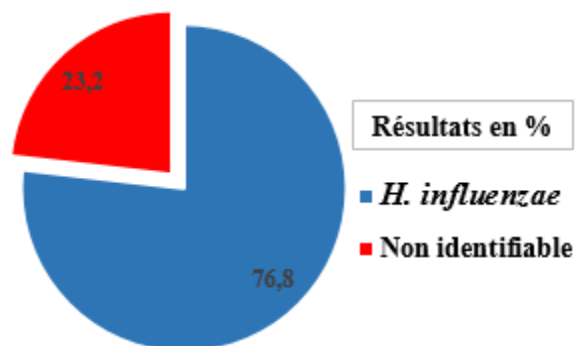
L'identification des *Haemophilus* à partir des facteurs de croissance a révélé des proportions différentes telles que illustrée par la figure 17. Au total, 82,1% des isolats étaient identifiés comme *H. influenzae* (78/95), 15,8% comme *H. parainfluenzae* (15/95) et 2,1% d'isolats étaient non identifiables (2/95).



**Figure 17: Proportion des espèces d'*Haemophilus* identifiées à partir des facteurs de croissance**

### III.2.3 Identification par PCR

Par PCR, 74,7% des isolats (71/95) étaient positifs pour l'amplification du gène *ompP2*, 78,9% d'isolats l'étaient pour le gène *fucK* (75/95), 73,7% l'étaient pour le gène *iga* (70/95), 100% l'étaient pour le gène *hpd*. En combinant les résultats de l'amplification du gène *ompP2* et ceux de l'amplification simultanée des gènes *fucK*, *hpd* et *iga*, 76,8% des isolats étaient *H. influenzae* (73/95). Les 23,3% restant étaient non identifiables par PCR (figure 18).



**Figure 18: Proportion des espèces d'*Haemophilus* identifiées par PCR**

### III.2.4 Identification par MALDI-TOF

Le MALDI-TOF a permis d'identifier 4 espèces d'*Haemophilus* illustrée par la figure 19. Il s'agissait de 77,9% de *H. influenzae* (77/95), 14,7% de *H. haemolyticus* (14/95), 6,3% de *H. parainfluenzae* (6/95) et 1,1% de *H. parahaemolyticus* (1/95).



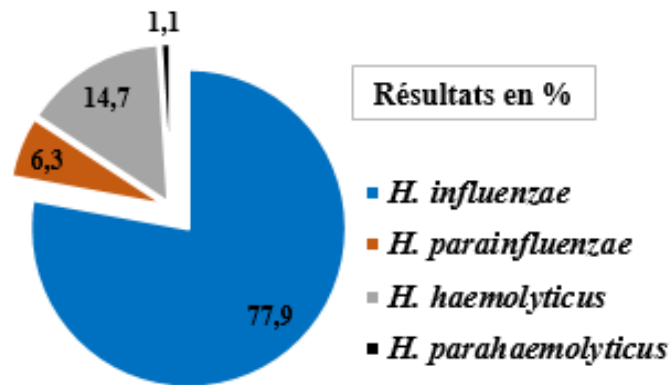


Figure 19: Proportion des espèces d'*Haemophilus* identifiées par MALDI-TOF

### III.2.5 Identification par rMLST

Par *rMLST*, trois espèces d'*Haemophilus* ont été identifiées (figure 20). Les *H. influenzae* représentaient 76,8% (73/95), les *H. haemolyticus* représentaient 14,7% (14/95) et 8,4% pour *H. segnis* (8/95).

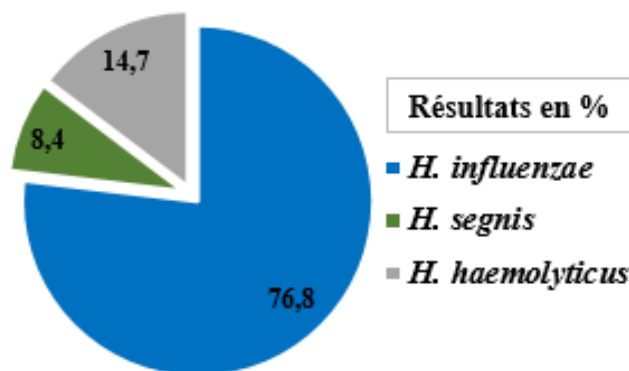
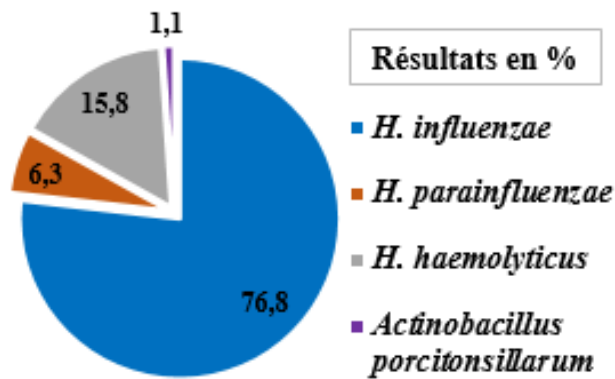


Figure 20: Résultat de l'identification des *Haemophilus* par rMSLT

### III.2.6 Identification des *Haemophilus* par BLAST du gène *rpoB* et du génome entier

Quatre espèces d'*Haemophilus* ont été identifiées par BLAST du gène *rpoB* et du génome entier (Figure 21). Les *H. influenzae* représentaient 76,8% des *Haemophilus* (73/95), 15,8% pour les *H. haemolyticus* (15/95) 6,3% pour les *H. parainfluenzae* (6/95) et 1,1% pour *Actinobacillus porcitonisillarum* (1/95).



**Figure 21: Résultat de l'identification des *Haemophilus* par BLAST du gène *rpoB* et du génome entier**

### III.2.7 Évaluation de la performance des techniques

La comparaison des différentes techniques d'identification a montré des accords forts et presque parfaits dans l'ensemble (Tableau XV).

Un ensemble de 95 isolats d'*Haemophilus* a été examiné à l'aide par 4 techniques d'identification : Facteurs de croissance (tests biochimiques), PCR (amplification d'un gène cible), MALDI-TOF (protéomique), rMLST et BLAST (séquençage du génome entier). Le coefficient Kappa de Cohen pour l'identification des espèces *Haemophilus* cibles ont été calculés en prenant comme référence le rMLST. Le résultat d'amplification du gène *ompP2* par PCR a été utilisé pour la comparaison avec le rMLST. De ce fait, la comparaison entre PCR et rMLST était basée sur l'identification des *H. influenzae* uniquement. La valeur de Kappa pour la concordance entre les résultats des tests aux facteurs de croissance était la plus faible (kappa = 0,767) mais ayant un bon accord. L'accord presque parfait a été obtenu entre le rMLST et le BLAST du gène *rpoB* de même que le BLAST du génome entier (kappa = 0,971) ; pareille que pour la PCR dont une cible (gène *ompP2*) était identifiée (kappa = 0,943).

**Tableau XV: Résultats d'évaluation de performance entre les différentes techniques d'identification**

Techniques	Concordance (%)	Coefficients kappa
rMLST et Facteurs de croissance	76,8	0,767
rMLST et MALDI-TOF	89,5	0,91
rMLST et <i>gyrA</i>	83,2	0,775
rMLST et <i>rpoB</i>	90,5	0,971

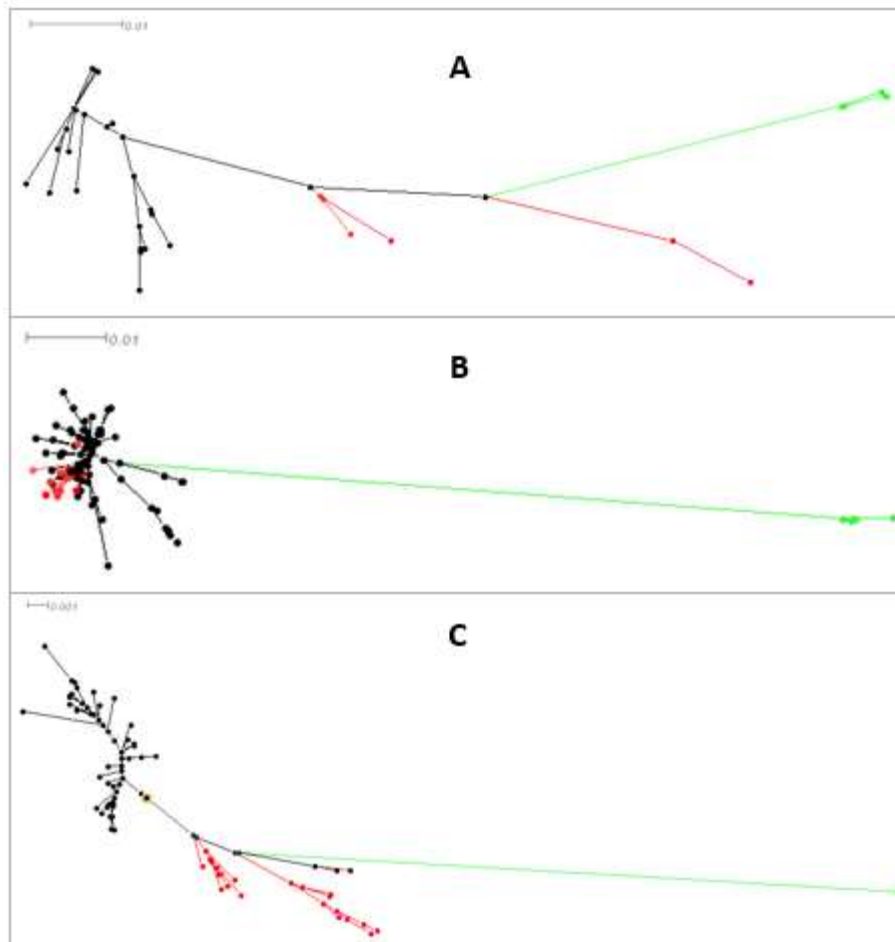
Sur les 95 isolats d'*Haemophilus*, 73 étaient *H. influenzae* (76,8%), 15 *H. haemolyticus* (15,8%), 6 *H. parainfluenzae* (6,3%) et 1 *Actinobacillus porcitonisillarum* (1,1%). Le rMLST a identifié tous les *H. parainfluenzae* et *Actinobacillus porcitonisillarum* comme des *Aggregatibacter segnis*. MALDI-TOF a identifié *Actinobacillus porcitonisillarum* comme étant *H. parahaemolyticus*. La concordance d'identification entre le BLAST génome entier, *rpoB* et MALI-TOF était de 98,9%. Celle entre le rMLST et BLAST *rpoB* était de 90,5%. Le score d'identification de rMLST était de 81% pour *H. segnis*.

### III.2.8 Biotypage

Les tests biochimiques pour la détermination des biotypes ont révélés que les 73 isolats de *H. influenzae* étaient de biotype II (31,5%), I (20,5%), III (17,8%), IV (15,1%), V (9,6%), VIII (2,7%), VI (1,4%) et VII (1,4%). Les six isolats de *H. parainfluenzae* étaient du biotype I (100%). La classification de biotype selon *H. influenzae*, les isolats de *H. haemolyticus* ont été groupés comme suit: 33,3% du biotype IV (5/15), 26,6% du biotype III (4/15), 13,3% des biotypes I et VI (2/15 chacun), 6,7% des biotypes VII et VIII (1/15 chacun).

### III.2.9 Étude de la diversité génétique des *Haemophilus*

Le lien phylogénétique entre les espèces d'*Haemophilus* a été établi à partir de l'alignement des séquences protéiques des gènes *ftsI*, *gyrA* et *rpoB* (figure 22). Certains isolats de *H. haemolyticus* étaient groupés avec *H. influenzae* (figure 22B). En outre, des isolats positifs par PCR (gène *ompP2*) et présentant un profil MLST incomplet étaient regroupés avec *H. haemolyticus* et *H. parainfluenzae* (Figure 22C). L'arbre phylogénétique à partir du gène *gyrA* (figure 22B) était moins individualisé par rapport à celui de *ftsI* (figure 22A) qui donnait un meilleur profil, avec les différentes espèces bien regroupées.

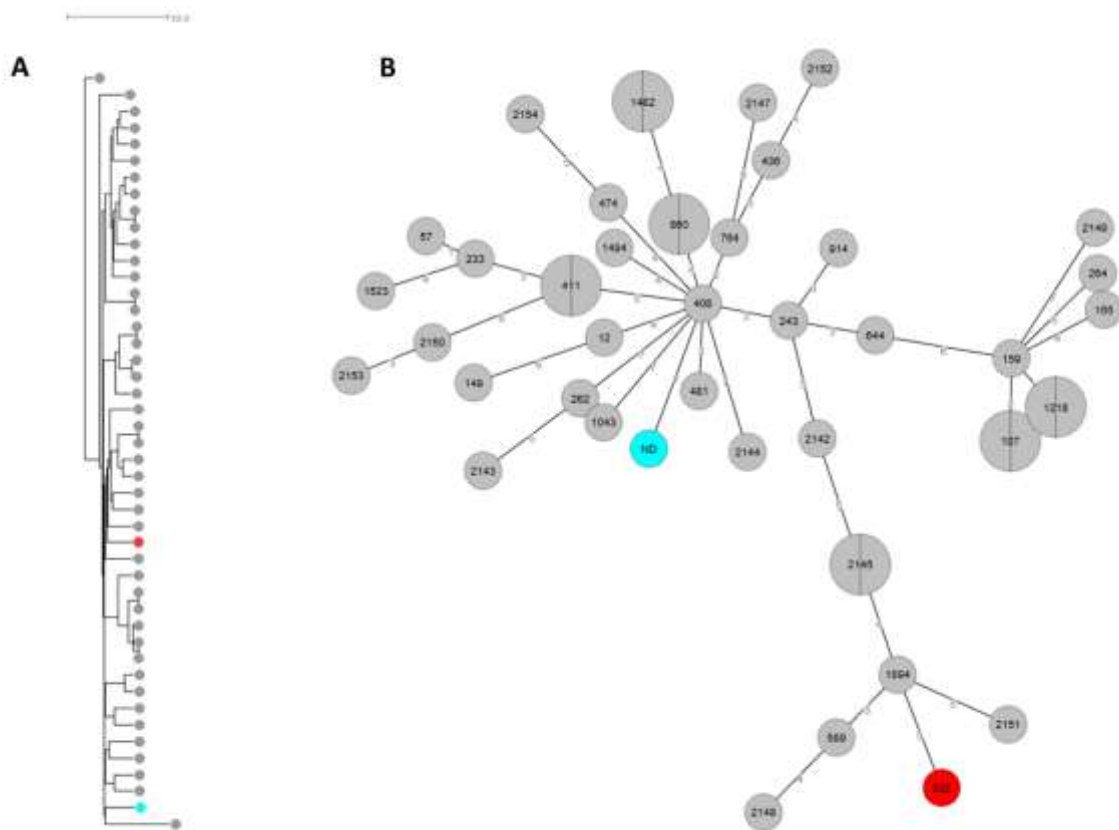


**Figure 22: Arbres SplitsTree de Neighbor-Net générés à l'aide de SplitsTree4 pour visualiser les espèces d'*Haemophilus* isolées chez des patients présentant des infections respiratoires.**

Les arbres montrent les liens génétiques des espèces *Haemophilus* sur la base de trois gènes: *ftsI* (A), *gyrA* (B) et *rpoB* (C). La couleur noire représente *Haemophilus influenzae*; la couleur verte indique *Haemophilus parainfluenzae*, la couleur rouge représente *Haemophilus haemolyticus*.

Parmi les 73 isolats de *H. influenzae*, 46 avaient un profil MLST complet (Annexe 18) avec les sept gènes de ménage (*adk*, *atpG*, *fucK*, *frdb*, *mdh*, *pgi* et *recA*). Les 27 isolats restants étaient dépourvus d'un ou de plusieurs gènes de ménage et la base de données MLST n'attribue pas de ST à des souches dont l'un des sept loci est manquant. Un arbre phylogénique a été construit à partir d'un dendrogramme afin de montrer le lien de parenté génétique entre les 46 isolats de *H. influenzae* ayant le profil complet avec les sept allèles ciblés extraits du génome entier (figure 23). Parmi les 40 différentes ST, 11 étaient nouvelles. Les nouvelles ST décrites pour la première fois sont les suivantes (code attribué avant soumission des ST dans le site MLST):

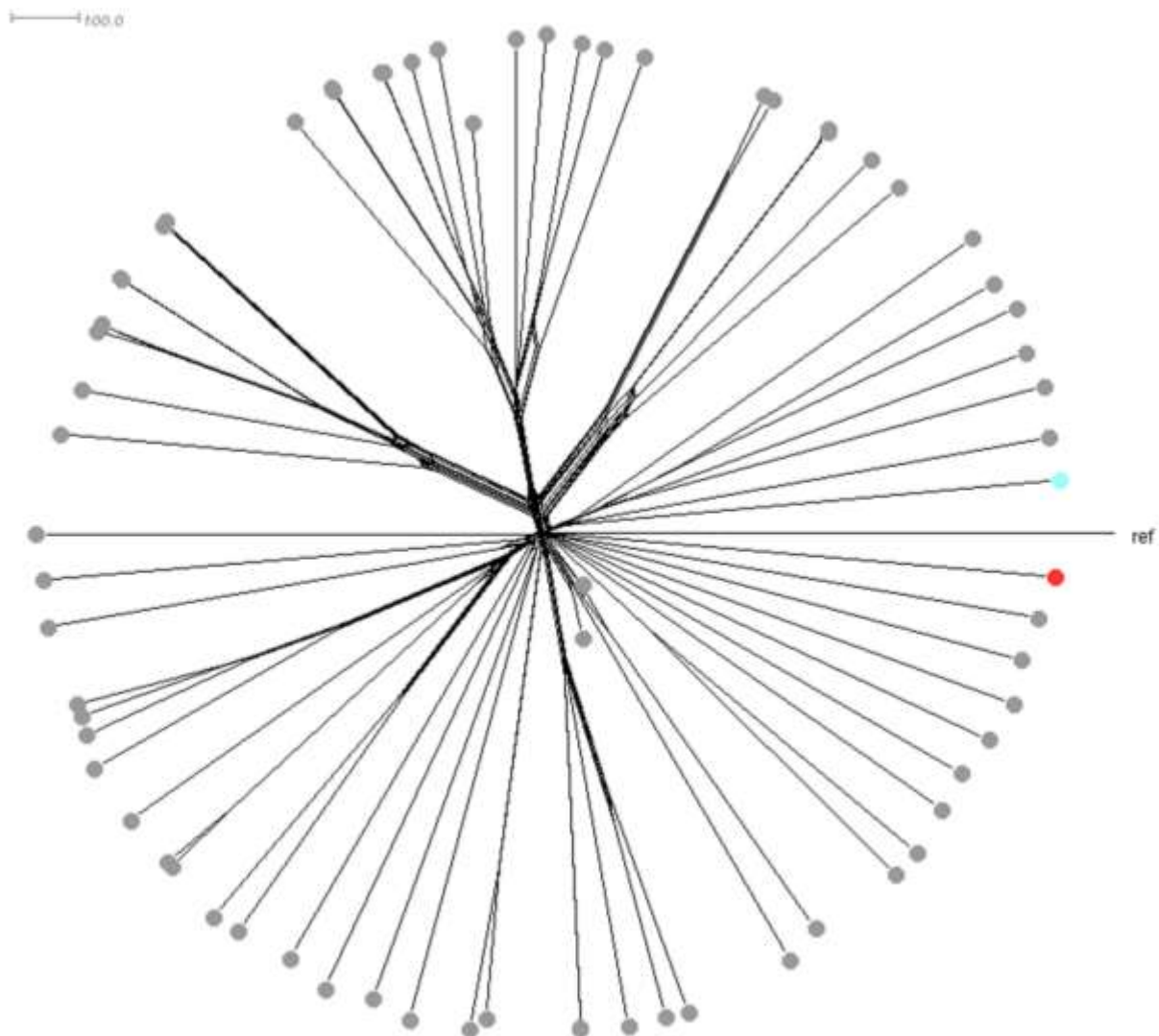
ST-2152, ST-2150, ST-2144, ST-2145, ST-2143, ST-2147, ST-2151, ST-2148, ST-2154, ST-2149 et ST(22;146;11;43;35;18;15). Des isolats ayant un profil MLST complet, 7 ST étaient rencontrées deux fois (ST-12, ST-107, ST-411, ST-860, ST-1218, ST-1482 et ST-2145) et les 33 ST restantes étaient représentées par un seul isolat. L'algorithme eBURST a généré des différentes 40 ST, un complexe clonal et 46 singletons, révélant un niveau élevé de diversité génétique dans la structure de la population des *Haemophilus influenzae*. L'indice de diversité de Simpson était de 1 avec un intervalle de confiance de 95%: [1 ; 1].



**Figure 23: Liens phylogénétiques entre les isolats de *H. influenzae*.**

A : Arbre UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) de des séquences de *H. influenzae* construit à partir des sept loci de MLST. La distance de liaison indique le nombre de substitutions de nucléotides. B : Un grapeTree basé sur les 7 loci MLST des isolats avec des données MLST complètes. Les nœuds ont été dessinés à l'échelle en fonction du nombre d'isolats (indiqué par le diagramme circulaire) de chaque nœud. Les branches entre les nœuds ont été dessinées à l'échelle et le nombre d'allèles différents entre les deux nœuds connectés est indiqué sur la branche. Le nœud gris correspond à des isolats non typables. Les deux isolats typables (capsulés) sont indiqués en rouge (sérotipe b) et cyan (sérotipe f).

L'analyse GrapeTree a également montré une structure très diversifiée de l'arbre phylogénétique et peu d'isolats étaient liés par moins de trois allèles différents des 7 gènes MLST (Figure 23). Les métadonnées de ces 46 isolats étaient également très diverses. En tenant compte des isolats dépourvus d'un ou plusieurs gènes de ménage MLST, l'ensemble des 73 isolats comparés en utilisant l'analyse du génome entier avec «*Gene Comparator*» sur PubMLST (Rd KW20 comme souche de référence) a également montré une structure très diversifiée (Figure 24).



**Figure 24:** Profils alléliques neighbour-network des 73 isolats de *H. influenzae* par rapport aux loci annotés de la souche de référence Rd KW20.

Chaque isolat est représenté par un cercle et la couleur du cercle indique le sérotype de l'isolat correspondant. Les isolats non typables sont représentés par un cercle gris. Les deux isolats typables (capsulés) sont indiqués en cercle rouge (sérotype b) et cyan (sérotype f). ref : souche de référence Rd KW20.

### III.2.10 Discussion partielle

L'identification rapide et précise des agents pathogènes bactériens est très importante pour la mise en œuvre rapide de la gestion des cas, du contrôle stratégique et surveillance des maladies (Wang *et al.*, 2011). La discrimination des espèces étroitement apparentées *H. influenzae*, *H. parainfluenzae* et *H. haemolyticus* revêt une importance diagnostique en raison de leurs différences en terme de pouvoir pathogène. Une identification fiable de *H. haemolyticus* et une discrimination de *H. influenzae* pathogène sont importantes à des fins diagnostiques et épidémiologiques (Frickmann *et al.*, 2013).

Les méthodes d'identification phénotypique des espèces d'*Haemophilus* ont montré un bon accord par rapport à la méthode protéomique (MALDI-TOF) et génotypique qui ont montré un accord presque parfait. L'approche génotypique était réalisée par BLAST du gène de la sous-unité bêta de l'ARN polymérase (*rpoB*) et du génome entier. L'ensemble des différentes approches d'identification a permis d'identifier à partir des 95 isolats d'*Haemophilus*, 76,8% de *H. influenzae*, 15,8% de *H. haemolyticus*, 6,3% de *H. parainfluenzae* et 1,1% de *A. porcitonisillarum*. Les résultats similaires rapportant ces trois espèces d'*Haemophilus* avaient déjà été observés en Australie chez les enfants atteints de toux chronique (Hare *et al.*, 2015).

Dans cette étude, le taux d'identification de *H. influenzae* et *H. haemolyticus* était différent de ce qui avait été déjà émis par d'autres chercheurs en Angleterre avec 93,7% et 6,3% respectivement (Osman *et al.*, 2018) ou aux USA avec 39,5% de *H. haemolyticus* (Murphy *et al.*, 2007) et 1,5% de *H. haemolyticus* identifiés en Australie (Zhang *et al.*, 2014). En effet, l'identification phénotypique suggère que jusqu'à 40% des isolats d'*Haemophilus* sont des *H. haemolyticus*. La similitude génétique de *H. influenzae* et *H. haemolyticus* limite le pouvoir des techniques moléculaires simples telles que la PCR pour la discrimination d'espèce (E. Meats *et al.*, 2003). Le taux d'erreur d'identification de *H. haemolyticus* en tant que *H. influenzae* ou *H. parainfluenzae* était relativement élevé dans cette étude au regard des résultats des tests basés sur les facteurs de croissance et l'approche moléculaire.

La PCR détectant les gènes marqueurs spécifiques de l'espèce tels que la fuculose kinase (*fucK*), la protéine D (*hpd*) et l'IgA protéase (*iga*) pour *H. influenzae* et *H. haemolyticus* a été utilisée pour différencier les espèces, mais aucune n'était suffisamment spécifique pour être utilisée seule. Le marqueur d'identification *hpd* n'a pas permis de différencier *H. influenzae* de *H. haemolyticus* comme démontré dans l'étude de Theodore

(Theodore *et al.*, 2012) car l'amplification du gène *hpd* était à la fois positive pour *H. influenzae* et les autres espèces *Haemophilus*.

Historiquement, *H. influenzae* a été l'espèce la plus importante des *Haemophilus* isolée chez les personnes souffrant d'infection des voies respiratoires. *H. influenzae* est le plus pathogène des 8 espèces d'*Haemophilus* qui résident comme les 46 commensaux des voies respiratoires chez l'homme (McCrea *et al.*, 2008). La détection d'autres espèces d'*Haemophilus* dans ces infections en Afrique n'est pas rapportée fréquemment. Ceci serait dû au fait qu'elles soient considérées comme des bactéries commensales. Par ailleurs, *H. haemolyticus* a été déjà signalé comme agent étiologique dans les infections invasives aux États-Unis (R. Anderson *et al.*, 2012).

Le MALDI-TOF a eu une bonne concordance d'identification avec le rMLST et le BALST du génome entier en permettant d'identifier les trois espèces d'*Haemophilus* (*H. influenzae*, *H. haemolyticus* et *H. parainfluenzae*). La concordance d'identification entre le BLAST du génome entier, *rpoB* et le MALDI-TOF était de 98,9%. Celle entre le rMLST et le BLAST *rpoB* était de 90,5%. L'aptitude de MALDI-TOF à distinguer les 3 espèces : *H. influenzae* de *H. haemolyticus* et *H. parainfluenzae* a déjà été décrite (Bruin *et al.*, 2014; Frickmann *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2013). Néanmoins, la disponibilité d'un spectre de référence bien défini pour *H. haemolyticus* et *H. parainfluenzae* dans la base de données appliquée constitue un préalable important à cet égard. Il faut noter que les spectres de *H. haemolyticus* et de *H. influenzae* sont très similaires et que la variabilité intraspécifique est considérable. MALDI-TOF a identifié *A. porcinosillarum* comme étant *H. parahaemolyticus* et une souche de *H. haemolyticus* (6,7% ; 1/15) comme étant *H. influenzae*. La disponibilité des spectres de référence spécifiques de *H. influenzae* et de *H. haemolyticus* permettra d'obtenir les meilleures concordances avec le spectre spécifique à l'espèce. Cependant, la distance spectrale des spectres de *H. haemolyticus* et de *H. influenzae* ne permet pas une large marge de sécurité pour l'identification. Dans une étude similaire à celle-ci, 12% (IC 95%: 4,5-24,3) des souches de *H. influenzae* correspondaient à un spectre de *H. haemolyticus* avec un score pouvant théoriquement conduire à des erreurs d'identification (Frickmann *et al.*, 2013). La performance de MALDI-TOF pour l'identification de *H. haemolyticus* et de *H. influenzae* dépend fortement d'un spectre de référence bien défini pour *H. haemolyticus* dans les bases de données pour ces espèces, qui varie d'un laboratoire à l'autre (Frickmann *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2013). Son utilité pour la discrimination entre *H. haemolyticus* et *H. influenzae* nécessite une amélioration continue. Par ailleurs, aucune erreur d'identification n'a été observée pour *H. parainfluenzae*



car le score était de 100%. Au regard des limites de l'identification phénotypique et par PCR et du faible taux d'erreur d'identification observé avec le MALDI-TOF, ce dernier présente l'avantage d'intégrer un débit élevé, la précision et la rapidité. C'est une excellente méthode pour différencier les espèces *Haemophilus* et bien d'autres micro-organismes.

De nombreuses méthodes d'identification à partir du séquençage ont été développées pour les bactéries. Dans cette étude, l'identification des espèces *Haemophilus* à partir du séquençage du génome entier par BLAST (BLAST de la séquence *rpoB*) et par *rMLST* a été réalisée en vue de comparer ces méthodes. *H. parainfluenzae* n'était pas identifiable par *rMLST* et par défaut rendu en *H. segnis* avec un score de 81%. La non identification des isolats de *H. parainfluenzae* par *rMLST* pourrait être dû au fait que la base de données ne contienne pas tous les gènes codant pour les 53 protéines ribosomales. De plus, *H. parainfluenzae* est étroitement apparenté à *H. segnis* de par leurs similitudes phénotypiques et génomiques (Lau *et al.*, 2004; Nørskov-Lauritsen, 2014).

Par ailleurs la concordance entre le BLAST du génome entier et le gène *rpoB* avait une concordance de 100%. La comparaison des séquences du gène *rpoB* est utilisée pour les analyses phylogénétiques chez les bactéries (Rowland GC *et al.*, 1992) et constitue un outil puissant pour leur identification (Mollet *et al.*, 1997). Cette séquence présente quelques spécificités : La haute résolution du marqueur *rpoB* qui permet de révéler une variation moléculaire jusqu'au niveau de la population. La divergence génétique de *rpoB* correspond mieux à la divergence génomique globale et fournit un meilleur support bootstrap pour la reconstruction phylogénétique. Étant donné que *rpoB* est un gène codant pour une protéine, les données générées à partir de ce marqueur sont plus facilement interprétées dans un cadre évolutif (Case *et al.*, 2007). Le séquençage du gène *rpoB* permet une détection et une identification bactériennes robustes, reproductibles et précises. Cela pourrait également permettre la reclassification des espèces et la détection de nouveaux organismes, y compris d'organismes non encore cultivés présents dans les communautés bactériennes (Adekambi *et al.*, 2009).

La différence d'identifications des *Haemophilus* par les facteurs de croissance et la PCR par rapport au séquençage met en évidence les difficultés d'identification de ces bactéries. Dans d'autres études, des différences ont été trouvées entre les cibles de la PCR. L'explication de cette différence est que certaines espèces *Haemophilus* partagent certaines séquences de gènes similaires qui peuvent être facilement discriminées par séquençage. Même si les valeurs kappa pour la concordance entre les résultats de l'identification bactériologique étaient bonnes, le

séquençage et le MALDI-TOF sont préférables aux autres identifications des *Haemophilus*. En effet, le séquençage du génome entier est un outil précieux pour mieux comprendre la génétique des bactéries et pour les identifier (Hu *et al.*, 2016).

Au fur et à mesure que la capacité bioinformatique des laboratoires s'améliore et que les coûts d'acquisition du système diminuent, les outils de détection moléculaire avancés tels que les séquenceurs et le MALDI-TOF peuvent être largement utilisés dans les laboratoires de microbiologie de diagnostic, de santé publique et de recherche principalement. Cependant, des méthodes rapides et peu coûteuses à haut débit, telles que la PCR, restent utiles dans ces laboratoires pour le diagnostic et la surveillance des maladies infectieuses (Hu *et al.*, 2016).

Les séquences peptidiques issues des gènes *rpoB*, *gyrA*, *ftsI* et le profil *MLST* ont été analysés en tant qu'outils pour analyser la phylogénie des espèces d'*Haemophilus*. L'appréciation des relations phylogénétiques entre les 3 espèces d'*Haemophilus* à savoir *H. influenzae*, *H. haemolyticus* et *H. parainfluenzae* variait suivant le gène cible. La classification phylogénétique à partir du gène *gyrA* était moins discriminante par rapport à celles de *ftsI* et *rpoB* qui donnaient un meilleur profil, avec les différentes espèces bien regroupées. En effet, la séquence peptidique issue du gène *gyrA* a déjà été utilisée comme marqueur pertinent pour la classification phylogénétique chez les bactéries (Menard *et al.*, 2016; Shamsi *et al.*, 2017). Par ailleurs, le gène *rpoB* offre une résolution phylogénétique améliorée. Ceci est particulièrement pertinent lorsque pour l'étude de la diversité des sous-espèces dans lesquelles l'analyse du gène *rpoB* à copie unique pourrait être utilisée pour compléter les informations (Adekambi *et al.*, 2003; Itoh *et al.*, 2003; Kurabachew *et al.*, 2008). Le *MLST* et le séquençage du gène *ftsI* représentent aussi un outil puissant pour l'analyse de la phylogénie des espèces d'*Haemophilus* (Deghmane *et al.*, 2019; Skaare *et al.*, 2014). L'arbre phylogénétique obtenu à partir de l'alignement multiple de séquences d'acides aminés déduite des séquences d'ADN de tous les allèles *ftsI* permet de définir 4 groupes de résistance des *H. influenzae* aux  $\beta$ -lactamines (Deghmane *et al.*, 2019) et 3 groupes ont été décrits dans cette étude.

Des 73 isolats de *H. influenzae* soumis au séquençage du génome entier, seuls 46 avaient le profil *MLST* complet avec les 7 gènes de ménage. Le *MLST* a été choisi pour le fait qu'il s'agit de la meilleure méthode pour typer les séquences d'ADN de gènes de ménage sélectionnés d'isolats bactériens (Kozarewa *et al.*, 2009). Le profil *MLST* a montré un pouvoir discriminant élevé, car il était capable de différencier ST-57 et ST-233, deux isolats très similaires qui ne différaient que d'un locus sur les sept. En termes de liens phylogénétiques, les

47 isolats ont montré une grande diversité génétique avec plusieurs ST qui correspondaient à de nouvelles ST incluses dans la base de données pubmlst. Il est à noter que l'unique isolat du sérotype b appartenait au ST-222 qui est assez différent du ST-6 auquel appartient la majorité des isolats invasifs du sérotype b (Deghmane *et al.*, 2019). Aucune association n'a été trouvée entre la ST et d'autres paramètres cliniques et démographiques. Les isolats de *H. influenzae* étant constitués principalement de *H. influenzae* non typables seraient très éloignés en raison de la faible pression évolutive permettant des mutations dans leur génome. En effet, des résultats similaires ont déjà été rapportés aux Etats-Unis d'Amérique, en Espagne et en Italie avec une très grande diversité génétique parmi les isolats de *H. influenzae* non typables (Giufre *et al.*, 2018; Puig *et al.*, 2013; Schumacher *et al.*, 2012). Les souches capsulées sont plus conservées dans leur génome mais leur profil MLST n'était pas complet pour ces souches.

### III.3 IDENTIFICATION DU TYPE CAPSULAIRE ET ÉVALUATION DE L'IMPACT DE LA VACCINATION CONTRE *Haemophilus influenzae* SÉROTYPE b

#### III.3.1 Taux de couverture vaccinale

Des 95 isolats issus de l'étude, ceux de *H. influenzae* obtenus chez 73 patients ont été analysés (tableau XVI ci-dessous). L'état d'immunisation des patients était différent suivant les tranches d'âge ( $p < 0,001$ ) : 84,9% de patients (62/73) qui étaient vaccinés contre *hib* étaient âgés de 6 semaines à 10 ans. Les patients non vaccinés étaient constitués de patients âgés de plus de 10 ans (13,7%) et de moins de 6 semaines (1,4%) (Figure 25).

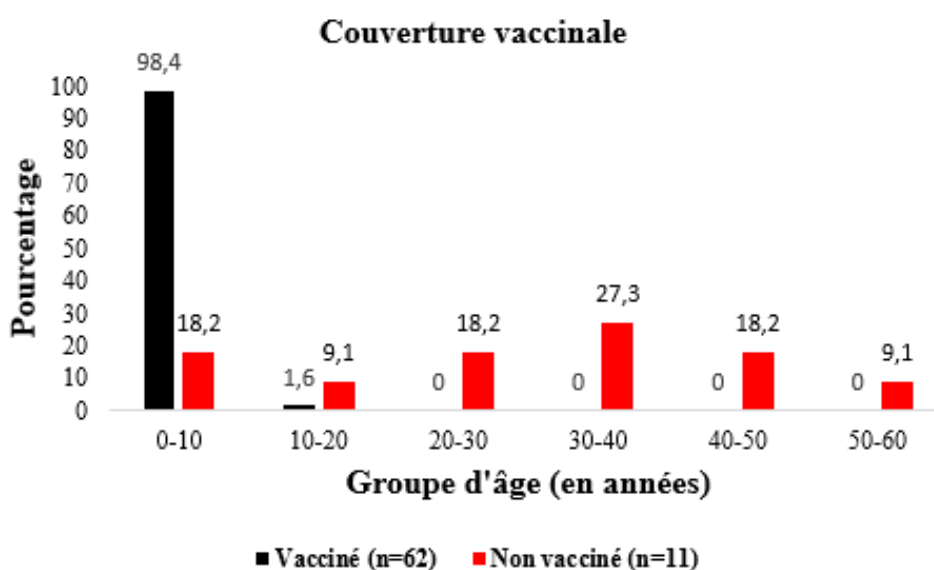


Figure 25: Taux de couverture du vaccin contre *Haemophilus influenzae* type b suivant le groupe d'âge dans les sites d'étude.

#### III.3.2 Détermination du type capsulaire (sérotipe) des *H. influenzae*

Parmi les 73 isolats de *H. influenzae*, 3 isolats capsulés étaient identifiés (4,1%) chez des patients par le test d'agglutination, la PCR et le séquençage du génome entier avec un accord de 100%. Ces sérotypes étaient de type b, e et f. Parmi les 73 isolats, 70 étaient non capsulés, soit 95,9% des souches. L'isolat de sérotipe b était obtenu chez un enfant de 12 ans non immunisé contre *hib*. Les sérotypes e et f sont survenus chez des patients âgés respectivement de 1 et 33 ans. Parmi les isolats capsulés, 66,7% (2/3) étaient rencontrés chez les patients non vaccinés et âgés de plus de 10 ans ( $p = 0,011$  et  $p = 0,015$  respectivement).

**Tableau XVI: Caractéristiques de la population d'étude pour la détermination du type capsulaire**

Caractéristiques	N=73	HJ (n=12)	CHE (n=61)	Couverture vaccinale (%)	Sérotype
Genre					
Masculin	29	5	24	26 (89,7)	<i>H. influenzae non typables</i>
Féminin	44	7	37	36 (81,8)	b, e, f et <i>H. influenzae non typables</i>
Age médian (EI)	2,9 (0,9-4,6)	29,9 (7,8-38,6)	1,7 (0,9-4)	/	/
Groupe d'âge					
< 5	58	2	56	56 (94,9)	e
5-10	7	2	5	6 (85,7)	<i>H. influenzae non typables</i>
>10	9	8	1	0	b, f
Échantillon clinique					
Écouvillon nasopharyngé	63	2	61	/	b, e
Liquide pleural	2	2	/	/	<i>H. influenzae non typables</i>
Lavage broncho-alvéolaire	3	3	/	/	f
Expectoration	5	5	/	/	<i>H. influenzae non typables</i>

/: Non applicable; CHE: Centre Hospitalier d'Essos ; *H. influenzae non typables* : *Haemophilus influenzae non capsulé*

### III.3.3 Impact de la vaccination contre *Haemophilus influenzae* type b

Chez les patients vaccinés, *H. influenzae* type b n'a été détecté chez aucun (figure 26). Par ailleurs, parmi les patients non vaccinés, un cas d'*Haemophilus influenzae* type b a été détecté représentant 9,1% (1/11).

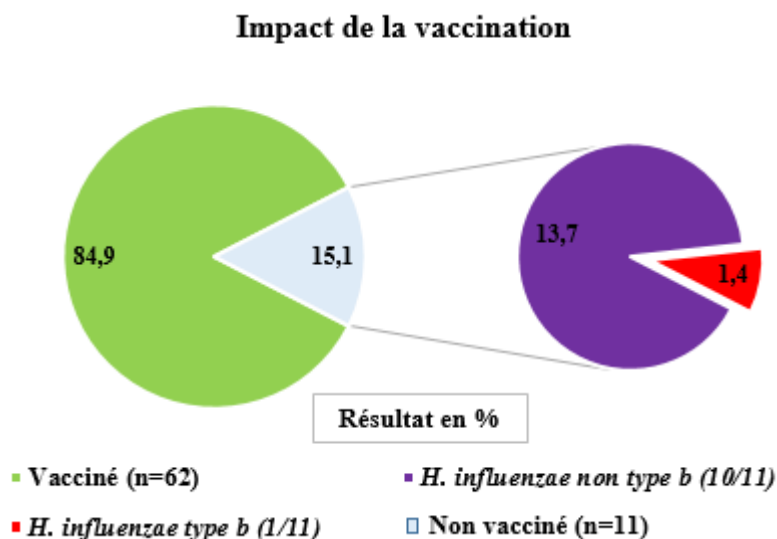


Figure 26: Impact de la vaccination sur la circulation d'*Haemophilus influenzae* type b

### III.3.4 Discussion partielle

*H. influenzae* est à l'origine de plus de 3 millions de cas de maladies graves, principalement les méningites et les pneumonies chez les enfants de moins de 5 ans, provoquant environ 386 000 décès chaque année dans le monde (Deraz *et al.*, 2012). Dans cette étude, les *H. influenzae* non typables (non capsulés ou non sérotypables) représentaient 95,9% des isolats de *H. influenzae* (70/73). Ce résultat est comparable à celui obtenu dans d'autres études dans lesquelles les *H. influenzae* non typables sont davantage isolés chez les patients présentant une infection des voies respiratoires (Behrouzi *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2011; Setchanova *et al.*, 2013). *H. influenzae* non typable est une menace majeure pour la santé publique, en particulier dans les pays en développement, et est responsable d'infections de l'oreille moyenne et de plusieurs maladies infectieuses des voies respiratoires chez l'homme, telles que la pneumonie, la sinusite et la maladie pulmonaire obstructive chronique (Behrouzi *et al.*, 2017; Cerquetti & Giufrè, 2016; Roier *et al.*, 2012).

Les *H. influenzae* non typables sont de plus en plus reconnus comme agents pathogènes émergents. L'immunisation systématique des nourrissons avec des vaccins conjugués contre *H. influenzae* de type b (*hib*) a considérablement réduit l'incidence des maladies invasives à *hib*.

Cependant, un changement marqué du sérotype invasif prédominant b à *H. influenzae* non typables s'est produit. La mise en œuvre de vaccins conjugués contre le pneumocoque a entraîné des changements dans la fréquence des pathogènes colonisateurs du nasopharynx avec une augmentation de *H. influenzae* non typables, bien que cette hypothèse soit très controversée (Cerquetti & Giufrè, 2016). Actuellement, il n'existe pas de vaccin homologué contre *H. influenzae* non typables disponible dans le commerce (Roier *et al.*, 2012) et en raison du manque de vaccins efficaces, ainsi que de la propagation et de la prévalence des *H. influenzae* non typables dans le monde, il est urgent de concevoir et de développer des vaccins candidats efficaces contre ces souches. Ces bactéries expriment plusieurs protéines de la membrane externe, dont certaines ont été étudiées en tant que candidats au développement de vaccins. L'absence de capsule de protection, la forte hétérogénéité antigénique et les fortes variations des antigènes exposés constituent des obstacles importants à la mise au point de vaccins efficaces contre *H. influenzae* non typables. Par conséquent, les études portant sur le développement de vaccins se sont concentrées sur la zone protectrice des protéines de la membrane externe, du lipooligosaccharide et des pili. À cette fin, divers vaccins candidats ont été développés avec l'immunogénicité de la protéine D, offrant une protection élevée contre *H. influenzae* non typables (Behrouzi *et al.*, 2017).

La proportion des *H. influenzae* de type b était de 1,4% (1/73), proportion très faible comparée aux 27,7% chez les patients atteints de méningite bactérienne aiguë signalée avant la couverture vaccinale au Cameroun (Gervais *et al.*, 2012). Depuis l'introduction du vaccin, l'incidence des infections à *hib* a diminué drastiquement, et s'en est suivi l'émergence d'autres types capsulaires et surtout des *H. influenzae* non typables. Avant le vaccin anti-*hib* dans de nombreux pays, la plupart des infections invasives à *H. influenzae* étaient dues à *hib* et le taux de colonisation chez les nourrissons était de 3 à 5% (Agrawal & Murphy, 2011). Aucun *hib* n'a été observé dans cette étude chez les patients vaccinés pouvant suggérer un effet positif du vaccin, comme c'était le cas lors de la précédente étude dans le Nord du Cameroun (Massenet & Tapindjin-Gake, 2010). Des infections à *hib* ont été rapportées chez des personnes vaccinées dans certains pays et l'échec de l'efficacité du vaccin était lié à un défaut de l'amorçage immunologique (Agrawal & Murphy, 2011; Burns *et al.*, 1985; Roberts *et al.*, 1980; von Gottberg *et al.*, 2012). Parmi les patients non vaccinés chez lesquels *H. influenzae* était isolés, 9,1% (IC 95% : 0,2-41,3) étaient infectés par *H. influenzae* de type b. Ce résultat est similaire à ceux rapportés lors d'études sur les méningites au Cameroun avec 18,5% (M. C. Fonkoua *et al.*, 2001) et 27,7% (Gervais *et al.*, 2012) avant l'introduction du vaccin conjugué dans le

programme élargi de vaccination. Avec le cas de *hib* isolé chez un participant non vacciné (ce qui signifie que cette souche circule toujours) confirmé par les résultats de la surveillance sur l'étiologie de la méningite bactérienne chez l'enfant à Yaoundé à l'ère post-vaccinale (Boula *et al.*, 2019), les mesures visant à immuniser devraient inclure les personnes de tous les groupes d'âge.



### III.4 PROFIL DE RÉSISTANCE DES ISOLATS DES *Haemophilus* AUX ANTIBIOTIQUES ET MODIFICATIONS MOLÉCULAIRES ASSOCIÉES

#### III.4.1 Caractéristiques de la population d'étude

Au total, 94 isolats étaient identifiés comme appartenant au genre *Haemophilus*. Parmi ces 94 souches, 52 soit 55,3% provenaient de patients qui avaient préalablement pris un traitement antibiotique avant le diagnostic bactériologique (Tableau XVII). Suivant le genre, 61,4% de patients féminins (35/57) étaient sous antibiotique contre 48,6% chez les patients de sexe masculins (17/35) ( $p=0,228$ ). Les patients âgés de moins de 5 ans (33%) étaient les plus nombreux à être sous traitement antibiotique ( $p=0,018$ ).

**Tableau XVII: Caractéristiques des patients et antibiothérapie préalable**

Caractéristiques	N=94	HJ	CHE	Prise préalable d'antibiotique (%)
Genre				
Masculin	35	9	26	17 (18,1)
Féminin	59	15	44	35 (37,2)
Age médian en année (EI)	3.2 (1.1-10.6)	37.7 (27.4-54.7)	2.4 (0.8-4.1)	/
Groupe d'âge (an)				
< 5	66	2	64	31 (33)
5-15	8	2	6	5 (5,2)
>15	20	20	0	16 (17)

CHE : Centre Hospitalier d'Essos ; EI : Écart interquartile ; HJ : Hopital Jamot ;

#### III.4.2 Sensibilité des isolats d'*Haemophilus* aux antibiotiques

La ceftriaxone, le céfotaxime et l'amoxicilline/acide clavulanique étaient les antibiotiques les plus actifs (100%) sur tous les isolats d'*Haemophilus*. Les principaux profils de résistance comprenaient le cotrimoxazole, l'ampicilline, le chloramphénicol et la tétracycline avec respectivement 91,5%, 55,3%, 11,7% et 10,6% (Tableau XVIII). La résistance à l'acide nalidixique et à la rifampine était de 4,2%. Concernant les isolats résistants à l'ampicilline, 14 étaient producteurs de la  $\beta$ -lactamase (26,9%) parmi lesquels 35,7%

présentaient une résistance multiple au cotrimoxazole, à la tétracycline, à la ampicilline et au chloramphénicol (5/14). Les taux d'isolats producteurs de  $\beta$ -lactamase étaient élevés chez les enfants (78,6%; 11/14). Les isolats issus des expectorations étaient plus résistants à l'acide nalidixique, la rifampicine, la tétracycline et au chloramphénicol (avec respectivement  $p=0,049$ ;  $p=0,012$ ;  $p=0,006$  et  $p=0,034$ ) comparé aux souches isolées des autres types de prélèvements. Tous les isolats à l'exception d'un seul avaient un profil de sensibilité intermédiaire pour l'érythromycine et le seul isolat résistant ne présentait aucune mutation. Le taux de multi-résistance (2 classes d'antibiotiques) était de 55,3% (52/94) et impliquait cotrimoxazole et l'ampicilline.

**Tableau XVIII: Profil de résistance des isolats d'*Haemophilus* aux antibiotiques**

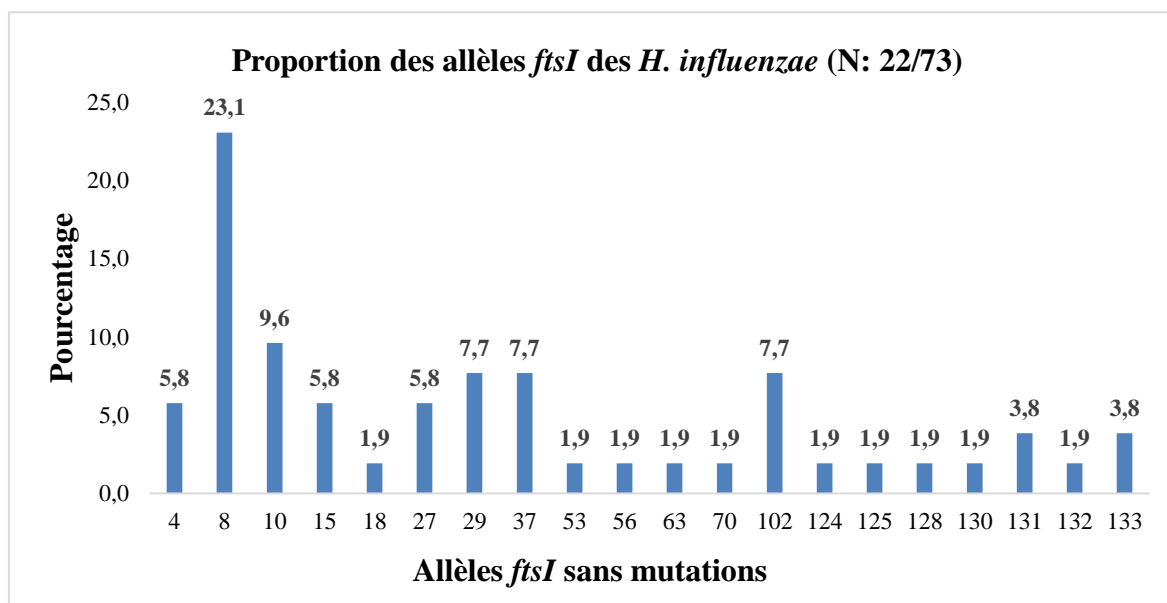
Famille d'antibiotique	Antibiotique (charge du disque)	Nombre (%)
Bêta-Lactamines	Ampicilline (2 $\mu$ g)	52 (55,3)
	CMI Amoxicilline	15 (16)
	Céfuroxime (30 $\mu$ g)	5 (5,3)
Aminosides	Gentamicine (15 $\mu$ g)	1 (1,1)
Macrolides	Erythromycine (15 $\mu$ g)	1 (1,1)
Phénicolés	Chloramphénicol (30 $\mu$ g)	10 (10,6)
Cyclines	Tétracycline (30 $\mu$ g)	10 (10,6)
Quinolones	Acide nalidixique (30 $\mu$ g)	4 (4,3)
	CMI Ciprofloxacine	3 (3,2)
Sulfamides	Cotrimoxazole (25 $\mu$ g)	86 (91,5)
	Triméthoprime (5 $\mu$ g)	93 (98,9)
	Sulfonamide (300 $\mu$ g)	93 (98,9)
Rifamicines	Rifampicine (30 $\mu$ g)	4 (4,3)

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

#### III.4.3 Mécanismes de résistance aux bêta-lactamines

Parmi les 52 isolats d'*Haemophilus* résistants aux  $\beta$ -lactamines (ampicilline), 12 (23,1%) n'arboraient aucune mutation dans le domaine transpeptidase du gène *ftsI* liée à une sensibilité réduite. Des isolats de *H. influenzae* séquencés, 15 nouvelles séquences *ftsI* étaient

rapportées (concernant les allèles 119 à 133) avec 7 qui n'arboraient aucune mutation. Ces allèles appartenaient au groupe I du gène *ftsI* qui ne présente pas de mutations associées à la résistance aux  $\beta$ -lactamines (figure 27).



**Figure 27: Proportion des allèles *ftsI* du groupe I des *H. influenzae* identifiés.**

Parmi les 52 souches d'*Haemophilus* identifiées, 40 (76,9%) arboraient une ou plusieurs mutations dans le domaine transpeptidase du gène *ftsI* liées à une sensibilité réduite (figure 28, tableau XIX). Parmi les nouveaux allèles associés à la résistance des *Haemophilus*, on avait entre autres 119, 120, 121, 122, 123, 126 et 127.

		350		377
SS149-AN_ftsI-8	GSTV	KPFV	VLTAL	Q
SS165-DN_ftsI-10	GSTV	KPFV	VLTAL	Q
SS057-AN_ftsI-27	GSTV	KPFV	VLTAL	Q
SR271-DN_ftsI-2	GSTV	KPFV	VLTAL	Q
SR100-4N_ftsI-43	GSTV	KPFV	VLTAL	Q
SS149-AN_ftsI-8	RLAL	RMPP	SALME	TY
SS165-DN_ftsI-10	RLAL	RMPP	SALME	TY
SS057-AN_ftsI-27	RLAL	RMPP	SALME	TY
SR271-DN_ftsI-2	RLAL	RMPP	SALME	TY
SR100-4N_ftsI-43	RLAL	RMPP	SALME	TY
SS149-AN_ftsI-8	PLQI	ARAY	ATLGS	F
SS165-DN_ftsI-10	PLQI	ARAY	ATLGS	F
SS057-AN_ftsI-27	PLQI	ARAY	ATLGS	F
SR271-DN_ftsI-2	PLQI	ARAY	ATLGS	F
SR100-4N_ftsI-43	PLQI	ARAY	ATLGS	F
SS149-AN_ftsI-8	GYRV	GVKT	GTARK	I
SS165-DN_ftsI-10	GYRV	GVKT	GTARK	I
SS057-AN_ftsI-27	GYRV	GVKT	GTARK	I
SR271-DN_ftsI-2	GYRV	GVKT	GTARK	I
SR100-4N_ftsI-43	GYRV	GVKT	GTARK	I

**Figure 28: Mutations de la Protéine de Liaison à la Pénicilline 3.**

Les lettres en rouge indiquent les acides aminés mutés pour les isolats *H. influenzae* résistants aux bêta-lactamines. Les lettres en bleu et noir désignent les aminoacides inchangés dans les isolats sensibles.

Parmi les 14 isolats d'*Haemophilus* producteurs de  $\beta$ -lactamase, 28,6% (4/14) présentaient des mutations dans le gène *ftsI* codant pour la PLP3. La plateforme génétique arborant la  $\beta$ -lactamase de type TEM-1 a été détectée dans tous les isolats producteurs de  $\beta$ -lactamase. Le tableau XIX résume les changements d'acides aminés observés.

Parmi les 20 isolats de *H. influenzae* résistants avec mutations, 10 appartenait au groupe *ftsI* II et 10 au groupe *ftsI* III (tableau XIX). Quatre isolats de *H. influenzae* étaient résistants à la céfuroxime et présentaient toutes une mutation appartenant au groupe III du gène *ftsI*.

Les substitutions E398D et I488V les plus rapportées ont été observées dans 4 isolats de *H. parainfluenzae* résistantes à l'ampicilline, comme indiqué dans le tableau XIX.

Parmi les 15 isolats de *H. haemolyticus*, 14 étaient résistants à l'ampicilline et tous ces isolats résistants présentaient des mutations. L'unique isolat de *H. haemolyticus* qui était

résistant à la céfuroxime présentait 16 mutations dans le gène *plp3* (tableau XIX) en comparaison avec la souche de référence Rd KW20.

**Tableau XIX: Mutations d'acides aminés de la Protéine de Liaison à la Pénicilline 3 des isolats d'*Haemophilus* résistants aux  $\beta$ -lactamines**

Espèces	Nombre d'isolats	<i>fstI</i>	Nombre de <i>blaTEM-1</i>	Groupe <i>fstI</i>	Substitutions d'acide aminé
<i>Haemophilus influenzae</i>	2	2	0	III	D350N; M377I; A502V; N526K
	3	6, 55, 127	0	II	D350N
	4	43	0	III	D350N; G490E; N526K
	2	97	0	II	A502V; R517H
	1	119	0	III	D350N; M377I; G490E; A502V; N526K
	2	120	0	III	D350N; G490E; A502V; N526K
	1	121	0	II	G490E; N526K
	1	122	0	III	I449V; N526K
	1	123	0	II	A437S
3	126	3	II	A502S	
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	8	/	1	/	F332L; K344R; I348V; D350N; T352G; K355T; L356V; M377I; S406G; P408S ; V418A ; A437S; V461I; I519L
	1	/	0	/	F332L; K344R; I348V; D350N; T352G; S353A; K355T; L356V; M377I; P392A; S406G; P408S ; V418A ; A437S; V461I; I519L
	4	/	0	/	K344R; D350N; T352G; K355T; L356V; M377I
	1	/	0	/	K344R; D350N; T352G; K355T; L356V; A368V; M377I
	1	/	0	/	K344R; D350N; T352G; K355T; L356V; M377I; K486Q; G490E
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	2	/	0	/	V342A; K344R; I348V; D350N; T352G; K355T; L356V; A368P; M377I; S406G; P408D; D410E; V418R; I420V; A444S; V461I; K477Q; <b>I488V</b> ; I491M
	2	/	0	/	V342A; K344R; I348V; D350N; T352G; K355T; L356V; A368P; M377I; <b>E398D</b> ; S406G; P408D; D410E; V418R; I420V; A444S; V461I; K477Q; I491M
	1	/	0	/	V342A; K344R; I348V; D350N; T352G; K355T; L356V; A368P; M377I; S406G; P408D; D410E; V418R; I420V; A444S; V461I; K477Q; I491M

/: Non applicable; A: Alanine; D: Aspartate; E: Glutamate; F: Phenylalanine; G: Glycine; H: Histidine; I: Isoleucine; K: Lysine; L: Leucine; M: Methionine; N: Asparagine; P: Proline; Q: Glutamine; R: Arginine; S: Serine; T: Threonine; V: Valine; *blaTEM-1*:  $\beta$ -lactamase TEM-1

### III.4.4 Mécanisme de résistance au chloramphénicol: production de chloramphénicol acétyltransférase

Parmi les 10 isolats d'*Haemophilus* résistants au chloramphénicol, il y avait 1 *H. parainfluenzae*, 2 *H. haemolyticus* et 7 *H. influenzae*. Le mécanisme moléculaire à la base de cette résistance était la production de l'enzyme chloramphénicol acétyltransférase dans ces isolats, à l'exception de deux isolats de *H. influenzae*. L'unique isolat non *Haemophilus* (*Actinobacillus porcitonisillarum*) qui appartient à la famille des *Pasteurellaceae* était résistant au chloramphénicol et était producteur de chloramphénicol acétyltransférase.

### III.4.5 Mécanismes de résistance aux fluoroquinolones: mutations dans les QRDR

Toutes les séquences QRDR de *gyrA* (sous-unité A de l'ADN gyrase), de *ParC* (sous-unité A de l'ADN topoisomérase IV) et du *parE* (sous-unité B de l'ADN topoisomérase IV) des isolats d'*Haemophilus* sensibles et résistants à la ciprofloxacine ont été comparées à celles des *H. influenzae* HEAM01394, HAEM01649 et HAEM01650 respectivement sur le site Web MLST (<http://pubmlst.org/hinfluenzae/>). En plus des 3 isolats résistants d'*Haemophilus* présentant une mutation dans les QRDR de *gyrA*, 2 isolats sensibles présentaient une mutation S84L, comme indiqué sur la figure 29. Les isolats résistants présentaient au moins deux modifications en position 84 de *gyrA* et de *parC*. Parmi les isolats résistants avec une CMI > 2 µg/mL, les mutations impliquaient deux substitutions aux positions 84 et 88 dans les QRDR de *gyrA* (tableau XX). Aucune mutation n'a été obtenue dans *gyrB* ou *parE*.

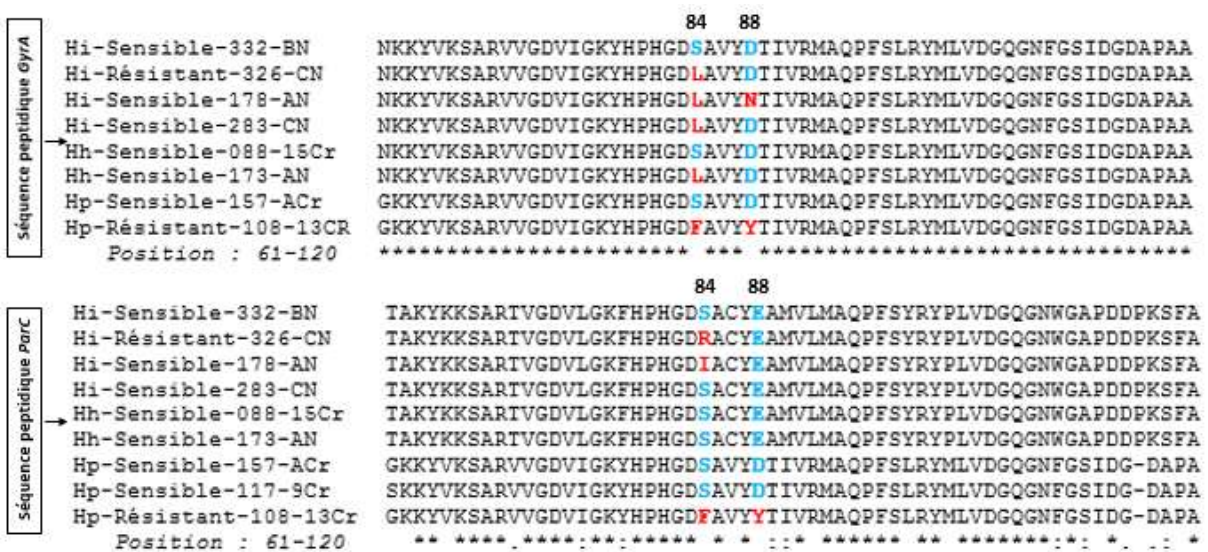


Figure 29: Substitutions d'acides aminés issues de la traduction du gène *gyrA* et *parC*.

Les lettres en rouge indiquent les acides aminés mutés. Les lettres en bleu et noir désignent les aminoacides inchangés dans les isolats sensibles et résistants.



**Tableau XX: Diamètre de la zone d'inhibition, CMI des fluoroquinolones et mutations des acides aminés des QRDR des gènes *gyrA* et *parC* dans les isolats d'*Haemophilus***

Isolats	Espèces	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)		CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	Mutation de QRDR	
		NAL	CIP	CIP	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>
108-13Cr	<i>H. parainfluenzae</i>	10	14	4	S84L, D88Y	S84F, D88Y
173-AN*	<i>H. haemolyticus</i>	31	34	0.19	S84L	Pas de mutation
178-AN	<i>H. influenzae</i>	6	14	2	S84L, D88N	S84I
283-CN*	<i>H. influenzae</i>	33	35	0.012	S84L	Pas de mutation
326-CN	<i>H. influenzae</i>	15	25	1	S84L	S84R

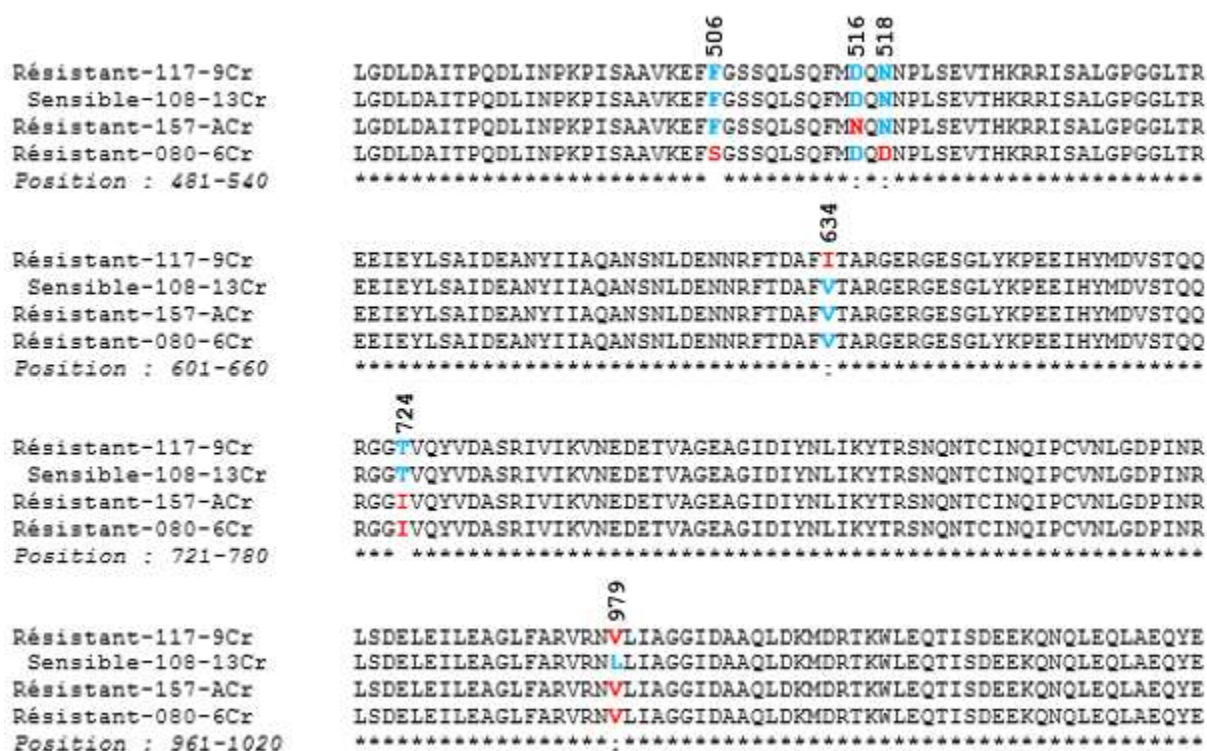
\*Isolats d'*Haemophilus* sensible à la ciprofloxacine et ayant une substitution d'acide aminé dans le gène *gyrA*.

QRDR: Régions Déterminant la Résistance aux Quinolones; CMI : Concentration Minimale Inhibitrice; CIP : Ciprofloxacine; D: Aspartate; F: Phenylalanine; I: Isoleucine; L: Leucine; N: Asparagine; R: Arginine; S: Serine; Y: Tyrosine.

### III.4.6 Mécanismes de résistance aux rifamicines: mutations du gène *rpoB*

La séquence nucléotidique du gène *rpoB* de tous les isolats des *Haemophilus* sensibles et résistants à la rifampicine a été extraite, traduite et comparée. Sur les 94 isolats d'*Haemophilus*, 4 (4,3%) étaient résistants à la rifampicine, dont 1 *H. haemolyticus* et 3 isolats de *H. parainfluenzae* (voir tableau XXI). Deux isolats de *H. parainfluenzae* avec une CMI de 32 µg/mL présentaient une mutation aux positions 516 (D516N) et 518 (N518D). En plus des mutations à la position 516 ou 518, ces isolats résistants avec les CMI de 32 µg/mL arboraient des substitutions supplémentaires en positions 506, 634, 724 et 979 (figure 30).

Les deux autres isolats avec des CMI de 1,5 et 2 µg/mL ne présentaient pas de mutation à la position 516 ou 518 du gène *rpoB*. Des substitutions V634I et L979V ont été observées dans l'isolat de *H. parainfluenzae* qui avait une CMI de 2 µg/mL (voir figure 30).



**Figure 30: Substitutions d'acides aminés issues de la traduction du gène *rpoB*.**

Les lettres en rouge indiquent les acides aminés mutés pour les isolats *H. parainfluenzae* résistants à la rifampicine. Les lettres en bleu et noir désignent les acides aminés inchangés dans les isolats sensibles et résistants.

Aucun des isolats sensibles à la rifampicine n'a révélé de mutation dans la région du gène *rpoB* déterminant la résistance à la rifampicine.

**Tableau XXI: Diamètres d'inhibition, CMI de la rifampicine et mutations d'acides aminés du gène *rpoB* dans les isolats d'*Haemophilus*.**

Isolats	Espèces	Zone d'inhibition (mm)	CMI (µg/mL)	Mutations de <i>rpoB</i>
080-6cr	<i>H. parainfluenzae</i>	17	32	F506S, N518D, T724I, L979V
117-9Cr	<i>H. parainfluenzae</i>	17	2	V634I, L979V
157-Acr	<i>H. parainfluenzae</i>	11	32	D516N, T724I, L979V
340-AN	<i>H. haemolyticus</i>	16	1.5	NA

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice; D: Aspartate; F: Phénylalanine; I: Isoleucine; N: Asparagine, S: Sérine; T: Thréonine; V: Valine; NA: Non Applicable

#### III.4.7 Discussion partielle

La résistance aux antibiotiques des espèces d'*Haemophilus* dans cette étude reste un problème important. En effet, la fréquence élevée de la résistance aux antibiotiques pourrait être due au fait que la plupart des patients prenaient des antibiotiques avant les investigations bactériologiques. Cependant, aucune association n'a été trouvée entre la résistance bactérienne et le traitement antibiotique antérieur chez les patients, même si ce dernier peut inhiber de manière significative la croissance. L'un des objectifs de cette étude était de décrire les mécanismes moléculaires associés à la résistance aux antibiotiques.

Dans cette étude, plus de 99% de résistance aux inhibiteurs de la voie des folates ont été rencontrées dans le plus grand nombre d'isolats (Abotsi *et al.*, 2017). Ce résultat est similaire à ceux obtenus en Éthiopie, en Thaïlande et en Turquie (Kuvat *et al.*, 2015; Lulitanond *et al.*, 2012; Mulu *et al.*, 2018) qui ont montré que la résistance des espèces d'*Haemophilus* aux antibiotiques est élevée dans cette voie. Ces résultats de la résistance aux sulfamides ont une importance épidémiologique et non thérapeutique car la plupart des bactéries de la famille des *Pasteurellaceae* sont résistantes à cette classe d'antibiotique (Matter *et al.*, 2007). De ce fait,

les modifications moléculaires (mutations) associées à la résistance des *Haemophilus* à cette classe d'antibiotique n'ont pas présenté une spécificité.

Un seul isolat d'*Haemophilus* était résistant (1,1%) à la gentamicine, résultat proche de 0% signalé en Tunisie en 2015 (Mzilem *et al.*, 2015) et différent des 65% rapportés au Cameroun en 2001 (M. C. Fonkoua *et al.*, 2001). Ce profil de susceptibilité peut suggérer que cet antibiotique reste efficace contre les espèces d'*Hamophilus* dans notre environnement par rapport au précédent résultat de 2001 (M. C. Fonkoua *et al.*, 2001). Aucune mutation dans la molécule cible ne pouvait être observée. En effet, la substitution nucléotidique de la molécule cible est rarement impliquée dans la résistance aux aminoglycosides. La résistance par mutation de la cible ribosomale est cliniquement pertinente uniquement pour la streptomycine chez *Mycobacterium* qui est le seul genre d'eubactéries dont l'espèce contient une seule copie de l'opéron ribosomal (Magnet & Blanchard, 2005). Cependant d'autres mécanismes moléculaires sous-jacents à la résistance à la gentamicine incluent l'efflux actif, la réduction de la perméabilité de la membrane externe et l'inactivation par des enzymes comme les phosphotransférases, acétyltransférases et nucléotidyltransférases (Doi & Arakawa, 2007; Magnet & Blanchard, 2005).

La résistance des 3 espèces d'*Haemophilus* à la tétracycline était de 10,6% et était différent du profil obtenu dans les pays de haute résistance à la tétracycline dans le monde comme la Thaïlande avec 25% (Tribuddharat *et al.*, 2017) ou le Pakistan avec 3,5% (Zafar *et al.*, 2016). Le faible taux de résistance dans cette étude contraste nettement avec la situation dans certains pays d'Afrique où l'automédication est une menace. Aucune mutation du gène *tet(B)* n'a été observée suggérant qu'un autre mécanisme de résistance était impliqué. Il a été rapporté que la résistance à la tétracycline chez les *Hamophilus* bien qu'associée à un mécanisme d'efflux codé par le gène *tet(B)* habituellement situé sur des plasmides conjugatifs (Chopra & Roberts, 2001a), inclut aussi la production de protéines de protections ribosomales (Chopra & Roberts, 2001a; Roberts, 1989; Spaic *et al.*, 2019).

La résistance à la classe des macrolides était faible avec 1,1% pour l'érythromycine comparée aux autres profils de résistance. Dans cette étude, aucune mutation des gènes L4 et L22 de l'ARNr 23S ou acquisition des gènes de résistance *erm(B)* ou *mef(A)* n'a été observée. Ces observations confortent l'hypothèse selon laquelle, la résistance aux macrolides se caractérise par l'inhibition de la synthèse des protéines via une modification de la cible ou à un efflux actif et rarement à une inactivation d'antibiotiques. En dehors des différentes mutations dans les protéines L4 et L22 de l'ARNr 23S du ribosome, la modification du site cible est obtenue par méthylation de résidus spécifiques dans l'ARNr 23S, par des méthylases

spécifiques codées par la classe de gènes *erm* (Peric *et al.*, 2003; Sutcliffe *et al.*, 1996). Par ailleurs, la faible proportion des isolats d'*Haemophilus* résistantes à l'érythromycine conforte les trouvailles selon lesquelles la résistance élevée aux macrolides chez les *Haemophilus* est rare (Jacobs *et al.*, 1999) et parmi les isolats cliniques, les taux de résistance ont été rapportés inférieurs à 3% (Peric *et al.*, 2003). La connaissance de ce faible taux de résistance des *Haemophilus* à l'érythromycine au Cameroun pourrait être l'occasion de le maintenir bas le plus longtemps possible à travers le contrôle de la distribution des antibiotiques en général.

La résistance aux  $\beta$ -lactamines revêt une grande importance car ce sont les médicaments de traitement de première intention pour de nombreuses infections bactériennes au Cameroun et leur profil de résistance est une préoccupation clinique. Au total, 55,3% des isolats étaient résistants à l'ampicilline en plus de l'activité de la  $\beta$ -lactamase. Ce résultat est similaire aux 58,5% de résistance à l'ampicilline en Corée (Bae *et al.*, 2010). Trois mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactames ont été rencontrés: l'un impliquait l'hydrolyse enzymatique des  $\beta$ -lactames (10/52), le second était dû uniquement à la modification du domaine transpeptidase de PBP3 dans le gène *ftsI* (25/52) et le troisième concernait l'association deux premiers mécanismes (4/52). Tous les isolats d'*Haemophilus* producteurs de  $\beta$ -lactamase étaient de type TEM-1, 4 sur les 14 (28,6%) étant  $\beta$ -lactamase-productrice ampicilline résistante. La TEM fait partie des principaux plasmides associés à la production de  $\beta$ -lactamase chez les *Haemophilus* (S. Tristram *et al.*, 2007). Les résistances aux  $\beta$ -lactamines sont acquises couramment par la production de  $\beta$ -lactamase et la fréquence de cette production peut varier en fonction de l'environnement. Nous avons signalé 14,9% d'isolats producteurs de  $\beta$ -lactamase, très proches des 13,3% signalés dans les pays d'Afrique du Nord (Algérie, Maroc et Tunisie) (Benouda *et al.*, 2009) et légèrement différentes de ceux de certains pays d'Afrique subsaharienne (Sénégal, République démocratique du Congo et de la République centrafricaine) (Bercion *et al.*, 2007; Kacou-Ndouba *et al.*, 2016; Ndiaye *et al.*, 2009) avec une prévalence supérieure à 20%.

Parmi les 76,9% des isolats d'*Haemophilus* porteurs d'une mutation de la PLP3, la mutation N526K était la plus récurrente chez *H. influenzae* suivie de la mutation D350N. Ce résultat est similaire à celui de nombreuses autres études en Espagne (Puig *et al.*, 2013) et au Portugal (Barbosa *et al.*, 2011) qui montrent l'implication de ces mutations dans la résistance à l'ampicilline.

Les mutations associées à la résistance à *H. haemolyticus* étaient différentes de celles publiées dans de nombreuses études comme l'utilisation de la souche *H. haemolyticus* ATCC 33390 comme référence (Maddi *et al.*, 2017; Marti *et al.*, 2015; Witherden & Tristram, 2013).

Cette étude des mutations associées à la résistance à l'ampicilline chez *H. haemolyticus* a pris *H. influenzae* (Rd KW20) comme souche de référence (Marti *et al.*, 2016): c'est pourquoi nous avons eu un plus grand nombre de mutations. Ici, nous avons aussi comparé les séquences protéiques des isolats sensibles par rapport aux isolats résistants après alignement. En revanche, les profils de résistance à l'ampicilline chez *H. influenzae* et *H. parainfluenzae* étaient typiques de ceux trouvés dans plusieurs études. Par exemple, la modification de PLP3 due aux substitutions E398D et I488V représentait 66,7% (4/6) de *H. parainfluenzae*. Ces résultats sont conformes à ceux d'Espagne et d'Italie (Cardines *et al.*, 2015; García-Cobos *et al.*, 2013) avec les mêmes mutations aux positions 398 et 488 de PBP3 du gène *ftsI* de *H. parainfluenzae*. Ces mutations semblent être responsables d'une faible résistance ou d'une sensibilité réduite aux deux  $\beta$ -lactamines (S. Tristram *et al.*, 2007).

Douze isolats résistants ne présentaient aucune mutation. Le mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines de ces derniers pourrait être dû à une altération de la perméabilité à l'antibiotique et à un efflux. En effet, l'expulsion active de molécules de  $\beta$ -lactamine à partir de cellules au moyen de pompes à efflux et la sous expression de la perméabilités de la membrane externe ont été démontrées chez des bactéries à Gram négatif (Wilke *et al.*, 2005).

Il y a deux décennies, la résistance à la classe d'antibiotiques fluoroquinolones était considérée comme extrêmement rare (inférieure à 1%) chez les espèces d'*Haemophilus* (Pérez-Trallero *et al.*, 2010; C. Puig *et al.*, 2015). Aujourd'hui, la résistance aux fluoroquinolones est prédominante dans le monde entier, avec une moyenne de 4,2% enregistrée dans la présente étude. Elle est associée à des altérations des gènes de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV chez les espèces d'*Haemophilus*. Les altérations sont caractérisées par des substitutions dans les séquences peptidiques des gènes *gyrA*, *parC* (mutations en positions 84 et 88) et *parE* (mutation en position 420) qui sont principalement responsables de l'expression de la résistance aux quinolones en diminuant la liaison de la fluoroquinolone aux complexes enzyme-ADN (Abotsi *et al.*, 2017). Les substitutions d'acides aminés sont S84L, D88N/Y dans GyrA et S84F/I R, D88N/Y dans ParC et sont similaires aux études précédentes (Abotsi *et al.*, 2017; C. Puig *et al.*, 2015; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2011). Seuls les isolats d'*Haemophilus* avec des CMI > 2  $\mu$ g/mL présentaient les mutations 84 et 88, à la fois en GyrA et en ParC. Ce résultat diffère de nombreuses autres études où la valeur de la CMI entre 0,5 et 2  $\mu$ g/mL (2 > CMI ( $\mu$ g/mL) > 0,5) présentent au moins deux mutations (Faccone *et al.*, 2016; Shoji *et al.*, 2014). La plus part des études portant sur les mécanismes de résistance est focalisée uniquement sur les mutations impliquées dans les isolats résistants. Dans cette étude, deux isolats de profil

phénotypique sensible présentait une mutation en position 84 du *gyrA*. Ceci est similaire à ce qui a été trouvé au Japon où 3 isolats de *H. influenzae* sensibles portaient une mutation unique (mutations S84L du gène *GyrA* et une mutation à G82R) dans le *ParC* (Shoji *et al.*, 2014). Nos résultats sont différents de la plupart des études qui montrent que la mutation en position 84 était associée à une résistance aux fluoroquinolones. En Afrique du Sud, il a été constaté que la seule mutation en position 84 de *GyrA* était associée à une résistance aux fluoroquinolones (Elliott *et al.*, 2003). Les isolats sensibles trouvés avec la mutation S84L comme dans les isolats résistants suggèrent qu'il s'agit de la première étape dans le développement de la résistance aux fluoroquinolones (Seyama *et al.*, 2017; Shoji *et al.*, 2014).

Après avoir analysé la séquence de la région du gène *rpoB* qui détermine la résistance à la rifampicine, 2 isolats résistants sur les 4 ont présenté 2 substitutions au niveau de la région conservée du *cluster I* (507-533) du gène *rpoB* (D516N et N518D) par rapport aux isolats observés sensibles. Ces mutations sont des sites associés à la résistance à la rifampicine. Des substitutions D516N et N518D dans *RPOB* ont déjà été identifiées dans des isolats d'*Haemophilus* résistants à la rifampicine en tant que marqueurs de cette résistance (Abadi *et al.*, 1996; Cruchaga *et al.*, 2003; Goldstein, 2014). D'autres changements d'acides aminés en dehors des *clusters* (acides aminés 507 à 533; acides aminés 563 à 572 et acides aminés 687), y compris F506S, V634I, T724I et L979V, ont été détectés dans des isolats résistants de *H. parainfluenzae* mais pas dans des isolats sensibles. Ces nouvelles substitutions suggèrent qu'elles pourraient jouer un rôle dans la résistance à la rifampicine. Le mécanisme de résistance de *H. haemolyticus* avec une CMI de 1,5 µg/mL qui ne présentait aucune mutation dans la région du gène *rpoB* (déterminant la résistance à la rifampicine) pourrait être expliqué par le fait que la substitution d'acides aminés dans *RPOB* n'est pas le seul mécanisme de résistance chez les *Haemophilus*. La résistance à la rifampicine pourrait être due aux modifications des mécanismes d'absorption et d'efflux de médicaments et aux modifications de la perméabilité de la membrane externe à la rifampicine (Abadi *et al.*, 1996; Cruchaga *et al.*, 2003; Goldstein, 2014).

Parmi les 94 isolats d'*Haemophilus*, 10,6% étaient résistants au chloramphénicol. Cette fréquence de résistance est faible comparée à celle rapportée au Cameroun en 2001, avec 21,7% des isolats de *H. influenzae* (M. C. Fonkoua *et al.*, 2001) mais similaire aux 14% enregistrés en Thaïlande en 2017 (Tribuddharat *et al.*, 2017) et aux 11,8% en Chine (Jiang *et al.*, 2017). La différence de profil de résistance peut être liée au fait que la plupart des souches d'*Haemophilus* n'étaient pas invasives ou en raison de l'effet indirect de la non utilisation du

chloramphénicol, cet antibiotique n'étant plus prescrit aux patients en routine. La production d'enzyme chloramphénicol acétyltransférase a été observée dans 80% des isolats résistants. En effet, l'inactivation enzymatique par acétylation du médicament via différents types de chloramphénicol acétyltransférases est le mécanisme de résistance le plus fréquemment rencontré (S. Tristram *et al.*, 2007). Cependant, le mécanisme de résistance était inconnu pour 2 isolats d'espèces d'*Haemophilus* résistantes (20%). Pour ceux-ci, nous avons émis l'hypothèse qu'un autre mécanisme de résistance pouvait être impliqué tel que les systèmes d'efflux, l'inactivation par les phosphotransférases, les mutations du site cible et les barrières de perméabilité. En général, le mécanisme de résistance des bactéries au chloramphénicol peut être de haut niveau avec l'élaboration de la chloramphenicol acetyltransférase et de bas niveau de résistance avec la réduction de la perméabilité membranaire ou une mutation de la sous-unité ribosomale 50S (Fernández *et al.*, 2012; van Hoek *et al.*, 2011).

Au regard du faible taux d'isolats capsulés, aucune association n'a été repertoriée entre le type capsulaire et le profil de résistance. Pareillement, aucune association n'a été retrouvée entre la prise préalable des antibiotiques avant investigation bactériologique et le profil de résistance aux antibiotiques après antibiogramme (Annexe 19) pourtant l'usage inapproprié des antibiotiques favorise le phénomène de la résistance (Nepal & Bhatta, 2018).



**CONCLUSION GÉNÉRALE  
ET  
PERSPECTIVES**

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Au terme de ce travail dont l'objectif était de décrire les bactéries détectées chez les patients souffrant d'infection des voies respiratoires à Yaoundé au Cameroun et de typer phénotypiquement et génotypiquement les souches d'*Haemophilus*; nous pouvons dégager les points suivants :

- Des 440 patients, l'étude montre que les bactéries détectées pouvaient être regroupées en bactéries à Gram positif (35,7%), bactéries à Gram négatif (47%), bactéries atypiques (4,3%) et les mycobactéries (14,8%). Les *Haemophilus* étaient les bactéries les plus détectées avec une fréquence de 21,6% par culture. L'approche moléculaire (58,6%) a permis de détecter un plus grand nombre de bactéries et d'espèces comparativement à la culture standard (32%). Le taux de co-détection bactérienne était de 44,5% et impliquait les pneumocoques et *Haemophilus* (38,3%). Les facteurs associés à la détection bactérienne étaient l'âge, le sexe, le type de prélèvement biologique, le délai de consultation, certains signes cliniques tels la myalgie, la dyspnée, la conjonctivite, la prise préalable d'antibiotique avant l'investigation bactériologique, le statut VIH positif et le tabagisme.
- Des 95 isolats d'*Haemophilus*, 3 espèces étaient identifiées comprenant *H. influenzae* (76,8%), *H. haemolyticus* (15,8%) et *H. parainfluenzae* (6,3%). Le BLAST du génome entier ou de la séquence *rpoB* était l'approche d'identification présentant la meilleure performance. Une grande diversité génétique était observée au sein des isolats *Haemophilus*. Pour les *H. influenzae*, 46 isolats avaient un profil MLST comprenant 40 ST différentes dont 11 nouvelles.
- Après l'introduction du vaccin conjugué contre *hib* au Cameroun depuis une décennie, la plupart des infections à *Haemophilus* était dominée par les espèces non *hib*. Trois isolats capsulés (5,5%) ont été détectés et incluaient un *hib*, un *hie* et un *hif*. La couverture vaccinale chez les patients à culture positive était de 73,7% et 100% des participants vaccinés étaient protégés contre *hib*. Par ailleurs, un cas de *hib* était détecté chez un patient non immunisé (9,1%).
- Le profil de résistance des *Haemophilus* aux antibiotiques était un problème sérieux compte tenu de la fréquence élevée des isolats dans cette étude. Tous les isolats d'*Haemophilus* étaient résistants à au moins un antibiotique testé. La résistance aux sulfamides était la plus rencontrée (98,9%) suivie de celle aux bêta-lactamines qui était de 54,7%. Parmi les isolats résistants aux bêta-lactamines, 26,9% étaient producteurs de

bêta-lactamases. Les autres profils de résistance étaient inférieurs à 11%. Les modifications moléculaires associées à la résistance aux antibiotiques étaient caractérisées par la production de bêta-lactamase et mutations du gène *ftsI* pour les bêta-lactamines, la production de chloramphénicol acétyltransférase pour les phénicolés, les mutations du gène *rpoB* pour les rifamicines et les mutations des gènes *gyrA* et *parC* pour les fluoroquinolones.

## PERSPECTIVES

Les conclusions de ce travail ouvrent la voie vers de nouveaux aspects des *Haemophilus* et d'autres bactéries pour lesquelles les vaccins ont été introduits au Cameroun, et qu'il conviendrait d'explorer à l'avenir pour une meilleure compréhension. Ainsi, nous proposons de :

- étendre cette étude sur une durée plus longue en se focalisant sur d'autres zones géographiques du Cameroun pour rechercher les spécificités liées à la détection bactérienne ;
- décrire la diversité génétique des pneumocoques, l'une des principales bactéries impliquée dans les infections des voies respiratoires ;
- étudier les infections invasives à *H. influenzae* pour rechercher les potentiels switch génétiques associés *hib* et rechercher les sérotypes des pneumocoques afin d'évaluer l'impact du vaccin anti-pneumococcique conjugué valence 13 et du vaccin anti-pneumococcique polysaccharidique Pneumovax 23 dans notre contexte ;
- mener des études complémentaires sur les *Haemophilus* pour analyser les mutations sur d'autres portions de gènes qui seraient associées à la résistance aux antibiotiques ;

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CASFM-EUCAST (2015). *Recommandations 2013 de la Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*.
- Abadi, F. J., Carter, P. E., Cash, P., & Pennington, T. H. (1996). Rifampin resistance in *Neisseria meningitidis* due to alterations in membrane permeability. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(3), 646-651. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8851587>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC163174/>
- Abotsi, R. E., Govinden, U., & Essack, S. Y. (2017). Mechanisms of antibiotic resistance in *Haemophilus parainfluenzae*. *Southern African Journal of Infectious Diseases*, 32(3), 111-114. <https://doi.org/10.1080/23120053.2017.1320853>
- Adekambi, T., Colson, P., & Drancourt, M. (2003). rpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol*, 41(12), 5699-5708. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.12.5699-5708.2003>
- Adekambi, T., Drancourt, M., & Raoult, D. (2009). The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol*, 17(1), 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.09.008>
- Agmy, G., Mohamed, S., Gad, Y., Farghally, E., Mohammedin, H., & Rashed, H. (2013). Bacterial profile, antibiotic sensitivity and resistance of lower respiratory tract infections in upper egypt. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 5(1), e2013056. <https://doi.org/10.4084/mjihid.2013.056>
- Agrawal, A., & Murphy, T. F. (2011). *Haemophilus influenzae* infections in the H. influenzae type b conjugate vaccine era. *J Clin Microbiol*, 49(11), 3728-3732. <https://doi.org/10.1128/jcm.05476-11>
- Ahakoud, M. (2015). *Le séquençage d'acide désoxyribonucléique : principe technique, indications médicales et expérience du CHU Hassane II de Fès* (Publication Number 067/15) Université Sidi Mohammed Ben Abdellah].
- Ajibola, O., Omisakin, O. A., Eze, A. A., & Omoleke, S. A. (2018). Self-Medication with Antibiotics, Attitude and Knowledge of Antibiotic Resistance among Community Residents and Undergraduate Students in Northwest Nigeria. *Diseases (Basel, Switzerland)*, 6(2), 32. <https://doi.org/10.3390/diseases6020032>
- Alfa, M. J., DeGagne, P., & Totten, P. A. (1996). *Haemophilus ducreyi* hemolysin acts as a contact cytotoxin and damages human foreskin fibroblasts in cell culture. *Infect Immun*, 64(6), 2349-2352.
- Ammar, A. M., Abd El-Aziz, N. K., Gharib, A. A., Ahmed, H. K., & Lameay, A. E. (2016). Mutations of domain V in 23S ribosomal RNA of macrolide-resistant *Mycoplasma gallisepticum* isolates in Egypt. *J Infect Dev Ctries*, 10(8), 807-813. <https://doi.org/10.3855/jidc.7850>
- Anderson, R., Wang, X., Briere, E. C., Katz, L. S., Cohn, A. C., Clark, T. A., Messonnier, N. E., & Mayer, L. W. (2012). *Haemophilus haemolyticus* Isolates Causing Clinical Disease. *J Clin Microbiol*, 50(7), 2462-2465. <https://doi.org/10.1128/jcm.06575-11>
- Anderson, R., Wang, X., Briere, E. C., Katz, L. S., Cohn, A. C., Clark, T. A., Messonnier, N. E., & Mayer, L. W. (2012). *Haemophilus haemolyticus* isolates causing clinical disease. *J Clin Microbiol*, 50(7), 2462-2465. <https://doi.org/10.1128/jcm.06575-11>
- Assane, D., Makhtar, C., Abdoulaye, D., Amary, F., Djibril, B., Amadou, D., Niokhor, D. J. B., Amadou, D., Cheikh, L., Ndongo, D., Mbayame, N., Lamine, F., & Bouh, B. C. S. (2018). Viral and Bacterial Etiologies of Acute Respiratory Infections Among Children Under 5 Years in Senegal. *Microbiol Insights*, 11, 1178636118758651. <https://doi.org/10.1177/1178636118758651>

- Attia, E. F., Pho, Y., Nhem, S., Sok, C., By, B., Phann, D., Nob, H., Thann, S., Yin, S., Noce, R., Kim, C., Letchford, J., Fassier, T., Chan, S., & West, T. E. (2019). Tuberculosis and other bacterial co-infection in Cambodia: a single center retrospective cross-sectional study. *BMC Pulm Med*, 19(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s12890-019-0828-4>
- Bae, S., Lee, J., Lee, J., Kim, E., Lee, S., Yu, J., & Kang, Y. (2010). Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* respiratory tract isolates in Korea: results of a nationwide acute respiratory infections surveillance. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(1), 65-71. <https://doi.org/10.1128/AAC.00966-09>
- Bank, W. (2014). *Poverty and Health*. World Bank. Retrieved 26th April 2018 from [www.worldbank.org/en/topic/health/brief/poverty-health](http://www.worldbank.org/en/topic/health/brief/poverty-health).
- Barbosa, A. R., Giufre, M., Cerquetti, M., & Bajanca-Lavado, M. P. (2011). Polymorphism in *ftsI* gene and  $\beta$ -lactam susceptibility in Portuguese *Haemophilus influenzae* strains: clonal dissemination of  $\beta$ -lactamase-positive isolates with decreased susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid. *J Antimicrob Chemother*, 66(4), 788-796. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq533>
- Bates, M., Mudenda, V., Mwaba, P., & Zumla, A. (2013). Deaths due to respiratory tract infections in Africa: a review of autopsy studies. *Curr Opin Pulm Med*, 19(3), 229-237. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e32835f4fe4>
- BD. (2016). *BDifco™ Haemophilus Influenzae Antisera*. Becton, Dickinson and Company. .
- Beck, S. C., & Meyer, T. F. (2000). IgA1 protease from *Neisseria gonorrhoeae* inhibits TNF $\alpha$ -mediated apoptosis of human monocytic cells. *FEBS Lett*, 472(2-3), 287-292.
- Behrouzi, A., Vaziri, F., Rahimi-Jamnani, F., Afrough, P., Rahbar, M., Satarian, F., & Siadat, S. D. (2017). Vaccine Candidates against Nontypeable *Haemophilus influenzae*: a Review. *Iran Biomed J*, 21(2), 69-76. <https://doi.org/10.18869/acadpub.ijb.21.2.69>
- Beltran-Leon, M., Perez-Llanos, F., Sanchez, L., Parra-Lopez, C., Navarrete, M., Sanchez, R., Awad, C., Granada, A. M., Quintero, E., Briceno, O., Cruz, O., & Murcia, M. I. (2018). [Prevalence and risk factors associated to tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections in HIV-positive patients in Bogota]. *Biomedica*, 38(1), 120-127. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3410>
- Benouda, A., Ben Redjeb, S., Hammami, A., Sibille, S., Tazir, M., & Ramdani-Bougoussa, N. (2009). Antimicrobial resistance of respiratory pathogens in North African countries. *J Chemother*, 21(6), 627-632. <https://doi.org/10.1179/joc.2009.21.6.627>
- Bercion, R., Bobossi-Serengbe, G., Gody, J. C., Beyam, E. N., Manirakiza, A., & Le Faou, A. (2007). Acute Bacterial Meningitis at the 'Complexe Pédiatrique' of Bangui, Central African Republic. *J Trop Pediatr*, 54(2), 125-128. <https://doi.org/10.1093/tropej/fmm075>
- Bermingham, A., & Derrick, J. P. (2002). The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: evaluation of potential for antibacterial drug discovery. *Bioessays*, 24(7), 637-648. <https://doi.org/10.1002/bies.10114>
- Bhuyan, G. S., Hossain, M. A., Sarker, S. K., Rahat, A., Islam, M. T., Haque, T. N., Begum, N., Qadri, S. K., Muraduzzaman, A. K. M., Islam, N. N., Islam, M. S., Sultana, N., Jony, M. H. K., Khanam, F., Mowla, G., Matin, A., Begum, F., Shirin, T., Ahmed, D., Saha, N., Qadri, F., & Mannoor, K. (2017). Bacterial and viral pathogen spectra of acute respiratory infections in under-5 children in hospital settings in Dhaka city. *PLoS One*, 12(3), e0174488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174488>
- Binks, M. J., Temple, B., Kirkham, L.-A., Wiertsema, S. P., Dunne, E. M., Richmond, P. C., Marsh, R. L., Leach, A. J., & Smith-Vaughan, H. C. (2012). Molecular surveillance of true nontypeable *Haemophilus influenzae*: an evaluation of PCR screening assays. *PLoS One*, 7(3), e34083-e34083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034083>
- Bio-Rad. (2015). *Test d'agglutination au latex pour l'identification de Staphylococcus aureus*.

- Bogaert, D., De Groot, R., & Hermans, P. W. (2004). Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*, 4(3), 144-154. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(04\)00938-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(04)00938-7)
- Botero, L. E., Delgado-Serrano, L., Cepeda Hernández, M. L., Del Portillo Obando, P., & Zambrano Eder, M. M. (2016). The human microbiota: the role of microbial communities in health and disease. *Acta Biológica Colombiana*, 21, 5-15. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-548X2016000100001&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2016000100001&nrm=iso)
- Boula, A., Senghore, M., Ngoh, R., Tassadjo, F., Fonkoua, M.-C., Nzouankeu, A., Njiki, M. K., Musi, J., Bebey, S., Ngo Baleba, M., Nkembe, A., Médjina, S., Ndow, P. S., Worwui, A., Kobela, M., Nimpa, M., Mwenda, J. M., N'diaye, A., Kwambana-Adams, B. A., Antonio, M., & Network, f. t. A. P. B. M. S. (2019). Hospital-based Surveillance Provides Insights Into the Etiology of Pediatric Bacterial Meningitis in Yaoundé, Cameroon, in the Post-Vaccine Era. *Clinical Infectious Diseases*, 69(Supplement\_2), S148-S155. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz506>
- Brauer, A. L., Lesse, A. J., Murphy, T. F., Sethi, S., Cai, X., & Kilian, M. (2007). Haemophilus haemolyticus: A Human Respiratory Tract Commensal to Be Distinguished from Haemophilus influenzae. *J Infect Dis*, 195(1), 81-89. <https://doi.org/10.1086/509824>
- Bruin, J. P., Kostrzewa, M., van der Ende, A., Badoux, P., Jansen, R., Boers, S. A., & Diederer, B. M. (2014). Identification of Haemophilus influenzae and Haemophilus haemolyticus by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 33(2), 279-284. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1958-x>
- Brunet, L., Pai, M., Davids, V., Ling, D., Paradis, G., Lenders, L., Meldau, R., van Zyl Smit, R., Calligaro, G., Allwood, B., Dawson, R., & Dheda, K. (2011). High prevalence of smoking among patients with suspected tuberculosis in South Africa. *Eur Respir J*, 38(1), 139-146. <https://doi.org/10.1183/09031936.00137710>
- Bruun, B., Christensen, J. J., & Kilian, M. (1984). Bacteremia caused by a beta-lactamase producing Haemophilus parainfluenzae strain of a new biotype. A case report. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B*, 92(3), 135-138.
- Burns, J. L., Mendelman, P. M., Levy, J., Stull, T. L., & Smith, A. L. (1985). A permeability barrier as a mechanism of chloramphenicol resistance in Haemophilus influenzae. *Antimicrob Agents Chemother*, 27(1), 46-54. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3872625>/<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC176203/>
- Butt, H. L., Cripps, A. W., & Clancy, R. L. (1997). In vitro susceptibility patterns of nonserotypable Haemophilus influenzae from patients with chronic bronchitis. *Pathology*, 29(1), 72-75. <https://doi.org/10.1080/00313029700169584>
- Carbonnelle, E., & Nassif, X. (2011). [Applications of MALDI-TOF-MS in clinical microbiology laboratory]. *Med Sci (Paris)*, 27(10), 882-888. <https://doi.org/10.1051/medsci/20112710017> (Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogenes en microbiologie medicale.)
- Cardines, R., Daprai, L., Giufre, M., Torresani, E., Garlaschi, M. L., & Cerquetti, M. (2015). Genital carriage of the genus Haemophilus in pregnancy: species distribution and antibiotic susceptibility. *J Med Microbiol*, 64(7), 724-730. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000083>
- Carrol, E. D., Mankhambo, L. A., Guiver, M., Banda, D. L., The, I. P. D. S. G., Denis, B., Dove, W., Jeffers, G., Molyneux, E. M., Molyneux, M. E., Hart, C. A., & Graham, S. M. (2011). PCR Improves Diagnostic Yield from Lung Aspiration in Malawian Children with Radiologically Confirmed Pneumonia. *PLoS One*, 6(6), e21042. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021042>

- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and environmental microbiology*, 73(1), 278-288. <https://doi.org/10.1128/AEM.01177-06>
- Cavallo, G., & Martinetto, P. (1981). [The mechanism of action of aminoglycosides]. *G Bacteriol Virol Immunol*, 74(7-12), 335-346. (Meccanismo d'azione degli aminoglicosidi.)
- CDC. (2011). PCR for Detection and Characterization of Bacterial Meningitis Pathogens: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae*. In C. f. D. C. a. Prevention (Ed.), *Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis* (2nd ed., pp. 1-56).
- Cepheid. (2009). *Xpert MTB/RIF*. 300-7810 Rev. A. Retrieved May 15th, 2018 from [http://tbevidence.org/documents/rescentre/sop/XpertMTB\\_Broch\\_R9\\_EU.pdf](http://tbevidence.org/documents/rescentre/sop/XpertMTB_Broch_R9_EU.pdf)
- Cerquetti, M., & Giufrè, M. (2016). Why we need a vaccine for non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Hum Vaccin Immunother*, 12(9), 2357-2361. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1174354>
- Chang, A., Kaur, R., Michel, L. V., Casey, J. R., & Pichichero, M. (2011). *Haemophilus influenzae* vaccine candidate outer membrane protein P6 is not conserved in all strains. *Hum Vaccin*, 7(1), 102-105.
- Chen, K., Jia, R., Li, L., Yang, C., & Shi, Y. (2015). The aetiology of community associated pneumonia in children in Nanjing, China and aetiological patterns associated with age and season. *BMC Public Health*, 15, 113. <https://doi.org/10.1186/s12889-015-1422-1>
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001a). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65(2), 232-260 ; second page, table of contents. <https://doi.org/10.1128/membr.65.2.232-260.2001>
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001b). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65(2), 232-260. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>
- Clementi, C. F., Hakansson, A. P., & Murphy, T. F. (2014). Internalization and trafficking of nontypeable *Haemophilus influenzae* in human respiratory epithelial cells and roles of IgA1 proteases for optimal invasion and persistence. *Infect Immun*, 82(1), 433-444. <https://doi.org/10.1128/iai.00864-13>
- Coico, R. (2005). Gram staining. *Curr Protoc Microbiol*, Appendix 3, Appendix 3C. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03cs00>
- Cooley, A. E., Riley, S. P., Kral, K., Miller, M. C., DeMoll, E., Fried, M. G., & Stevenson, B. (2009). DNA-binding by *Haemophilus influenzae* and *Escherichia coli* YbaB, members of a widely-distributed bacterial protein family. *BMC Microbiol*, 9, 137. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-137>
- Cope, L. D., Lumbley, S., Latimer, J. L., Klesney-Tait, J., Stevens, M. K., Johnson, L. S., Purven, M., Munson, R. S., Jr., Lagergard, T., Radolf, J. D., & Hansen, E. J. (1997). A diffusible cytotoxin of *Haemophilus ducreyi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8), 4056-4061. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9108104>/<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC20567/>
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
- Cruchaga, S., Perez-Vazquez, M., Roman, F., & Campos, J. (2003). Molecular basis of rifampicin resistance in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother*, 52(6), 1011-1014. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh008>

- Cui, B., Zhang, D., Pan, H., Zhang, F., Farrar, J., Law, F., van Doorn, H. R., Wu, B., & Ba-Thein, W. (2015). Viral aetiology of acute respiratory infections among children and associated meteorological factors in southern China. *BMC Infect Dis*, *15*, 124. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0863-6>
- de Groot, R., Chaffin, D. O., Kuehn, M., & Smith, A. L. (1991). Trimethoprim resistance in *Haemophilus influenzae* is due to altered dihydrofolate reductase(s). *The Biochemical journal*, *274* (Pt 3)(Pt 3), 657-662. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2012595>/<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1149962/>
- De Schutter, I., De Wachter, E., Crokaert, F., Verhaegen, J., Soetens, O., Piérard, D., & Malfroot, A. (2011). Microbiology of Bronchoalveolar Lavage Fluid in Children With Acute Nonresponding or Recurrent Community-Acquired Pneumonia: Identification of Nontypeable *Haemophilus influenzae* as a Major Pathogen. *Clinical Infectious Diseases*, *52*(12), 1437-1444. <https://doi.org/10.1093/cid/cir235>
- Deghmane, A. E., Hong, E., Chehboub, S., Terrade, A., Falguieres, M., Sort, M., Harrison, O., Jolley, K. A., & Taha, M. K. (2019). High diversity of invasive *Haemophilus influenzae* isolates in France and the emergence of resistance to third generation cephalosporins by alteration of *ftsI* gene. *J Infect*. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.05.007>
- del Valle Mendoza, J., Cornejo-Tapia, A., Weilg, P., Verne, E., Nazario-Fuentes, R., Ugarte, C., del Valle, L. J., & Pumarola, T. (2015). Incidence of respiratory viruses in Peruvian children with acute respiratory infections. *J Med Virol*, *87*(6), 917-924. <https://doi.org/10.1002/jmv.24159>
- den Boon, S., van Lill, S. W. P., Borgdorff, M. W., Verver, S., Bateman, E. D., Lombard, C. J., Enarson, D. A., & Beyers, N. (2005). Association between smoking and tuberculosis infection: a population survey in a high tuberculosis incidence area. *Thorax*, *60*(7), 555-557. <https://doi.org/10.1136/thx.2004.030924>
- Deraz, T., Mansour, M. G. E., Albendary, S., & Allam, F. (2012). *Haemophilus influenzae* type b pneumonia in Egyptian children under five years: A step toward the identification of the real burden in our community by the use of real-time polymerase chain reaction. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, *13*(2), 213-218. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2012.01.005>
- Desai, S., Jamieson, F. B., Patel, S. N., Seo, C. Y., Dang, V., Fediurek, J., Navaranjan, D., & Deeks, S. L. (2015). The Epidemiology of Invasive *Haemophilus influenzae* Non-Serotype B Disease in Ontario, Canada from 2004 to 2013. *PLoS One*, *10*(11), e0142179-e0142179. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142179>
- diagnosis, G. I. i. a. T. (2014). *Mycobacteriology laboratory manual* (Kelly W. Stinson, Kathleen Eisenach, Susan Kayes, Makoto Matsumoto, Salman Siddiqi, Suguru Nakashima, Hiroyuki Hashizume, Juliano Timm, Anne Morrissey, Marra Mendoza, & Princy Mathai, Eds. 1st ed.).
- Dinos, G. P., Athanassopoulos, C. M., Missiri, D. A., Giannopoulou, P. C., Vlachogiannis, I. A., Papadopoulos, G. E., Papaioannou, D., & Kalpaxis, D. L. (2016). Chloramphenicol Derivatives as Antibacterial and Anticancer Agents: Historic Problems and Current Solutions. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *5*(2), 20. <https://doi.org/10.3390/antibiotics5020020>
- Doe, E. D. (2009). *Bacterial causes of respiratory tract infections among Human Immunodeficiency Virus (HIV) seropositive patients at Komfo Anokye Teaching Hospital (KATH), Kumasi Kwame Nkrumah University of Science and Technology*. Kumasi.
- Doern, G. V., & Chapin, K. C. (1987). Determination of biotypes of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* a comparison of methods and a description of a new biotype (VIII) of *H. parainfluenzae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, *7*(4), 269-272.



- Doi, Y., & Arakawa, Y. (2007). 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis*, 45(1), 88-94. <https://doi.org/10.1086/518605>
- Donkor, E. S., Stabler, R. A., Hinds, J., Adegbola, R. A., Antonio, M., & Wren, B. W. (2012). Comparative phylogenomics of *Streptococcus pneumoniae* isolated from invasive disease and nasopharyngeal carriage from West Africans. *BMC Genomics*, 13, 569. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-569>
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 8(9), 881-890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Egbe, C. A., Ndiokwere, C., & Omoregie, R. (2011). Microbiology of lower respiratory tract infections in benin city, Nigeria. *Malays J Med Sci*, 18(2), 27-31.
- El-Shabrawy, M., & El-Sokkary, R. H. (2016). Role of fiberoptic bronchoscopy and BAL in assessment of the patients with non-responding pneumonia. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*, 65(3), 613-620. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejcdt.2015.12.006>
- Elkholy, A., Elkaraksy, H., Fattouh, A., Bazaraa, H., Hegazy, R., & Abdelhalim, M. (2009). Acute lower respiratory tract infection due to *Chlamydia* and *Mycoplasma* spp. in Egyptian children under 5 years of age. *J Trop Pediatr*, 55(3), 195-197. <https://doi.org/10.1093/tropej/fmn102>
- Elliott, E., Oosthuizen, D., Johnson, M. M., & Piddock, L. J. V. (2003). Fluoroquinolone resistance in *Haemophilus influenzae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(4), 734-735. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg420>
- Endimiani, A., Hujer, K. M., Hujer, A. M., Kurz, S., Jacobs, M. R., Perlin, D. S., & Bonomo, R. A. (2011). Are we ready for novel detection methods to treat respiratory pathogens in hospital-acquired pneumonia? *Clin Infect Dis*, 52 Suppl 4, S373-383. <https://doi.org/10.1093/cid/cir054>
- Enright, M. C., & Spratt, B. G. (1999). Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol*, 7(12), 482-487.
- Erling, V., Jalil, F., Hanson, L. A., & Zaman, S. (1999). The impact of climate on the prevalence of respiratory tract infections in early childhood in Lahore, Pakistan. *J Public Health Med*, 21(3), 331-339.
- Erwin, A. L., Allen, S., Ho, D. K., Bonthuis, P. J., Jarisch, J., Nelson, K. L., Tsao, D. L., Unrath, W. C., Watson, M. E., Jr., Gibson, B. W., Apicella, M. A., & Smith, A. L. (2006). Role of IgtC in resistance of nontypeable *Haemophilus influenzae* strain R2866 to human serum. *Infect Immun*, 74(11), 6226-6235. <https://doi.org/10.1128/iai.00722-06>
- Faccone, D., Lopez-Ruitti, P., Vazquez, M., Guerriero, L., Lucero, C., Gagetti, P., Ceriana, P., & Corso, A. (2016). Molecular characterization of a clinical *Haemophilus parainfluenzae* isolate with cefotaxime resistance and decreased susceptibility to fluoroquinolones. *Infect Genet Evol*, 44, 507-509. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.003>
- Falla, T. J., Crook, D. W., Brophy, L. N., Maskell, D., Kroll, J. S., & Moxon, E. R. (1994). PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol*, 32(10), 2382-2386.
- Feikin, D. R., Njenga, M. K., Bigogo, G., Aura, B., Aol, G., Audi, A., Jagero, G., Muluare, P. O., Gikunju, S., Nderitu, L., Balish, A., Winchell, J., Schneider, E., Erdman, D., Oberste, M. S., Katz, M. A., & Breiman, R. F. (2012). Etiology and Incidence of viral and bacterial acute respiratory illness among older children and adults in rural western Kenya, 2007-2010. *PLoS One*, 7(8), e43656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043656>
- Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P., & Spratt, B. G. (2004). eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol*, 186(5), 1518-1530. <https://doi.org/10.1128/jb.186.5.1518-1530.2004>

- Fekih Hassen, M., Ben Haj Khalifa, A., Tilouche, N., Ben Sik Ali, H., Ayed, S., Kheder, M., & Elatrous, S. (2014). [Severe community-acquired pneumonia admitted at the intensive care unit: main clinical and bacteriological features and prognostic factors: a Tunisian experience]. *Rev Pneumol Clin*, 70(5), 253-259. <https://doi.org/10.1016/j.pneumo.2014.03.001> (Pneumopathies communautaires severes en reanimation : caracteristiques cliniques, bacteriologiques et facteurs pronostiques: une experience tunisienne.)
- Fernández, M., Conde, S., de la Torre, J., Molina-Santiago, C., Ramos, J.-L., & Duque, E. (2012). Mechanisms of resistance to chloramphenicol in *Pseudomonas putida* KT2440. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(2), 1001-1009. <https://doi.org/10.1128/AAC.05398-11>
- Finney, L. J., Ritchie, A., Pollard, E., Johnston, S. L., & Mallia, P. (2014). Lower airway colonization and inflammatory response in COPD: a focus on *Haemophilus influenzae*. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 9, 1119-1132. <https://doi.org/10.2147/copd.s54477>
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., & et al. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269(5223), 496-512.
- Fonkoua, M. C., Cunin, P., Sorlin, P., Musi, J., & Martin, P. M. (2001). [Bacterial meningitis in Yaounde (Cameroon) in 1999-2000]. *Bull Soc Pathol Exot*, 94(4), 300-303. (Les meningites d'etiologie bacterienne a Yaounde (Cameroun) en 1999-2000.)
- Fonkoua, M. C., Cunin, P., Sorlin, P., Musi, J., & Martin, P. M. V. (2001). Les méningites d'étiologie bactérienne à Yaoundé (Cameroun) en 1999-2000. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 94(4), 300-303.
- Forgie, I. M., O'Neill, K. P., Lloyd-Evans, N., Leinonen, M., Campbell, H., Whittle, H. C., & Greenwood, B. M. (1991). Etiology of acute lower respiratory tract infections in Gambian children: II. Acute lower respiratory tract infection in children ages one to nine years presenting at the hospital. *Pediatr Infect Dis J*, 10(1), 42-47.
- Francisco, A. P., Bugalho, M., Ramirez, M., & Carrico, J. A. (2009). Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics*, 10, 152-152. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-152>
- Freschi, C. R., Silva Carvalho, L. F. O., & Oliveira, C. J. B. (2005). Comparison of DNA-extraction methods and Selective Enrichment broths on the detection of *Salmonella* Typhimurium in swine feces by polymerase chain reaction (PCR). *Braz. J. Microbiol.*, 36(4), 363-367.
- Frickmann, H., Christner, M., Donat, M., Berger, A., Essig, A., Podbielski, A., Hagen, R. M., & Poppert, S. (2013). Rapid discrimination of *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, and *H. haemolyticus* by fluorescence in situ hybridization (FISH) and two matrix-assisted laser-desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) platforms. *PLoS One*, 8(4), e63222. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063222>
- G, B. (2017). *Métagenomique comparative de novo à grande échelle* Université de Rennes 1]. Rennes.
- Gaingne, S. (2009). Santé de l'enfant: Voici le nouveau vaccin disponible au Cameroun. *Journal du Cameroun*.
- García-Cobos, S., Arroyo, M., Campos, J., Pérez-Vázquez, M., Aracil, B., Cercenado, E., Orden, B., Lara, N., & Oteo, J. (2013). Novel mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Haemophilus parainfluenzae*:  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin resistance and inhibitor-resistant TEM  $\beta$ -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(5), 1054-1059. <https://doi.org/10.1093/jac/dks525>
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *The Journal of investigative dermatology*, 133(3), 1-4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>

- Gaynor, M., & Mankin, A. S. (2003). Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance. *Curr Top Med Chem*, 3(9), 949-961.
- GBD. (2017). Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect Dis*, 17(11), 1133-1161. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(17\)30396-1](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30396-1)
- Gerlach, G., & Reidl, J. (2006). NAD<sup>+</sup> Utilization in Pasteurellaceae: Simplification of a Complex Pathway. *J Bacteriol*, 188(19), 6719-6727. <https://doi.org/10.1128/jb.00432-06>
- Gervaix, A., Taguebue, J., Bescher, B. N., Corbeil, J., Raymond, F., Alcoba, G., Kobela, M., & Tetanye, E. (2012). Bacterial meningitis and pneumococcal serotype distribution in children in cameroon. *Pediatr Infect Dis J*, 31(10), 1084-1087. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318260552d>
- Gessner, B., Njanpop-Lafourcade, B., & Herbert, M. (2017). Haemophilus influenzae. *Antimicrobe*. <http://antimicrobe.org/b67.asp>
- Gessner, B. D. (2002). Worldwide variation in the incidence of Haemophilus influenzae type b meningitis and its association with ampicillin resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 21(2), 79-87.
- Gilbert, G. L., Clements, D. A., & Broughton, S. J. (1990). Haemophilus influenzae type b infections in Victoria, Australia, 1985 to 1987. *Pediatr Infect Dis J*, 9(4), 252-257.
- Giufre, M., Daprai, L., Cardines, R., Bernaschi, P., Rava, L., Accogli, M., Raponi, M., Garlaschi, M. L., Ciofi degli Atti, M. L., & Cerquetti, M. (2015). Carriage of Haemophilus influenzae in the oropharynx of young children and molecular epidemiology of the isolates after fifteen years of H. influenzae type b vaccination in Italy. *Vaccine*, 33(46), 6227-6234. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.082>
- Giufre, M., Fabiani, M., Cardines, R., Riccardo, F., Caporali, M. G., D'Ancona, F., Pezzotti, P., & Cerquetti, M. (2018). Increasing trend in invasive non-typeable Haemophilus influenzae disease and molecular characterization of the isolates, Italy, 2012-2016. *Vaccine*, 36(45), 6615-6622. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.09.060>
- Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. (2015). *Lancet*, 385(9963), 117-171. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)61682-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(14)61682-2)
- Goldstein, B. P. (2014). Resistance to rifampicin: a review. *J Antibiot (Tokyo)*, 67(9), 625-630. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.107>
- Gowin, E., Bartkowska-Śniatkowska, A., Jończyk-Potoczna, K., Wysocka-Leszczynska, J., Bobkowski, W., Fichna, P., Sobkowiak, P., Mazur-Melewska, K., Bręborowicz, A., Wysocki, J., & Januszkiewicz-Lewandowska, D. (2017). Assessment of the Usefulness of Multiplex Real-Time PCR Tests in the Diagnostic and Therapeutic Process of Pneumonia in Hospitalized Children: A Single-Center Experience. *Biomed Res Int*, 2017, 8037963-8037963. <https://doi.org/10.1155/2017/8037963>
- Grass, S., Buscher, A. Z., Swords, W. E., Apicella, M. A., Barenkamp, S. J., Ozchlewski, N., & St Geme, J. W., 3rd. (2003). The Haemophilus influenzae HMW1 adhesin is glycosylated in a process that requires HMW1C and phosphoglucosyltransferase, an enzyme involved in lipooligosaccharide biosynthesis. *Mol Microbiol*, 48(3), 737-751.
- Grief, S. N. (2013). Upper respiratory infections. *Prim Care*, 40(3), 757-770. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2013.06.004>
- Hamouda, S., Chraiet, K., Khalsi, F., Bel Hadj, I., Brini, I., Smaoui, H., Barsaoui, S., Samoud, A., Ben Becher, S., Ben Jaballah, N., Kechrid, A., Tinsa, F., & Boussetta, K. (2016). Community-acquired pleuropneumonia in children: Bacteriological and therapeutic challenges. *Tunis Med*, 94(4), 290-297.

- Hare, K. M., Marsh, R. L., Smith-Vaughan, H. C., Bauert, P., & Chang, A. B. (2015). Respiratory bacterial culture from two sequential bronchoalveolar lavages of the same lobe in children with chronic cough. *J Med Microbiol*, 64(11), 1353-1360. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000173>
- Harrison, L. H., da Silva, G. A., Pittman, M., Fleming, D. W., Vranjac, A., & Broome, C. V. (1989). Epidemiology and clinical spectrum of Brazilian purpuric fever. Brazilian Purpuric Fever Study Group. *J Clin Microbiol*, 27(4), 599-604.
- Hasçelik, G., & Kittana, F. N. A. (2018). Investigation of serotype distribution and antibiotic susceptibility in B-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains from adult patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 73, 130. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.04.3709>
- Hirschtick, R. E., Glassroth, J., Jordan, M. C., Wilcosky, T. C., Wallace, J. M., Kvale, P. A., Markowitz, N., Rosen, M. J., Mangura, B. T., & Hopewell, P. C. (1995). Bacterial pneumonia in persons infected with the human immunodeficiency virus. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. *N Engl J Med*, 333(13), 845-851. <https://doi.org/10.1056/nejm199509283331305>
- Ho, D. K., Ram, S., Nelson, K. L., Bonthuis, P. J., & Smith, A. L. (2007). IgtC expression modulates resistance to C4b deposition on an invasive nontypeable *Haemophilus influenzae*. *J Immunol*, 178(2), 1002-1012.
- Hoffmann, J., Rabezanaahary, H., Randriamarotia, M., Ratsimbaoa, A., Najjar, J., Vernet, G., Contamin, B., & Paranhos-Baccalà, G. (2012). Viral and Atypical Bacterial Etiology of Acute Respiratory Infections in Children under 5 Years Old Living in a Rural Tropical Area of Madagascar. *PLoS One*, 7(8), e43666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043666>
- Hong, W., Pang, B., West-Barnette, S., & Swords, W. E. (2007). Phosphorylcholine expression by nontypeable *Haemophilus influenzae* correlates with maturation of biofilm communities in vitro and in vivo. *J Bacteriol*, 189(22), 8300-8307. <https://doi.org/10.1128/JB.00532-07>
- Howie, S. R., Morris, G. A., Tokarz, R., Ebruke, B. E., Machuka, E. M., Ideh, R. C., Chimah, O., Secka, O., Townend, J., Dione, M., Oluwalana, C., Njie, M., Jallow, M., Hill, P. C., Antonio, M., Greenwood, B., Briese, T., Mulholland, K., Corrah, T., Lipkin, W. I., & Adegbola, R. A. (2014). Etiology of severe childhood pneumonia in the Gambia, West Africa, determined by conventional and molecular microbiological analyses of lung and pleural aspirate samples. *Clin Infect Dis*, 59(5), 682-685. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu384>
- Hu, F., Rishishwar, L., Sivadas, A., Mitchell, G. J., Jordan, I. K., Murphy, T. F., Gilsdorf, J. R., Mayer, L. W., & Wang, X. (2016). Comparative Genomic Analysis of *Haemophilus haemolyticus* and Nontypeable *Haemophilus influenzae* and a New Testing Scheme for Their Discrimination. *J Clin Microbiol*, 54(12), 3010-3017. <https://doi.org/10.1128/jcm.01511-16>
- Huang, L., & Crothers, K. (2009). HIV-associated opportunistic pneumonias. *Respirology*, 14(4), 474-485. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2009.01534.x>
- Huo, X., Qin, Y., Qi, X., Zu, R., Tang, F., Li, L., Hu, Z., & Zhu, F. (2012). Surveillance of 16 respiratory viruses in patients with influenza-like illness in Nanjing, China. *J Med Virol*, 84(12), 1980-1984. <https://doi.org/10.1002/jmv.23401>
- Huson, D. H., & Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol*, 23(2), 254-267. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj030>
- Illarionova, V., Eisenreich, W., Fischer, M., Haußmann, C., Römisch, W., Richter, G., & Bacher, A. (2002). Biosynthesis of Tetrahydrofolate: stereochemistry of dihydroneopterin aldolase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(32), 28841-28847. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204046200>

- Intra, J., Sala, M. R., Falbo, R., Cappellini, F., & Brambilla, P. (2016). Reducing time to identification of aerobic bacteria and fastidious micro-organisms in positive blood cultures. *Lett Appl Microbiol*, 63(6), 400-405. <https://doi.org/10.1111/lam.12682>
- Itoh, S., Kazumi, Y., Abe, C., & Takahashi, M. (2003). Heterogeneity of RNA polymerase gene (rpoB) sequences of *Mycobacterium gordonae* clinical isolates identified with a DNA probe kit and by conventional methods. *J Clin Microbiol*, 41(4), 1656-1663. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.4.1656-1663.2003>
- Jacobs, M. R., Bajaksouzian, S., Zilles, A., Lin, G., Pankuch, G. A., & Appelbaum, P. C. (1999). Susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to 10 oral antimicrobial agents based on pharmacodynamic parameters: 1997 U.S. Surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(8), 1901-1908.
- James, P. A., & Reeves, D. S. (1996). Bacterial resistance to cephalosporins as a function of outer membrane permeability and access to their target. *J Chemother*, 8 Suppl 2, 37-47.
- Janah, H., Souhi, H., Kouissmi, H., Marc, K., Zahraoui, R., Benamor, J., Soualhi, M., & Bourkadi, J. E. (2014). Pulmonary tuberculosis and tobacco: about 100 cases [La tuberculose pulmonaire et le tabac: à propos de 100 cas]. *Pan Afr Med J*, 19, 202-202. <https://doi.org/10.11604/pamj.2014.19.202.5329>
- Jiang, H., Su, M., Kui, L., Huang, H., Qiu, L., Li, L., Ma, J., Du, T., Fan, M., Sun, Q., & Liu, X. (2017). Prevalence and antibiotic resistance profiles of cerebrospinal fluid pathogens in children with acute bacterial meningitis in Yunnan province, China, 2012-2015. *PLoS One*, 12(6), e0180161-e0180161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180161>
- Jolley, K. A., Bliss, C. M., Bennett, J. S., Bratcher, H. B., Brehony, C., Colles, F. M., Wimalaratna, H., Harrison, O. B., Sheppard, S. K., Cody, A. J., & Maiden, M. C. J. (2012). Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology (Reading, England)*, 158(Pt 4), 1005-1015. <https://doi.org/10.1099/mic.0.055459-0>
- Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res*, 3, 124-124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Jolley, K. A., & Maiden, M. C. (2010). BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*, 11, 595. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-595>
- Jroundi, I., Mahraoui, C., Benmessaoud, R., Moraleda, C., Tligui, H., Seffar, M., Kettani, S. C., Benjelloun, B. S., Chaacho, S., Maaroufi, A., Hayes, E. B., Alvarez-Martinez, M. J., Munoz-Almagro, C., Ruiz, J., Alonso, P. L., & Bassat, Q. (2014). The epidemiology and aetiology of infections in children admitted with clinical severe pneumonia to a university hospital in Rabat, Morocco. *J Trop Pediatr*, 60(4), 270-278. <https://doi.org/10.1093/tropej/fmu010>
- Kacou-Ndouba, A., Revathi, G., Mwathi, P., Seck, A., Diop, A., Kabedi-Bajani, M. J., Mwiti, W., Anguibi-Pokou, M. J., Morrissey, I., & Torumkuney, D. (2016). Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2011-14 in the Democratic Republic of Congo, Ivory Coast, Republic of Senegal and Kenya. *J Antimicrob Chemother*, 71 Suppl 1(Suppl 1), i21-i31. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw070>
- Khan, S., Priti, S., & Ankit, S. (2015). Bacteria Etiological Agents Causing Lower Respiratory Tract Infections and Their Resistance Patterns. *Iran Biomed J*, 19(4), 240-246.
- Kilian, M. (1976). A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. *J Gen Microbiol*, 93(1), 9-62. <https://doi.org/10.1099/00221287-93-1-9>
- Kilian, M., Mestecky, J., & Russell, M. W. (1988). Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol Rev*, 52(2), 296-303.

- Kilian, M., Reinholdt, J., Lomholt, H., Poulsen, K., & Frandsen, E. V. (1996). Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. *Apmis*, 104(5), 321-338.
- KILIAN, M., & THEILADE, J. (1975). Cell Wall Ultrastructure of Strains of *Haemophilus ducreyi* and *Haemophilus piscium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 25(4), 351-356. <https://doi.org/doi:10.1099/00207713-25-4-351>
- Kim, E. S., Kim, E. C., Lee, S. M., Yang, S. C., Yoo, C. G., Kim, Y. W., Han, S. K., & Yim, J. J. (2012). Bacterial yield from quantitative cultures of bronchoalveolar lavage fluid in patients with pneumonia on antimicrobial therapy. *Korean J Intern Med*, 27(2), 156-162. <https://doi.org/10.3904/kjim.2012.27.2.156>
- King, P. (2012). *Haemophilus influenzae* and the lung (*Haemophilus* and the lung). *Clinical and translational medicine*, 1(1), 10-10. <https://doi.org/10.1186/2001-1326-1-10>
- Koser, C. U., Ellington, M. J., & Peacock, S. J. (2014). Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends Genet*, 30(9), 401-407. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.003>
- Kostyanov, T. S., & Sechanova, L. P. (2012). Virulence factors and mechanisms of antibiotic resistance of *haemophilus influenzae*. *Folia Med (Plovdiv)*, 54(1), 19-23.
- Koulla-Shiro, S., Kuaban, C., & Belec, L. (1996). Acute community-acquired bacterial pneumonia in Human Immunodeficiency Virus (HIV) infected and non-HIV-infected adult patients in Cameroon: aetiology and outcome. *Tuber Lung Dis*, 77(1), 47-51. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962847996900751>
- Koulla-Shiro, S., Kuaban, C., & Belec, L. (1997). Microbial etiology of acute community-acquired pneumonia in adult hospitalized patients in Yaounde-Cameroon. *Clin Microbiol Infect*, 3(2), 180-186.
- Kozarewa, I., Ning, Z., Quail, M. A., Sanders, M. J., Berriman, M., & Turner, D. J. (2009). Amplification-free Illumina sequencing-library preparation facilitates improved mapping and assembly of (G+C)-biased genomes. *Nat Methods*, 6(4), 291-295. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1311>
- Kroll, J. S., Loynds, B. M., & Moxon, E. R. (1991). The *Haemophilus influenzae* capsulation gene cluster: a compound transposon. *Mol Microbiol*, 5(6), 1549-1560.
- Kroll, J. S., Zamze, S., Loynds, B., & Moxon, E. R. (1989). Common organization of chromosomal loci for production of different capsular polysaccharides in *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol*, 171(6), 3343-3347.
- Kurabachew, M., Lu, S. H., Krastel, P., Schmitt, E. K., Suresh, B. L., Goh, A., Knox, J. E., Ma, N. L., Jiricek, J., Beer, D., Cynamon, M., Petersen, F., Dartois, V., Keller, T., Dick, T., & Sambandamurthy, V. K. (2008). Lipiarmycin targets RNA polymerase and has good activity against multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*, 62(4), 713-719. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn269>
- Kuti, B. P., & Oyelami, O. A. (2014). Risk factors for parapneumonic effusions among children admitted with community-acquired pneumonia at a tertiary hospital in south-west Nigeria. *African Journal of Respiratory Medicine*, 10(1), 26-34.
- Kuvat, N., Nazik, H., Berkiten, R., & Ongen, B. (2015). Tem-1 and Rob-1 presence and antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* strains, Istanbul, Turkey. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 46(2), 254-261.
- Kwofie, T. B., Anane, Y. A., Nkrumah, B., Annan, A., Nguah, S. B., & Owusu, M. (2012). Respiratory viruses in children hospitalized for acute lower respiratory tract infection in Ghana. *Virol J*, 9, 78. <https://doi.org/10.1186/1743-422x-9-78>
- LaClaire, L. L., Tondella, M. L., Beall, D. S., Noble, C. A., Raghunathan, P. L., Rosenstein, N. E., & Popovic, T. (2003). Identification of *Haemophilus influenzae* serotypes by standard slide agglutination serotyping and PCR-based capsule typing. *J Clin Microbiol*, 41(1), 393-396. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.1.393-396.2003>

- LaCross, N. C., Marrs, C. F., & Gilsdorf, J. R. (2013). Population structure in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Genet Evol*, 14, 125-136. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.11.023>
- Lagare, A., Maïnassara, H. B., Issaka, B., Sidiki, A., & Tempia, S. (2015). Viral and bacterial etiology of severe acute respiratory illness among children < 5 years of age without influenza in Niger. *BMC Infect Dis*, 15, 515. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1251-y>
- Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33(1), 159-174.
- Lassmann, B., Poetschke, M., Ninteretse, B., Issifou, S., Winkler, S., Kremsner, P. G., Graninger, W., & Apfalter, P. (2008). Community-acquired pneumonia in children in Lambarene, Gabon. *Am J Trop Med Hyg*, 79(1), 109-114.
- Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., Mok, M.-Y., Teng, J. L. L., Tam, V. K. P., Chan, K. K. H., & Yuen, K.-Y. (2004). Characterization of *Haemophilus segnis*, an important cause of bacteremia, by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol*, 42(2), 877-880. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.2.877-880.2004>
- Laupland, K. B., & Valiquette, L. (2013). The changing culture of the microbiology laboratory. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 24(3), 125-128.
- Lee, Y. C., Kelly, D. F., Yu, L. M., Slack, M. P., Booy, R., Heath, P. T., Siegrist, C. A., Moxon, R. E., & Pollard, A. J. (2008). *Haemophilus influenzae* type b vaccine failure in children is associated with inadequate production of high-quality antibody. *Clin Infect Dis*, 46(2), 186-192. <https://doi.org/10.1086/524668>
- Leggett, J. E. (2017). 143 - Aminoglycosides. In J. Cohen, W. G. Powderly, & S. M. Opal (Eds.), *Infectious Diseases (Fourth Edition)* (pp. 1233-1238.e1231). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00143-X>
- Liljemark, W. F., Bloomquist, C. G., Uhl, L. A., Schaffer, E. M., Wolff, L. F., Pihlstrom, B. L., & Bandt, C. L. (1984). Distribution of oral *Haemophilus* species in dental plaque from a large adult population. *Infection and immunity*, 46(3), 778-786. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6500711>/<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC261613/>
- Lockman, S., Hone, N., Kenyon, T. A., Mwasekaga, M., Villauthapillai, M., Creek, T., Zell, E., Kirby, A., Thacker, W. L., Talkington, D., Moura, I. N., Binkin, N. J., Clay, L., & Tappero, J. W. (2003). Etiology of pulmonary infections in predominantly HIV-infected adults with suspected tuberculosis, Botswana. *Int J Tuberc Lung Dis*, 7(8), 714-723.
- Lorenzen, D. R., Dux, F., Wolk, U., Tsirpouchtsidis, A., Haas, G., & Meyer, T. F. (1999). Immunoglobulin A1 protease, an exoenzyme of pathogenic *Neisseriae*, is a potent inducer of proinflammatory cytokines. *J Exp Med*, 190(8), 1049-1058.
- Lulitanond, A., Chanawong, A., Pienthaweechai, K., Sribenjalux, P., Tavichakorntrakool, R., Wilailuckana, C., Puang-Ngern, P., & Saetung, P. (2012). Prevalence of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *haemophilus influenzae* isolated from patients of a teaching hospital in Thailand. *Jpn J Infect Dis*, 65(2), 122-125.
- Lung, M., & Codina, G. (2012). Molecular diagnosis in HAP/VAP. *Curr Opin Crit Care*, 18(5), 487-494. <https://doi.org/10.1097/MCC.0b013e3283577d37>
- MacFaddin, J. F. (2000). *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Macherey-Nagel (2017). *Clean-up of Sequencing Reactions*.
- Maddi, S., Kolsum, U., Jackson, S., Barraclough, R., Maschera, B., Simpson, K. D., Pascal, T. G., Durviaux, S., Hessel, E. M., & Singh, D. (2017). Ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* from COPD patients in the UK. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 12, 1507-1518. <https://doi.org/10.2147/copd.s135338>

- Magnet, S., & Blanchard, J. S. (2005). Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev*, 105(2), 477-498. <https://doi.org/10.1021/cr0301088>
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., & Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), 3140-3145. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9501229>/<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC19708/>
- Mandrell, R. E., & Apicella, M. A. (1993). Lipo-oligosaccharides (LOS) of mucosal pathogens: molecular mimicry and host-modification of LOS. *Immunobiology*, 187(3-5), 382-402. [https://doi.org/10.1016/s0171-2985\(11\)80352-9](https://doi.org/10.1016/s0171-2985(11)80352-9)
- Marais, B. J., Rabie, H., Schaaf, S. H., & Cotton, M. F. (2006). Common opportunistic infections in HIV infected infants and children Part 1-respiratory infections. *SA Fam Pract*, 48(10), 52-56. <https://doi.org/10.1080/20786204.2006.10873487>
- Marimón, J. M., Morales, M., Cilla, G., Vicente, D., & Pérez-Trallero, E. (2015). Detection of bacteria and viruses in the pleural effusion of children and adults with community-acquired pneumonia. *Future Microbiol*, 10(6), 909-915. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.143>
- Marti, S., Puig, C., de la Campa, A. G., Tirado-Velez, J. M., Tubau, F., Domenech, A., Calatayud, L., Garcia-Somoza, D., Ayats, J., Linares, J., & Ardanuy, C. (2016). Identification of Haemophilus haemolyticus in clinical samples and characterization of their mechanisms of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*, 71(1), 80-84. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv307>
- Marti, S., Puig, C., de la Campa, A. G., Tirado-Velez, J. M., Tubau, F., Domenech, A., Calatayud, L., Garcia-Somoza, D., Ayats, J., Liñares, J., & Ardanuy, C. (2015). Identification of Haemophilus haemolyticus in clinical samples and characterization of their mechanisms of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(1), 80-84. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv307>
- Massenet, D., Birguel, J., Azowe, F., Ebong, C., Gake, B., Lombart, J. P., & Boisier, P. (2013). Epidemiologic pattern of meningococcal meningitis in northern Cameroon in 2007-2010: contribution of PCR-enhanced surveillance. *Pathog Glob Health*, 107(1), 15-20. <https://doi.org/10.1179/2047773212y.0000000070>
- Massenet, D., & Tapindjin-Gake, M. (2010). Positive effect of the introduction of Haemophilus influenzae type b vaccination in the expanded program on immunization in Cameroon. *Vaccine*, 28(39), 6404-6405. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.033>
- Matar, G. M., Chahwan, R., Fuleihan, N., Uwaydah, M., & Hadi, U. (2001). PCR-based detection, restriction endonuclease analysis, and transcription of tonB in Haemophilus influenzae and Haemophilus parainfluenzae isolates obtained from children undergoing tonsillectomy and adenoidectomy. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8(2), 221-224. <https://doi.org/10.1128/cdli.8.2.221-224.2001>
- Matter, D., Rossano, A., Limat, S., Vorlet-Fawer, L., Brodard, I., & Perreten, V. (2007). Antimicrobial resistance profile of Actinobacillus pleuropneumoniae and Actinobacillus porcitonisillarum. *Vet Microbiol*, 122(1-2), 146-156. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.01.009>
- Matu M, Kikivi G, Wanzala P, Karama M, & S, S. (2014). Aetiology of acute respiratory infections in children under five years in Nakuru, Kenya. *J Microbiol Exp*, 1(4), 00021. <https://doi.org/10.15406/jmen.2014.01.00021>



- Mazzei, T., Mini, E., Novelli, A., & Periti, P. (1993). Chemistry and mode of action of macrolides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 31(suppl\_C), 1-9. [https://doi.org/10.1093/jac/31.suppl\\_C.1](https://doi.org/10.1093/jac/31.suppl_C.1)
- McCrea, K. W., Xie, J., LaCross, N., Patel, M., Mukundan, D., Murphy, T. F., Marrs, C. F., & Gilsdorf, J. R. (2008). Relationships of nontypeable *Haemophilus influenzae* strains to hemolytic and nonhemolytic *Haemophilus haemolyticus* strains. *J Clin Microbiol*, 46(2), 406-416. <https://doi.org/10.1128/JCM.01832-07>
- Meats, E., Feil, E. J., Stringer, S., Cody, A. J., Goldstein, R., Kroll, J. S., Popovic, T., & Spratt, B. G. (2003). Characterization of encapsulated and noncapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*, 41(4), 1623-1636.
- Meats, E., Feil, E. J., Stringer, S., Cody, A. J., Goldstein, R., Kroll, J. S., Popovic, T., & Spratt, B. G. (2003). Characterization of Encapsulated and Noncapsulated *Haemophilus influenzae* and Determination of Phylogenetic Relationships by Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol*, 41(4), 1623-1636. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.4.1623-1636.2003>
- Menard, A., Buissonniere, A., Prouzet-Mauleon, V., Sifre, E., & Megraud, F. (2016). The GyrA encoded gene: A pertinent marker for the phylogenetic revision of *Helicobacter* genus. *Syst Appl Microbiol*, 39(2), 77-87. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.09.008>
- Meyler, K. L., Meehan, M., Bennett, D., Cunney, R., & Cafferkey, M. (2012). Development of a diagnostic real-time polymerase chain reaction assay for the detection of invasive *Haemophilus influenzae* in clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 74(4), 356-362. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.08.018>
- Meyler, K. L., Meehan, M., Bennett, D., Cunney, R., & Cafferkey, M. (2012). Development of a diagnostic real-time polymerase chain reaction assay for the detection of invasive *Haemophilus influenzae* in clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 74(4), 356-362. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.08.018>
- Mistry, D., & Stockley, R. A. (2006). IgA1 protease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(8), 1244-1248. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.10.005>
- Mobley, H. L., Island, M. D., & Hausinger, R. P. (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev*, 59(3), 451-480. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7565414>/<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239369/>
- Moise, K., Bernard, J. J., & Henrys, J. H. (2017). Evaluation of antibiotic self-medication among outpatients of the state university hospital of Port-Au-Prince, Haiti: a cross-sectional study. *Pan Afr Med J*, 28, 4. <https://doi.org/10.11604/pamj.2017.28.4.12589>
- Mollet, C., Drancourt, M., & Raoult, D. (1997). rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol Microbiol*, 26(5), 1005-1011.
- Montgomery, K., Raymundo, L., Jr., & Drew, W. L. (1979). Chromogenic cephalosporin spot test to detect beta-lactamase in clinically significant bacteria. *J Clin Microbiol*, 9(2), 205-207. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34624/>
- Moustaoui, N., Aitmand, R., Elmdaghri, N., & Benbachir, M. (2000). Serotypes, biotypes and antimicrobial susceptibilities of *Haemophilus influenzae* isolated from invasive disease in children in Casablanca. *Clinical Microbiology and Infection*, 6(1), 48-49. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00015-3.x>
- Mulholland, E. K., Ogunlesi, O. O., Adegbola, R. A., Weber, M., Sam, B. E., Palmer, A., Manary, M. J., Secka, O., Aidoo, M., Hazlett, D., Whittle, H., & Greenwood, B. M. (1999). Etiology of serious infections in young Gambian infants. *Pediatr Infect Dis J*, 18(10 Suppl), S35-41.

- Mulu, W., Yizengaw, E., Alemu, M., Mekonnen, D., Hailu, D., Ketemaw, K., Abera, B., & Kibret, M. (2018). Pharyngeal colonization and drug resistance profiles of *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Haemophilus influenzae* among HIV infected children attending ART Clinic of Felegehiwot Referral Hospital, Ethiopia. *PLoS One*, 13(5), e0196722-e0196722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196722>
- Murphy, T. F., Brauer, A. L., Sethi, S., Kilian, M., Cai, X., & Lesse, A. J. (2007). *Haemophilus haemolyticus*: A Human Respiratory Tract Commensal to Be Distinguished from *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis*, 195(1), 81-89. <https://doi.org/10.1086/509824>
- Murphy, T. F., & Kirkham, C. (2002). Biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili. *BMC Microbiol*, 2, 7.
- Murphy, T. F., Kirkham, C., Jones, M. M., Sethi, S., Kong, Y., & Pettigrew, M. M. (2015). Expression of IgA Proteases by *Haemophilus influenzae* in the Respiratory Tract of Adults With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Infect Dis*, 212(11), 1798-1805. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv299>
- Murphy, T. F., Sethi, S., Klingman, K. L., Brueggemann, A. B., & Doern, G. V. (1999). Simultaneous respiratory tract colonization by multiple strains of nontypeable *haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease: implications for antibiotic therapy. *J Infect Dis*, 180(2), 404-409. <https://doi.org/10.1086/314870>
- Musher., D. M. (1996). *Haemophilus* Species. In B. S (Ed.), *Medical Microbiology. 4th edition*.
- Musser, J. M., Barenkamp, S. J., Granoff, D. M., & Selander, R. K. (1986). Genetic relationships of serologically nontypable and serotype b strains of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 52(1), 183-191.
- Musser, J. M., Kroll, J. S., Granoff, D. M., Moxon, E. R., Brodeur, B. R., Campos, J., Dabernat, H., Frederiksen, W., Hamel, J., Hammond, G., & et al. (1990). Global genetic structure and molecular epidemiology of encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Rev Infect Dis*, 12(1), 75-111.
- Mzilem, S., Ksiasa, S., Smaoui, H., & Kechrid, A. (2015). *Haemophilus influenzae* strains in children: Increasing resistance to Beta-lactam antibiotics. *International Journal of Microbiology and Immunology Research*, 3(6), 084-089.
- Naushad, S., Adeolu, M., Goel, N., Khadka, B., Al-Dahwi, A., & Gupta, R. S. (2015). Phylogenomic and molecular demarcation of the core members of the polyphyletic *pasteurellaceae* genera *actinobacillus*, *haemophilus*, and *pasteurella*. *International journal of genomics*, 2015, 198560-198560. <https://doi.org/10.1155/2015/198560>
- Ndiaye, A. G., Boye, C. S., Hounkponou, E., Gueye, F. B., & Badiane, A. (2009). Antimicrobial susceptibility of select respiratory tract pathogens in Dakar, Senegal. *J Infect Dev Ctries*, 3(9), 660-666. <https://doi.org/10.3855/jidc.20>
- Ndip, R. N., Ntiege, E. A., Ndip, L. M., Nkwelang, G., Akoachere, J. F., & Akenji, T. N. (2008). Antimicrobial resistance of bacterial agents of the upper respiratory tract of school children in Buea, Cameroon. *J Health Popul Nutr*, 26(4), 397-404.
- Nepal, G., & Bhatta, S. (2018). Self-medication with Antibiotics in WHO Southeast Asian Region: A Systematic Review. *Cureus*, 10(4), e2428-e2428. <https://doi.org/10.7759/cureus.2428>
- Neumark, T. (2010). *Treatment of Respiratory Tract Infections in Primary Care with special emphasis on Acute Otitis Media* (Publication Number 1166 ) [Medical Dissertations, Linköping University]. Sweden
- Nevine, R. E. B., Amira, S. E. R., Tamer, A. A. H., Dina, M. H., May, S. S., & Lobna, S. (2018). Respiratory Viruses and Atypical Bacteria Co-Infection in Children with Acute Respiratory Infection. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 6(9). <https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.332>

- Ngu, R. C., Feteh, V. F., Kika, B. T., F, E. K. N., Ayeah, C. M., Chifor, T., Njim, T., Fankem, A. M., & Yengo, F. K. F. (2018). Prevalence and Determinants of Antibiotic Self-Medication among Adult Patients with Respiratory Tract Infections in the Mboppi Baptist Hospital, Douala, Cameroon: A Cross-Sectional Study. *Diseases (Basel, Switzerland)*, 6(2), 49. <https://doi.org/10.3390/diseases6020049>
- Noel, G. J., Hoiseth, S. K., & Edelson, P. J. (1992). Type b capsule inhibits ingestion of *Haemophilus influenzae* by murine macrophages: studies with isogenic encapsulated and unencapsulated strains. *J Infect Dis*, 166(1), 178-182.
- Noeske, J., Nana Yakam, A., & Abena Foe, J. L. (2016). Epidemiology of tuberculosis in Cameroon as mirrored in notification data, 2006-2014. *Int J Tuberc Lung Dis*, 20(11), 1489-1494. <https://doi.org/10.5588/ijtld.16.0252>
- Nørskov-Lauritsen, N. (2014). Classification, Identification, and Clinical Significance of *Haemophilus* and *Aggregatibacter* Species with Host Specificity for Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 214-240. <https://doi.org/10.1128/cmr.00103-13>
- Nørskov-Lauritsen, N., Bruun, B., & Kilian, M. (2005). Multilocus sequence phylogenetic study of the genus *Haemophilus* with description of *Haemophilus pittmaniae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 449-456. <https://doi.org/doi:10.1099/ijs.0.63325-0>
- Nørskov-Lauritsen, N., Overballe, M. D., & Kilian, M. (2009). Delineation of the Species *Haemophilus influenzae* by Phenotype, Multilocus Sequence Phylogeny, and Detection of Marker Genes. *J Bacteriol*, 191(3), 822-831. <https://doi.org/10.1128/jb.00782-08>
- Numminen, E., Chewapreecha, C., Turner, C., Goldblatt, D., Nosten, F., Bentley, S. D., Turner, P., & Corander, J. (2015). Climate induces seasonality in pneumococcal transmission. *Sci Rep*, 5, 11344. <https://doi.org/10.1038/srep11344>
- Nyamande, K., Lalloo, U. G., & John, M. (2007). TB presenting as community-acquired pneumonia in a setting of high TB incidence and high HIV prevalence. *Int J Tuberc Lung Dis*, 11(12), 1308-1313.
- Nzenze, S. A., Shiri, T., Nunes, M. C., Klugman, K. P., Kahn, K., Twine, R., de Gouveia, L., von Gottberg, A., & Madhi, S. A. (2014). Temporal association of infant immunisation with pneumococcal conjugate vaccine on the ecology of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonisation in a rural South African community. *Vaccine*, 32(42), 5520-5530. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.06.091>
- O'Brien, K. L., Nohynek, H., & Group, W. H. O. P. V. T. C. W. (2003). Report from a WHO Working Group: standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr Infect Dis J*, 22(2), e1-11. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000049347.42983.77>
- O'Callaghan, C. H., Morris, A., Kirby, S. M., & Shingler, A. H. (1972). Novel method for detection of beta-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob Agents Chemother*, 1(4), 283-288. <https://doi.org/10.1128/aac.1.4.283>
- O'Donnell, O. (2007). Access to health care in developing countries: breaking down demand side barriers. *Cadernos de Saúde Pública*, 23, 2820-2834. [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102311X2007001200003&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102311X2007001200003&nrm=iso)
- O'Grady, K. F., Grimwood, K., Sloots, T. P., Whiley, D. M., Acworth, J. P., Phillips, N., Goyal, V., & Chang, A. B. (2016). Prevalence, codetection and seasonal distribution of upper airway viruses and bacteria in children with acute respiratory illnesses with cough as

- a symptom. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(6), 527-534. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.02.004>
- Oberhofer, T. R., & Back, A. E. (1979). Biotypes of Haemophilus encountered in clinical laboratories. *J Clin Microbiol*, 10(2), 168-174. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/315964>
- Odile B. Harrison, A. B. B., Dominique A. Caugant, Arie van der Ende, Matthias Frosch, Stephen Gray, Sigrud Heuberger, Paula Krizova, Per Olcen, Mary Slack, Muhamed-Kheir Taha and Martin C. J Maiden (2011). Molecular typing methods for outbreak detection and surveillance of invasive disease caused by Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumoniae, a review. *Microbiology*, 157, 2181-2195. <https://doi.org/DOI 10.1099/mic.0.050518-0>
- Ogeneh, B. O., Uchenna V. Okolie, U. V., Emenuga, V. N., & Umezinne, N. C. (2014). Carriage rates of Haemophilus influenzae in Nasopharyngeal aspirates of pre-school children in Enugu State, Nigeria. *International Journal of Medicine and Medical Science Research*, 2(5), 053-057.
- Ortqvist, A., Hedlund, J., & Kalin, M. (2005). Streptococcus pneumoniae: epidemiology, risk factors, and clinical features. *Semin Respir Crit Care Med*, 26(6), 563-574. <https://doi.org/10.1055/s-2005-925523>
- Osman, K. L., Jefferies, J. M. C., Woelk, C. H., Devos, N., Pascal, T. G., Mortier, M.-C., Devaster, J.-M., Wilkinson, T. M. A., Cleary, D. W., Clarke, S. C., Alnajjar, J., Anderson, R., Aris, E., Ballou, W. R., Barton, A., Bourne, S., Caubet, M., Cohet, C., Coombs, N., Devine, V., Dineen, E., Elliott, T., Gladstone, R., Harden, S., Kim, V., Vela, S. M., Moris, P., Ostridge, K., Peeters, M., Schoonbroodt, S., Staples, K. J., Tuck, A., Welch, L., Weynants, V., Williams, A. P., Williams, N., Wojtas, M., Wootton, S., & Group, A. S. (2018). Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease harbour a variation of Haemophilus species. *Sci Rep*, 8(1), 14734. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32973-3>
- Ouedraogo, A. S., Jean Pierre, H., Banuls, A. L., Ouedraogo, R., & Godreuil, S. (2017). Emergence and spread of antibiotic resistance in West Africa : contributing factors and threat assessment. *Med Sante Trop*, 27(2), 147-154. <https://doi.org/10.1684/mst.2017.0678> (Emergence et diffusion de la resistance aux antibiotiques en Afrique de l'Ouest : facteurs favorisant et evaluation de la menace.)
- Pefura Yone, E. W., Kuaban, C., Afane Ze, E., & Simo, L. (2012). [Clinical characteristics, microbiologic findings and outcome of non-tuberculous purulent pleural effusion in HIV-infected and non HIV-infected adult patients in Yaounde, Cameroon]. *Rev Pneumol Clin*, 68(4), 225-232. <https://doi.org/10.1016/j.pneumo.2011.09.005> (Caracteristiques cliniques, bacteriologiques et evolutives de la pleuresie purulente non-tuberculeuse chez les patients adultes seropositifs et seronegatifs au VIH a Yaounde, Cameroun.)
- Pefura Yone, E. W., Kuaban, C., Leonie, S., & Afane Ze, E. (2012). [Nontuberculous purulent pleural effusion in adults in Yaounde, Cameroon]. *Med Sante Trop*, 22(1), 35-39. <https://doi.org/10.1684/mst.2012.0007> (La pleuresie purulente non tuberculeuse de l'adulte a Yaounde (Cameroun).)
- Pérez-Trallero, E., Martín-Herrero, J. E., Mazón, A., García-Delafuente, C., Robles, P., Iriarte, V., Dal-Ré, R., & García-de-Lomas, J. (2010). Antimicrobial Resistance among Respiratory Pathogens in Spain: Latest Data and Changes over 11 Years (1996-1997 to 2006-2007). *Antimicrob Agents Chemother*, 54(7), 2953-2959. <https://doi.org/10.1128/aac.01548-09>
- Perez-Vazquez, M., Roman, F., Aracil, B., Canton, R., & Campos, J. (2004). Laboratory detection of Haemophilus influenzae with decreased susceptibility to nalidixic acid,

- ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin due to GyrA and ParC mutations. *J Clin Microbiol*, 42(3), 1185-1191. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.3.1185-1191.2004>
- Pérez-Vázquez, M., Román, F., García-Cobos, S., & Campos, J. (2007). Fluoroquinolone resistance in *Haemophilus influenzae* is associated with hypermutability. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(4), 1566-1569. <https://doi.org/10.1128/AAC.01437-06>
- Peric, M., Bozdogan, B., Jacobs, M. R., & Appelbaum, P. C. (2003). Effects of an efflux mechanism and ribosomal mutations on macrolide susceptibility of *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(3), 1017-1022. <https://doi.org/10.1128/aac.47.3.1017-1022.2003>
- Pickering, J., Richmond, P. C., & Kirkham, L. A. (2014). Molecular tools for differentiation of non-typeable *Haemophilus influenzae* from *Haemophilus haemolyticus*. *Front Microbiol*, 5, 664. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00664>
- Pincus, D. H., & Miller, M. (2005). Encyclopedia of rapid microbiological methods. *Miller, MJ (Ed.)*, 1e32.
- Popowicz, N. D., Lansley, S. M., Cheah, H. M., Kay, I. D., Carson, C. F., Waterer, G. W., Paton, J. C., Brown, J. S., & Lee, Y. C. G. (2017). Human pleural fluid is a potent growth medium for *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One*, 12(11), e0188833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188833>
- Porcel, J. M., Esquerda, A., Vives, M., & Bielsa, S. (2014). Etiology of pleural effusions: analysis of more than 3,000 consecutive thoracenteses. *Arch Bronconeumol*, 50(5), 161-165. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2013.11.007>
- Porrás, O., Caugant, D. A., Gray, B., Lagergard, T., Levin, B. R., & Svanborg-Eden, C. (1986). Difference in structure between type b and nontypable *Haemophilus influenzae* populations. *Infect Immun*, 53(1), 79-89.
- Price, E. P., Harris, T. M., Spargo, J., Nosworthy, E., Beissbarth, J., Chang, A. B., Smith-Vaughan, H. C., & Sarovich, D. S. (2017). Simultaneous identification of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* using real-time PCR. *Future Microbiol*, 12, 585-593. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0215>
- Puig, C., Calatayud, L., Martí, S., Tubau, F., Garcia-Vidal, C., Carratala, J., Linares, J., & Ardanuy, C. (2013). Molecular epidemiology of nontypeable *Haemophilus influenzae* causing community-acquired pneumonia in adults. *PLoS One*, 8(12), e82515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082515>
- Puig, C., Tirado-Velez, J. M., Calatayud, L., Tubau, F., Garmendia, J., Ardanuy, C., Martí, S., de la Campa, A. G., & Linares, J. (2015). Molecular characterization of fluoroquinolone resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(1), 461-466. <https://doi.org/10.1128/aac.04005-14>
- Puig, C., Tirado-Vélez, J. M., Calatayud, L., Tubau, F., Garmendia, J., Ardanuy, C., Martí, S., de la Campa, A. G., & Liñares, J. (2015). Molecular characterization of fluoroquinolone resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(1), 461-466. <https://doi.org/10.1128/AAC.04005-14>
- Purohit, P., Al-Obaid, I. a. A., & Omar, N. G. A.-D. (2014). The first reported case of possible *Haemophilus influenzae* type b vaccine failure from Kuwait and literature-review. *J Infect Public Health*, 7(2), 99-105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jiph.2013.07.009>
- Quail, M. A., Swerdlow, H., & Turner, D. J. (2009). Improved protocols for the illumina genome analyzer sequencing system. *Current protocols in human genetics*, Chapter 18, 10.1002/0471142905.hg0471141802s0471142962-0471142918.0471142902. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg1802s62>
- Quainoo, S., Coolen, J. P. M., van Hijum, S. A. F. T., Huynen, M. A., Melchers, W. J. G., van Schaik, W., & Wertheim, H. F. L. (2017). Whole-Genome Sequencing of Bacterial

- Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(4), 1015-1063. <https://doi.org/10.1128/CMR.00016-17>
- Quentin, R., Renaud, F. N. R., & J., F. (2000). Haemophilus. In ESKA (Ed.), *Précis de Bactériologie clinique*.
- Randell, P. (2014). It's a MALDI but it's a goodie: MALDI-TOF mass spectrometry for microbial identification. *Thorax*, 69(8), 776-778. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-205349>
- Reis-Filho, J. S. (2009). Next-generation sequencing [journal article]. *Breast Cancer Research*, 11(3), S12. <https://doi.org/10.1186/bcr2431>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482-501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Ribeiro-Gonçalves, B., Francisco, A. P., Vaz, C., Ramirez, M., & Carriço, J. A. (2016). PHYLOViZ Online: web-based tool for visualization, phylogenetic inference, analysis and sharing of minimum spanning trees. *Nucleic acids research*, 44(W1), W246-W251. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw359>
- Ridderberg, W., Fenger, M. G., & Nørskov-Lauritsen, N. (2010). Haemophilus influenzae may be untypable by the multilocus sequence typing scheme due to a complete deletion of the fucose operon. *J Med Microbiol*, 59(6), 740-742. <https://doi.org/doi:10.1099/jmm.0.018424-0>
- Roberts, M. C. (1989). Plasmid-mediated Tet M in Haemophilus ducreyi. *Antimicrob Agents Chemother*, 33(9), 1611-1613. <https://doi.org/10.1128/aac.33.9.1611>
- Roberts, M. C., Actis, L. A., & Crosa, J. H. (1985). Molecular characterization of chloramphenicol-resistant Haemophilus parainfluenzae and Haemophilus ducreyi. *Antimicrob Agents Chemother*, 28(2), 176-180. <https://doi.org/10.1128/aac.28.2.176>
- Roberts, M. C., Swenson, C. D., Owens, L. M., & Smith, A. L. (1980). Characterization of chloramphenicol-resistant Haemophilus influenzae. *Antimicrob Agents Chemother*, 18(4), 610-615. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6969577>
- Rodriguez-Martinez, J. M., Lopez-Hernandez, I., & Pascual, A. (2011). Molecular characterization of high-level fluoroquinolone resistance in a clinical isolate of Haemophilus parainfluenzae. *J Antimicrob Chemother*, 66(3), 673-675. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq473>
- Roier, S., Leitner, D. R., Iwashkiw, J., Schild-Prüfert, K., Feldman, M. F., Krohne, G., Reidl, J., & Schild, S. (2012). Intranasal Immunization with Nontypeable Haemophilus influenzae Outer Membrane Vesicles Induces Cross-Protective Immunity in Mice. *PLoS One*, 7(8), e42664. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042664>
- Rowland GC, Aboshkiwa M, & G., C. (1992). Comparative sequence analysis and predicted phylogeny of the DNA-dependent RNA polymerase beta subunits of Staphylococcus aureus and other eubacteria. *Biochem Soc Trans*, 21(1), 40S.
- Satish, M., & NM, A. (2016). Study of incidence of upper respiratory tract infections in urban and rural population. *Sch. J. App. Med. Sci*, 4(6C), 2023-2026.
- Satola, S. W., Collins, J. T., Napier, R., & Farley, M. M. (2007). Capsule gene analysis of invasive Haemophilus influenzae: accuracy of serotyping and prevalence of IS1016 among nontypeable isolates. *J Clin Microbiol*, 45(10), 3230-3238. <https://doi.org/10.1128/jcm.00794-07>
- Satola, S. W., Schirmer, P. L., & Farley, M. M. (2003). Complete sequence of the cap locus of Haemophilus influenzae serotype b and nonencapsulated b capsule-negative variants. *Infect Immun*, 71(6), 3639-3644.
- Satola, S. W., Schirmer, P. L., & Farley, M. M. (2003). Genetic Analysis of the Capsule Locus of Haemophilus influenzae Serotype f. *Infection and immunity*, 71(12), 7202-7207. <https://doi.org/10.1128/iai.71.12.7202-7207.2003>

- Schiotz, P. O., Hoiby, N., & Hertz, J. B. (1979). Cross-reactions between *Haemophilus influenzae* and nineteen other bacterial species. *Acta Pathol Microbiol Scand B*, 87(6), 337-344.
- Schumacher, S. K., Marchant, C. D., Loughlin, A. M., Bouchet, V., Stevenson, A., & Pelton, S. I. (2012). Prevalence and genetic diversity of nontypeable *haemophilus influenzae* in the respiratory tract of infants and primary caregivers. *Pediatr Infect Dis J*, 31(2), 145-149. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31823aaeb3>
- Schweda, E. K., Richards, J. C., Hood, D. W., & Moxon, E. R. (2007). Expression and structural diversity of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*: implication in virulence. *Int J Med Microbiol*, 297(5), 297-306. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.007>
- Science, N. A. o. (2009). *Reducing Child Mortality*. West African Book Publishers Limited: 1.
- Setchanova, L. P., Kostyanov, T., Markovska, R., Miloshev, G., & Mitov, I. G. (2013). Serotypes, antimicrobial susceptibility, and beta-lactam resistance mechanisms of clinical *Haemophilus influenzae* isolates from Bulgaria in a pre-vaccination period. *Scand J Infect Dis*, 45(2), 81-87. <https://doi.org/10.3109/00365548.2012.710854>
- Sethi, S., Evans, N., Grant, B. J., & Murphy, T. F. (2002). New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 347(7), 465-471. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012561>
- Seyama, S., Wajima, T., Yanagisawa, Y., Nakaminami, H., Ushio, M., Fujii, T., & Noguchi, N. (2017). Rise in *Haemophilus influenzae* With Reduced Quinolone Susceptibility and Development of a Simple Screening Method. *Pediatr Infect Dis J*, 36(3), 263-266. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000001415>
- Shafik, C. F., Mohareb, E. W., Yassin, A. S., Amin, M. A., El Kholy, A., El-Karakasy, H., & Youssef, F. G. (2012). Viral etiologies of lower respiratory tract infections among Egyptian children under five years of age [journal article]. *BMC Infect Dis*, 12(1), 350. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-350>
- Shamsi, H., Mardani, K., & Ownagh, A. (2017). Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* isolated from broilers with colibacillosis based on *gyrA* gene sequences. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 81(1), 28-32. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28154459>
- Shayegani, M., Maupin, P. S., & McGlynn, D. M. (1978). Evaluation of the API 20E system for identification of nonfermentative Gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol*, 7(6), 539-545. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/353067>
- Shimazaki, T., Taniguchi, T., Saludar, N. R. D., Gustilo, L. M., Kato, T., Furumoto, A., Kato, K., Saito, N., Go, W. S., Tria, E. S., Salva, E. P., Dimaano, E. M., Parry, C., Ariyoshi, K., Villarama, J. B., & Suzuki, M. (2018). Bacterial co-infection and early mortality among pulmonary tuberculosis patients in Manila, The Philippines. *Int J Tuberc Lung Dis*, 22(1), 65-72. <https://doi.org/10.5588/ijtld.17.0389>
- Shimeles, E., Enquselassie, F., Aseffa, A., Tilahun, M., Mekonen, A., Wondimagegn, G., & Hailu, T. (2019). Risk factors for tuberculosis: A case-control study in Addis Ababa, Ethiopia. *PLoS One*, 14(4), e0214235-e0214235. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214235>
- Shiri, T., Nunes, M. C., Adrian, P. V., Van Niekerk, N., Klugman, K. P., & Madhi, S. A. (2013). Interrelationship of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* colonization within and between pneumococcal-vaccine naive mother-child dyads. *BMC Infect Dis*, 13, 483. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-483>

- Shively, R. G., Shigei, J. T., Peterson, E. M., & de la Maza, L. M. (1981). Typing of *Haemophilus influenzae* by coagglutination and conventional slide agglutination. *J Clin Microbiol*, *14*(6), 706-708.
- Shoji, H., Shirakura, T., Fukuchi, K., Takuma, T., Hanaki, H., Tanaka, K., & Niki, Y. (2014). A molecular analysis of quinolone-resistant *Haemophilus influenzae*: Validation of the mutations in Quinolone Resistance-Determining Regions. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *20*(4), 250-255. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jiac.2013.12.007>
- Simon Brooker, C. A. D., Helen L. Guyatt. (2000). Estimating the number of helminthic infections in the Republic of Cameroon from data on infection prevalence in schoolchildren [Research]. *Bulletin of the World Health Organization*, *78*(12), 1456-1465.
- Sims, W. (1970). Oral haemophili. *J Med Microbiol*, *3*(4), 615-625. <https://doi.org/10.1099/00222615-3-4-615>
- Simusika, P., Bateman, A. C., Theo, A., Kwenda, G., Mfula, C., Chentulo, E., & Monze, M. (2015). Identification of viral and bacterial pathogens from hospitalized children with severe acute respiratory illness in Lusaka, Zambia, 2011-2012: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis*, *15*(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0779-1>
- Skaare, D., Anthonisen, I. L., Caugant, D. A., Jenkins, A., Steinbakk, M., Strand, L., Sundsfjord, A., Tveten, Y., & Kristiansen, B. E. (2014). Multilocus sequence typing and *ftsI* sequencing: a powerful tool for surveillance of penicillin-binding protein 3-mediated beta-lactam resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *BMC Microbiol*, *14*, 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-131>
- Sondergaard, A., & Norskov-Lauritsen, N. (2016). Contribution of PBP3 Substitutions and TEM-1, TEM-15, and ROB-1 Beta-Lactamases to Cefotaxime Resistance in *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae*. *Microb Drug Resist*, *22*(4), 247-252. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0189>
- Spaic, A., Seinige, D., Muller, A., & Kehrenberg, C. (2019). First report of tetracycline resistance mediated by the *tet(O)* gene in *Haemophilus parasuis*. *J Glob Antimicrob Resist*, *17*, 21-22. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.03.003>
- Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A., & Wondrack, L. (1996). Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother*, *40*(11), 2562-2566.
- Swaminathan, S. (2016). Tuberculosis/HIV co-infection. *International Journal of Infectious Diseases*, *45*, 6. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.02.043>
- Swords, W. E. (2012). Nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms: role in chronic airway infections. *Front Cell Infect Microbiol*, *2*, 97-97. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00097>
- Swords, W. E., Moore, M. L., Godzicki, L., Bukofzer, G., Mitten, M. J., & VonCannon, J. (2004). Sialylation of Lipooligosaccharides Promotes Biofilm Formation by Nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infection and immunity*, *72*(1), 106-113. <https://doi.org/10.1128/iai.72.1.106-113.2004>
- Tang, J., Chen, J., He, T., Jiang, Z., Zhou, J., Hu, B., & Yang, S. (2019). Diversity of upper respiratory tract infections and prevalence of *Streptococcus pneumoniae* colonization among patients with fever and flu-like symptoms. *BMC Infect Dis*, *19*(1), 24-24. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3662-z>
- Tankeshwar. (2012). Coagulase Test: Principle, procedure and interpretation. *Bacteriology, Biochemical tests in Microbiology, laboratory diagnosis of Bacterial Disease, Microbiology for Beginners*.
- Taura D.W., A. H., A. M. Yayo, H. Takalmawa. (2013). Bacterial isolates of the respiratory tract infection and their current sensitivity pattern among patients attending Aminu Kano Teaching Hospital Kano-Nigeria [Full Length Research Paper]. *International Research*



- Journal of Microbiology*, 4(9), 226-231.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.14303/irjm.2013.048>
- Taylor, D. E., & Chau, A. (1996). Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(1), 1-5.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8787868>
- Tchatchouang, S., Bigna, J. J., Nzouankeu, A., Fonkoua, M.-C., Nansseu, J. R., Ndangang, M. S., Kenmoe, S., Penlap, V. B., & Njouom, R. (2018). Prevalence of respiratory bacterial infections in people with lower respiratory tract infections in Africa: the BARIAFRICA systematic review and meta-analysis protocol. *BMJ Open*, 8(9), e023592-e023592.  
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-023592>
- Theodore, M. J., Anderson, R. D., Wang, X., Katz, L. S., Vuong, J. T., Bell, M. E., Juni, B. A., Lowther, S. A., Lynfield, R., MacNeil, J. R., & Mayer, L. W. (2012). Evaluation of new biomarker genes for differentiating *Haemophilus influenzae* from *Haemophilus haemolyticus*. *J Clin Microbiol*, 50(4), 1422-1424. <https://doi.org/10.1128/JCM.06702-11>
- Thompson, M., Vodicka, T. A., Blair, P. S., Buckley, D. I., Heneghan, C., & Hay, A. D. (2013). Duration of symptoms of respiratory tract infections in children: systematic review. *Bmj*, 347, f7027. <https://doi.org/10.1136/bmj.f7027>
- Tikhomirova, A., & Kidd, S. P. (2013). *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*: living together in a biofilm. *Pathog Dis*, 69(2), 114-126.  
<https://doi.org/10.1111/2049-632x.12073>
- Tinguely, R., Seiffert, S. N., Furrer, H., Perreten, V., Droz, S., & Endimiani, A. (2013). Emergence of extensively drug-resistant *Haemophilus parainfluenzae* in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(6), 2867-2869. <https://doi.org/10.1128/AAC.00221-13>
- Tribuddharat, C., Pongpech, P., & Srifuengfung, S. (2017). *Haemophilus influenzae* from patients at the largest university tertiary care center, Thailand 2012 - 2015. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 48(2), 331-337.
- Tristram, S., Jacobs, M. R., & Appelbaum, P. C. (2007). Antimicrobial Resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(2), 368-389.  
<https://doi.org/10.1128/cmr.00040-06>
- Tristram, S., Jacobs, M. R., & Appelbaum, P. C. (2007). Antimicrobial Resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin Microbiol Rev*, 20(2), 368-389.  
<https://doi.org/10.1128/cmr.00040-06>
- Tuyau, J. E., & Sims, W. (1974). Neuraminidase activity in human oral strains of haemophili. *Arch Oral Biol*, 19(9), 817-819.
- Tuyau, J. E., & Sims, W. (1975). Occurrence of haemophili in dental plaque and their association with neuraminidase activity. *J Dent Res*, 54(4), 737-739.  
<https://doi.org/10.1177/00220345750540040701>
- Ullberg, M., Lüthje, P., Mölling, P., Strålin, K., & Özenci, V. (2017). Broad-Range Detection of Microorganisms Directly from Bronchoalveolar Lavage Specimens by PCR/Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *PLoS One*, 12(1), e0170033.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170033>
- Uzoamaka, M., Ngozi, O., Johnbull, O. S., & Martin, O. (2017). Bacterial Etiology of Lower Respiratory Tract Infections and Their Antimicrobial Susceptibility. *Am J Med Sci*, 354(5), 471. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2017.06.025>
- Uzoamaka, M., Ngozi, O., Johnbull, O. S., & Martin, O. (2017). Bacterial Etiology of Lower Respiratory Tract Infections and Their Antimicrobial Susceptibility. *Am J Med Sci*, 354(5), 471-475. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2017.06.025>
- van Belkum, A., Tassios, P. T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N. K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., & Struelens, M. (2007). Guidelines for

- the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect*, 13 Suppl 3, 1-46. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01786.x>
- van Hoek, A., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A., & Aarts, H. (2011). Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview [Review]. *Front Microbiol*, 2(203). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>
- Varela, J. N., Amstalden, M. C. K., Pereira, R. F. C., de Hollanda, L. M., Ceragioli, H. J., Baranauskas, V., & Lancellotti, M. (2014). Haemophilus influenzae porine ompP2 gene transfer mediated by graphene oxide nanoparticles with effects on transformation process and virulence bacterial capacity. *Journal of nanobiotechnology*, 12, 14-14. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-12-14>
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., McKusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M. L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferriera, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y. H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N. N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J. F., Guigo, R., Campbell, M. J., Sjolander, K. V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y. H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A., & Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507), 1304-1351. <https://doi.org/10.1126/science.1058040>

- Vester, B., & Douthwaite, S. (2001). Macrolide Resistance Conferred by Base Substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(1), 1. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.1.1-12.2001>
- Vitovski, S., Dunkin, K. T., Howard, A. J., & Sayers, J. R. (2002). Nontypeable Haemophilus influenzae in Carriage and Disease: A Difference in IgA1 Protease Activity Levels. *JAMA*, 287(13), 1699-1705. <https://doi.org/10.1001/jama.287.13.1699>
- von Gottberg, A., Cohen, C., Whitelaw, A., Chhagan, M., Flannery, B., Cohen, A. L., de Gouveia, L., Plessis, M., Madhi, S. A., & Klugman, K. P. (2012). Invasive disease due to Haemophilus influenzae serotype b ten years after routine vaccination, South Africa, 2003-2009. *Vaccine*, 30(3), 565-571. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.066>
- Wang, X., Mair, R., Hatcher, C., Theodore, M. J., Edmond, K., Wu, H. M., Harcourt, B. H., Carvalho Mda, G., Pimenta, F., Nymadawa, P., Altantsetseg, D., Kirsch, M., Satola, S. W., Cohn, A., Messonnier, N. E., & Mayer, L. W. (2011). Detection of bacterial pathogens in Mongolia meningitis surveillance with a new real-time PCR assay to detect Haemophilus influenzae. *Int J Med Microbiol*, 301(4), 303-309. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.11.004>
- Washington C. Winn, Stephen D. Allen, Stephen Allen, William M Janda, Elmer W. Koneman, Paul C. Schreckenberger, Gary W. Procop, & Woods, G. L. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (L. W. a. Wilkins, Ed. 6th ed.).
- Watt JP, W. L., O'Brien KL, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, Lee E, and Levine OS. (2009). Burden of disease caused by Haemophilus influenzae type b in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*, 374 (9693), 903-911.
- Weiser, J. N., Chong, S. T., Greenberg, D., & Fong, W. (1995). Identification and characterization of a cell envelope protein of Haemophilus influenzae contributing to phase variation in colony opacity and nasopharyngeal colonization. *Mol Microbiol*, 17(3), 555-564.
- Weiser, J. N., & Pan, N. (1998). Adaptation of Haemophilus influenzae to acquired and innate humoral immunity based on phase variation of lipopolysaccharide. *Mol Microbiol*, 30(4), 767-775.
- Weller, P. F., Smith, A. L., Anderson, P., & Smith, D. H. (1977). The role of encapsulation and host age in the clearance of Haemophilus influenzae bacteremia. *J Infect Dis*, 135(1), 34-41.
- West, J. V. (2002). Acute upper airway infections. *Br Med Bull*, 61, 215-230. <https://doi.org/10.1093/bmb/61.1.215>
- WHO. (2006). WHO position paper on Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines. (Replaces WHO position paper on Hib vaccines previously published in the Weekly Epidemiological Record. *Wkly Epidemiol Rec*, 81(47), 445-452. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17124755>
- WHO. (2008). Estimating the burden of respiratory diseases. In *Practical Approach to Lung Health: Manual on Initiating PAL Implementation* (pp. 138). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310631/>
- WHO. (2016). *Global Tuberculosis Report* 2016. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)
- WHO. (2017). *Global tuberculosis report*.
- Wilke, M. S., Lovering, A. L., & Strynadka, N. C. (2005). Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol*, 8(5), 525-533. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.08.016>
- Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers, & Smith. (1917). Haemophilus. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01198>

- Wetherden, E. A., Kunde, D., & Tristram, S. G. (2013). PCR screening for the N526K substitution in isolates of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus*. *J Antimicrob Chemother*, 68(10), 2255-2258. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt189>
- Wetherden, E. A., & Tristram, S. G. (2013). Prevalence and mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance in *Haemophilus haemolyticus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(5), 1049-1053. <https://doi.org/10.1093/jac/dks532>
- Wu, Z., Li, Y., Gu, J., Zheng, H., Tong, Y., & Wu, Q. (2014). Detection of viruses and atypical bacteria associated with acute respiratory infection of children in Hubei, China. *Respirology*, 19(2), 218-224. <https://doi.org/10.1111/resp.12205>
- Xirogianni, A., Tsofia, M., Voyiatzi, A., Sioumala, M., Makri, A., Argyropoulou, A., Paniara, O., Markoulatos, P., Kourea-Kremastinou, J., & Tzanakaki, G. (2013). Diagnosis of Upper and Lower Respiratory Tract Bacterial Infections with the Use of Multiplex PCR Assays. *Diagnostics*, 3(2), 222. <http://www.mdpi.com/2075-4418/3/2/222>
- Yen, Y. F., Yen, M. Y., Lin, Y. S., Lin, Y. P., Shih, H. C., Li, L. H., Chou, P., & Deng, C. Y. (2014). Smoking increases risk of recurrence after successful anti-tuberculosis treatment: a population-based study. *Int J Tuberc Lung Dis*, 18(4), 492-498. <https://doi.org/10.5588/ijtld.13.0694>
- Yone, E. W., Balkissou, A. D., Kengne, A. P., & Kuaban, C. (2012). Influence of HIV infection on the clinical presentation and outcome of adults with acute community-acquired pneumonia in Yaounde, Cameroon: a retrospective hospital-based study. *BMC Pulm Med*, 12, 46. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-12-46>
- Yu-Ching Su, F. R., Franziska Hörhold, Kristian Riesbeck. (2014). Comparative genomic analysis reveals distinct genotypic features of the emerging pathogen *Haemophilus influenzae* type f. *BMC Genomics*, 15(38), 1-23. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-38>
- Zafar, A., Hasan, R., Nizamuddin, S., Mahmood, N., Mukhtar, S., Ali, F., Morrissey, I., Barker, K., & Torumkuney, D. (2016). Antibiotic susceptibility in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pyogenes* in Pakistan: a review of results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2002-15. *J Antimicrob Chemother*, 71 Suppl 1(Suppl 1), i103-i109. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw076>
- Zgurskaya, H. I., & Nikaido, H. (2000). Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol*, 37(2), 219-225.
- Zhang, B., Kunde, D., & Tristram, S. (2014). *Haemophilus haemolyticus* is infrequently misidentified as *Haemophilus influenzae* in diagnostic specimens in Australia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 80(4), 272-273. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.08.016>
- Zhu, B., Xiao, D., Zhang, H., Zhang, Y., Gao, Y., Xu, L., Lv, J., Wang, Y., Zhang, J., & Shao, Z. (2013). MALDI-TOF MS distinctly differentiates nontypable *Haemophilus influenzae* from *Haemophilus haemolyticus*. *PLoS One*, 8(2), e56139. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056139>
- Zwahlen, A., Kroll, J. S., Rubin, L. G., & Moxon, E. R. (1989). The molecular basis of pathogenicity in *Haemophilus influenzae*: comparative virulence of genetically-related capsular transformants and correlation with changes at the capsulation locus *cap*. *Microb Pathog*, 7(3), 225-235.
- Zwahlen, A., Winkelstein, J. A., & Moxon, E. R. (1983). Surface determinants of *Haemophilus influenzae* pathogenicity: comparative virulence of capsular transformants in normal and complement-depleted rats. *J Infect Dis*, 148(3), 385-394.

# **ANNEXES**

## ANNEXES

### Annexe 1: CLAIRANCE ETHIQUE

## COMITE NATIONAL D'ETHIQUE DE LA RECHERCHE POUR LA SANTE HUMAINE

Arrêté N° 0977/A/MINSANTE/SESP/SG/DROS/ du 18 avril 2012 portant création, organisation et fonctionnement des comités d'éthique de la recherche pour la santé humaine au sein des structures relevant du Ministère en charge de la santé publique

N° 2017/03/876/CE/CNERSH/SP

Yaoundé, le 17 mars 2017

[Cnethique\\_minsante@yahoo.fr](mailto:Cnethique_minsante@yahoo.fr)

### CLAIRANCE ETHIQUE

Le Comité National d'Éthique de la Recherche pour la Santé Humaine (CNERSH), en sa session extraordinaire du 17 mars 2017, a examiné le projet de recherche intitulé : «**Etude de la circulation et typage moléculaire de *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* chez les patients souffrant d'infection des voies respiratoires au Cameroun**» soumis par **Monsieur TCHATCHOUANG Serges**, Investigateur Principal, étudiant à la Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I.

Le projet est d'un grand intérêt scientifique et social. L'objectif de cette étude est de caractériser phénotypiquement et génotypiquement les souches des bactéries chez les patients souffrant d'infection des voies respiratoires isolées au Cameroun. La procédure de l'étude est bien documentée, et claire. Les risques liés aux prélèvements par les écouvillons nasopharyngés sont précisés ainsi que les mesures pour les éviter et les minimiser. Les mesures prises pour garantir la confidentialité des données collectées sont présentes dans le document. Les CVs des Investigateurs les décrivent comme des personnes compétentes, capables de mener à bien cette étude. Pour toutes ces raisons, le Comité National d'Éthique approuve pour une durée d'un an, la mise en œuvre de la présente version du protocole.

L'étudiant **TCHATCHOUANG Serges** est responsable du respect scrupuleux du protocole approuvé et ne devrait y apporter aucun amendement aussi mineur soit-il, sans avis favorable du CNERSH. Les investigateurs sont appelés à collaborer pour toute descente du CNERSH pour le suivi de la mise en œuvre du protocole approuvé. Le rapport final du projet devra être soumis au CNERSH et aux autorités sanitaires du Cameroun.

La présente clairance peut être retirée en cas de non respect de la réglementation en vigueur et des recommandations susmentionnées.

En foi de quoi, la présente clairance éthique est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Ampliations

- MINSANTE



Président

Pr. Lazare KAPTUE

N.B : cette clairance éthique ne vous dispense pas de l'autorisation administrative de recherche (AAR), exigée pour mener cette étude sur le territoire camerounais. Cette dernière vous sera délivrée par le Ministère de la Santé Publique.

## Annexe 2: AUTORISATION DE RECHERCHE DU CENTRE PASTEUR DU CAMEROUN

REPUBLIQUE DU CAMEROUN  
Paix - Travail - Patrie



REPUBLIC OF CAMEROON  
Peace - Work - Fatherland



Yaoundé, le 2 Décembre 2016

« L'Excellence en Biologie accessible à tous »

**Chef du service de virologie**

### **Objet : Autorisation de Recherche**

Je soussigné, Dr Richard NJOUOM, Chef du service de virologie du Centre Pasteur du Cameroun (CPC),

Autorise Monsieur Serges TCHATCHOUANG, étudiant en Ph.D à l'Université de Yaoundé 1 à mener ses travaux de recherche au CPC sur le thème : « Etude de la circulation et typage moléculaire de *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* chez les patients souffrant d'infection des voies respiratoires à Yaoundé, Cameroun » dans le cadre de la surveillance de la grippe du Ministère de la Santé Publique. Cette activité sera dirigée au CPC par moi-même.

En foi de quoi, la présente autorisation de recherche est établie et délivrée pour servir et valoir partout ce que de droit.

**Chef du service de virologie**



Dr. Richard Njouom  
Chef Service de Virologie  
Centre Pasteur du Cameroun

CENTRE PASTEUR DU CAMEROUN - Laboratoire National de Référence et de Santé Publique  
Membre du Réseau International des Instituts Pasteur  
BP 1274 YAOUNDE CAMEROUN - Internet: [WWW.pasteur-yaounde.org](http://WWW.pasteur-yaounde.org)  
Tel : (237) 22 23 10 15 / 22 23 18 03 - Télécopie : (237) 22 23 15 64 - [cpc@pasteur-yaounde.org](mailto:cpc@pasteur-yaounde.org)

### Annexe 3 : AUTORISATION DE RECHERCHE DE L'HÔPITAL JAMOT

REPUBLIQUE DU CAMEROUN  
Paix – Travail – Patrie  
-----  
MINISTERE DE LA SANTE PUBLIQUE  
-----  
SECRETARIAT GENERAL  
-----  
HOPITAL JAMOT DE YAOUNDE  
-----



REPUBLIC OF CAMEROON  
Peace-Work-Fatherland  
-----  
MINISTRY OF PUBLIC HEALTH  
-----  
GENERAL SECRETARY  
-----  
YAOUNDE JAMOT'S HOSPITAL  
-----

00000046

N° \_\_\_\_\_ /L/MINSANTE/SG/DHJY

Yaoundé, le 13 JAN 2017

LE DIRECTEUR  
DE L'HOPITAL JAMOT DE YAOUNDE  
A  
Mr. TCHATCHOUANG Serges  
Etudiant 2<sup>ème</sup> année  
Doctorat Biochimie  
Université de Yaoundé I

Objet : **Votre autorisation de recrutement**

Monsieur,

Nous vous informons que votre autorisation de recrutement en vue de poursuivre une étude sous le thème : **«Etude de la circulation et typage moléculaire de Streptococcus Pneumoniae et Haemophilus Influenzae chez les patients souffrant d'infection des voies respiratoires au Cameroun»** a obtenu notre avis favorable.

Vous êtes prié de prendre attache avec Monsieur le Conseiller Médical qui vous introduira dans les services concernés.

Veuillez agréer, Monsieur, l'expression de nos salutations distinguées.

LE DIRECTEUR

M. Mendimi Nkodo J.M.  
Médecin - Pathologiste



**Annexe 4 : AUTORISATION DE RECHERCHE DU CENTRE HOSPITALIER  
D'ESSOS**

REPUBLIQUE DU CAMEROUN  
PAIX – TRAVAIL – PATRIE

REPUBLIC OF CAMEROON  
PEACE - WORK – FATHERLAND



**Naisse Nationale de Prévoyance Sociale**  
**National Social Insurance Fund**

BP 441 Yaoundé – Tél: 22-22-48-01  
PO BOX Fax: 22-22-57-55

Yaoundé, le 05 APR 2017

**AUTORISATION ADMINISTRATIVE**

N° 27 /17/DCHE/ DA /CE-CHE/CNPS

Je soussigné Mme Ejangue Caroline

autorise sous notre entière, **TCHATCHOUANG Serges**, étudiant en Doctorat de Biochimie, à effectuer **du 03 Avril 2017 au 03 Avril 2018** au CHE le travail de recherche relatif à l' « **Etude de la circulation et typage moléculaire de Streptococcus pneumoniae et Haemophilus influenzae chez les patients souffrant d'infection des voies respiratoires au Cameroun** ».

L'intéressé devra :

- mentionner le nom du CHE dans le rapport final de son étude,
- respecter la clause de confidentialité du CHE
- restituer les résultats de ces travaux au CHE,
- Et remettre une copie du rapport final à la direction de l'hôpital.

En foi de quoi la présente attestation lui est délivrée pour servir et faire valoir ce que de droit.



**LE DIRECTEUR DU CENTRE  
HOSPITALIER D'ESSOS**

Mme Ejangue Caroline

## Annexe 5 : NOTICE D'INFORMATION

**1. Titre de l'étude :** Etude de la circulation et typage moléculaire de *Streptococcus pneumoniae* et d'*Haemophilus influenzae* chez les patients souffrant d'infection des voies respiratoires au Cameroun.

2. Investigateur Principal : TCHATCHOUANG Serges

**3.** Il s'agit d'une invitation à participer à un projet de recherche de doctorat qui va porter sur les patients hospitalisés présentant les signes cliniques d'infection des voies respiratoires.

4. Objectifs de la recherche

L'objectif général de ce projet de recherche consistera à caractériser phénotypiquement et génotypiquement les souches des bactéries isolées chez les patients hospitalisés souffrant d'infection des voies respiratoires au Cameroun : *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* quelques années après introduction des vaccins conjugués (Hib et PCV13) et Pneumovax 23.

5. Période de l'étude et population d'étude

L'étude se déroulera pendant un an (début 2017) et portera sur les patients hospitalisés souffrant d'infection des voies respiratoires.

6. Procédure

Chaque patient avec les signes cliniques des infections des voies respiratoires qui acceptera de prendre part à l'étude devra signer une lettre de consentement éclairé ou son représentant (tuteur ou parent). Il devra remplir un questionnaire aidé d'un enquêteur. Les réponses à ce questionnaire permettront d'obtenir les caractéristiques socio-démographiques de chaque participant et des informations relatives aux facteurs de risque des infections des voies respiratoires.

Deux écouvillons naso-pharyngés par participant seront obtenus. A titre exceptionnel, des lavages broncho-alvéolaires, des liquides pleuraux, et autres liquides des voies respiratoires seront prélevés par le personnel qualifié.

**7.** Les échantillons collectés, tout document relatif à l'étude ainsi que le fichier informatisé de saisie de la base de données ne pourront être utilisés qu'à **but de recherche et seront conservés pendant une durée indéterminée** au Centre Pasteur du Cameroun.

**8. La participation à cette étude est strictement volontaire**, donc le participant est libre d'accepter ou de refuser d'y participer. En plus, le participant a le droit de retirer son consentement à participer à tout moment sans représailles.

9. Considérations éthiques

**a. Les risques** dans cette étude pour les participants sont liés aux prélèvements d'écouvillons nasopharyngés notamment une sensation de douleur passagère lors de l'introduction de l'écouvillon dans le nasopharynx. A titre exceptionnel pour certaines formes sévères des infections des voies respiratoires, des lavages broncho-alvéolaires, des liquides pleuraux, et autres liquides des voies respiratoires seront prélevés. Pour éviter et minimiser ces risques, le personnel médical et qualifié s'occupera des prélèvements.

**Les bénéfices** potentiels de cette étude sont à deux volets : en santé publique et d'ordre scientifique

Sur le plan santé publique, cette étude permettra d'évaluer l'impact de la vaccination contre *Streptococcus pneumoniae* (vaccin pneumocoque conjugué PCV13 et vaccin polysaccharidique

pneumovax23 introduits respectivement en 2011 et 2012) et *Haemophilus influenzae* (Vaccin Hib introduit en 2009) à travers les sérotypes circulant. Elle permettra aussi d'évaluer la résistance aux antibiotiques guidant ainsi le personnel médical pour une meilleure prise en charge des patients et de la surveillance de ces infections des voies respiratoires.

Sur le plan scientifique, cette étude permettra de décrire les souches bactériennes de *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* notamment les caractéristiques génétiques et phylogénétiques au Cameroun.

**b. Mesures prises pour le respect de la vie privée des participants et de la confidentialité des données :** Nous garantissons que les informations personnelles des participants auxquels nous avons accès seront utilisées uniquement dans le cadre de l'étude.

Toutes les précautions seront mises en œuvre de manière à préserver la confidentialité des données recueillies auprès des sujets de l'enquête. Ces précautions concernent en particulier le domaine de l'archivage des formulaires de l'enquête, le domaine de la saisie des données informatiques (anonymisation des données avant saisie). La diffusion ou la publication de résultats de cette étude se fera dans un strict respect des mesures interdisant l'accès à des informations directement ou indirectement nominatives.

**10. Aucune compensation financière** ne sera donnée aux participants de l'étude.

**11. Adresse complète de l'investigateur principal et des personnes à contacter en cas de nécessité :**

**Investigateur principal :** TCHATCHOUANG Serges ; Université de Yaoundé 1 ; Tel.: 698324513 ; Email: t\_serger2005@yahoo.fr

Co-investigateurs :

○ Pr. NJOUOM Richard, Centre Pasteur du Cameroun, Tel.: 699654767,  
Email: njouom@pasteur-yaounde.org

○ Dr FONKOUA Marie-Christine, Centre Pasteur du Cameroun, Tel.: 699 944 111,  
Email: fonkoua@pasteur-yaounde.org

○ Pr. PENLAP BENG Véronique, Université de Yaoundé 1, Tel.: 677695459  
Email : v.penlap@yahoo.fr

**12. Adresse détaillée du Comité National d'Ethique de la Recherche pour la santé Humaine :** Yaoundé, Cameroun. Email: cnethique\_minsante@yahoo.fr ; Téléphone: 699767427/243674339

## Annexe 5': INFORMATION SHEET

1. Title of Study: « Study of circulation and molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from patients with respiratory tract infections in Cameroon ».

2. Principal Investigator: TCHATCHOUANG Serges

This is an invitation to participate in a Doctoral research project involving patients presenting clinical signs of respiratory infection: hospitalized patients

4. Research objectives

The main objective of this research project is to characterize phenotypically and genotypically bacterial strains responsible for respiratory infections in Cameroon: *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*, a few years after introduction of conjugated vaccines (Hib and PCV13) and Pneumovax 23.

5. Study period and study population:

This study will run for one year starting in 2017 and will involve hospitalized patients suffering from respiratory tract infection.

6. Procedure:

Each participant with clinical signs of respiratory infection and consenting to take part in this study will sign a consent form. He must complete a questionnaire with the help of a clinician. The answers to this questionnaire will allow us to achieve the socio-demographic characteristics of each participant (age, gender, place of residence, etc.) and if he or she has been exposed to risk factors of respiratory tract infections: HIV status; pollution of the ambient air due to the use of kerosene and / or wood for cooking; the fact of living in crowded conditions; parental smoking.

Two nasopharyngeal swabs per participant will be obtained. Exceptionally, bronchoalveolar lavage, pleural fluid, and other respiratory tract fluids will be collected by qualified medical personnel.

7. Samples collected, any document relating to the study and the computerized file of database can be only used for research purposes and will be kept indefinitely at Centre Pasteur du Cameroun.

8. Participation to this study is strictly voluntary, so the participant is free to accept or refuse to be enrolled. In addition, the participant has the right to withdraw consent to participate at any time without reprisal.

9. Ethical considerations:

a. The **risks** in this study for participants are related to nasopharyngeal swabs, especially a transient sensation of pain during insertion of the swab into the nasopharynx. Exceptionally for certain severe forms of respiratory tract infections, bronchoalveolar lavage, pleural fluid, and other respiratory tract fluids will be collected. To avoid and minimize these risks, medical and qualified staff will handle the sampling.

The **potential benefits** of this study are twofold: public health and scientific

At the **public health** level, this study will evaluate the impact of vaccination against *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcal conjugate vaccine PCV13 and pneumovax 23 polysaccharide vaccine introduced respectively in 2011 and 2012) and *Haemophilus influenzae* (Hib conjugate vaccine introduced in 2009) through the circulating serotypes. It will also assess

antibiotic resistance and guiding the medical staff to better care for patients and the monitoring of these respiratory infections.

**Scientifically**, this study will describe the bacterial strains of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* including genetic and phylogenetic characteristics in Cameroon.

**b.** Measures taken to respect the privacy of participants and confidentiality of data: We guarantee that the personal information of participants available to us will be used only within the framework of the study.

All precautions will be implemented so as to preserve the confidentiality of data collected from the subjects of the investigation. These precautions in particular the area of archiving of survey forms, the field of entering data on computer (anonymous data before printing). The dissemination or publication of the results of this study will be done in strict compliance with measures preventing access to information directly or indirectly personal.

**10.** No **financial compensation** will be given to participants of this study

11. Full address of main investigator and of persons to contact in case of necessity:

**Principal investigator:** TCHATCHOUANG Serges, University of Yaoundé 1, Tel.: 698324513

Email: t\_sergeres2005@yahoo.fr

For any complementary information regarding this study, please contact the following co-investigators.

- Pr. NJOUOM Richard, Centre Pasteur du Cameroun, Tel.: 699654767

Email: njouom@pasteur-yaounde.org

- Dr FONKOUA Marie-Christine, Centre Pasteur du Cameroun, Tel.: 699 944 111

Email: fonkoua@pasteur-yaounde.org

- Pr. PENLAP BENG Véronique, University of Yaoundé 1, Tel.: 677695459

Email : v.penlap@yahoo.fr

**12.** Detailed address of National Ethics Committee for Research on Human Health: Yaoundé, Cameroon. Email: cnethique\_minsante@yahoo.fr ; Phone: 699767427/243674339

**Annexe 6 : FORMULAIRE DE CONSENTEMENT ECLAIRE POUR PATIENT  
MAJEUR**

Je soussigné(e), M./Mme/MLle .....

certifie avoir été informé(e) oralement et par écrit sur la nature, le but, les objectifs et les méthodes concernant le projet intitulé :

« Etude de la circulation et typage moléculaire de *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* chez les patients souffrant d'infection des voies respiratoires au Cameroun ».

J'ai obtenu des réponses satisfaisantes aux questions posées. J'ai aussi compris ce que les investigateurs attendent de moi et ce qui adviendrait si je participe à cette étude à savoir les risques et les bénéfices. J'ai bien compris que je suis libre d'accepter ou de refuser d'y participer et que mon consentement ne décharge pas les investigateurs de la recherche de leurs responsabilités, je conserve tous mes droits garantis par la loi.

J'accepte librement de participer à cette étude dans les conditions précisées dans la notice d'information c'est-à-dire (par exemple):

- de répondre aux questions d'enquête,
- de communiquer mes informations médicales,
- de donner les écouvillons naso-pharyngés, (à titre cas exceptionnel, un liquide pleural ou autre échantillon provenant des voies respiratoires).

Je donne mon accord pour que le reste de l'échantillon prélevé pour cette étude soit utilisé dans les études ultérieures.

Fait à ..... le .....

Nom de l'informateur

Adresse

Signature

Nom du participant

## Annexe 6' : ADULT INFORMED CONSENT FORM

I, the undersigned, M/Mrs/Miss/.....

Certify to have been informed orally and by written on the nature, aim, objectives and methods involved in the following project:

« Study of circulation and molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from patients with respiratory tract infections in Cameroon ».

I obtained satisfactory answers to questions asked. I also understood what the investigators are waiting from me and the risks and benefits associated to my participation to this study.

I have clearly understood that I am free to accept or to refuse to participate and that my refusal will not discharge the investigators of their responsibilities, I conserve all my rights as guarantee by law.

I freely accept to participate in this study according to the conditions precised in the information note that is (for example):

- To answer questions related to study,
- To communicate my medical information,
- To let the collection of nasal swabs (only in exceptional cases, pleural fluids or others respiratory tract samples can be collected).

I give my consent that the rest of samples collected for this study can be used for further research.

At ....., on .....

Name of informer

Address

Signature

Name of participant

Address

## **Annexe 7 : FORMULAIRE DE CONSENTEMENT ECLAIRE PARENTAL**

Je soussigné(e), M./Mme/MLle .....

certifie avoir été informé(e) oralement et par écrit sur la nature, le but, les objectifs et les méthodes concernant le projet intitulé :

« Etude de la circulation et typage moléculaire de *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* chez les patients souffrant d'infection des voies respiratoires au Cameroun ».

J'ai obtenu des réponses satisfaisantes aux questions posées. J'ai aussi compris ce que les investigateurs attendent de mon enfant et ce qui adviendrait si il/elle participe à cette étude à savoir les risques et les bénéfices. J'ai bien compris que je suis libre d'accepter ou de refuser que mon enfant y participe et que mon consentement ne décharge pas les investigateurs de la recherche de leurs responsabilités, je conserve tous mes droits et ceux de l'enfant garantis par la loi.

J'accepte librement de participer à cette étude dans les conditions précisées dans la notice d'information c'est-à-dire (par exemple):

- de répondre aux questions d'enquête,
- de communiquer les informations médicales de l'enfant,
- de donner les écouvillons naso-pharyngés (à titre exceptionnel, un liquide pleural ou autre échantillon provenant des voies respiratoires).

Je donne mon accord pour que le reste de l'échantillon prélevé pour cette étude soit utilisé dans les études ultérieures.

Fait à ..... le .....

Nom de l'informateur

Adresse

Signature

Nom du participant

Nom du représentant légal du mineur

Adresse



## Annexe 7': PARENTAL INFORMED CONSENT FORM

I, the undersigned, M/Mrs/Miss/.....

Certify to have been informed orally and by written on the nature, aim, objectives and methods involved in the following project:

« Study of circulation and molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from patients with respiratory tract infections in Cameroon ».

I obtained satisfactory answers to questions asked. I also understood what the investigators await of my child and the risks and benefits associated to his (her) participation to this study.

I have clearly understood that I am free to accept or to refuse that my child should participate and that my refusal will not discharge the investigators of their responsibilities, I conserve all my rights and those of my child as guarantee by law.

I freely accept to participate in this study according to the conditions precised in the information note that is (for example):

- To answer questions related to study,
- To communicate my child's medical information,
- To let the collection of nasal swabs (only in exceptional cases, pleural fluids or others respiratory tract samples can be collected).

I give my consent that the rest of samples collected for this study can be used for further research.

At ....., on .....

Name of informer

Address

Signature

Name of participant

Name of legal representative of participant

Address

## Annexe 8: QUESTIONNAIRE

### A. IDENTIFICATION DE LA FORMATION SANITAIRE ET DU MALADE

1. Nom de la formation sanitaire :

2. Noms et Prénoms du patient :

3. N° du malade dans le registre

4. N° téléphone:

5. Date d'enregistrement :

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

### B. ASPECTS SOCIO-DEMOGRAPHIQUES DU MALADE

6. Age ou date de naissance :

7. Sexe:  Masculin (M)  Féminin (F)

8. Nationalité :

9. Lieu/quartier de résidence :

### C. VACCINATION

Statut vaccinal Hib

10. Le patient a-t'il déjà reçu le vaccin Hib (DTC HepB +Hib) ?  Oui  Non

Si oui préciser la ou les date(s) des doses prises : \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Statut vaccinal pneumococcique

11. Le patient a-t'il déjà reçu le vaccin anti-pneumococcique PCV13 ?  Oui  Non

Si oui, préciser la ou les date(s) : \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

12. Le patient a-t'il déjà reçu le Vaccin Pneumovax 23 ?  Oui  Non

Si oui préciser la ou les date(s) des doses prises : \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

13. Preuve de vaccination :  Carnet de vaccination  Déclaration orale

### D. ANTECEDENTS D'INFECTION DES VOIES RESPIRATOIRES

14. Le patient a-t'il été en contact avec un malade connu ?

Oui  Non  Ne sait pas

15. Le patient a-t'il déjà été traité pour une infection des voies respiratoires ?

Oui  Non  Ne sait pas

Si non ou ne sait pas, passer aux questions 16

Si oui à la question 13: Répondre aux questions 14 et 15

16. Combien de fois le patient a-t-il déjà été traité pour une infection des voies respiratoires ?  Une fois  Deux fois  Trois fois ou plus

17. Quel(s) antibiotique(s) a ou ont été pris ? \_\_\_\_\_

18. Durée du traitement déjà reçu \_\_\_\_\_

#### E. FACTEURS DE RISQUE

19. Le statut VIH du patient est connu?

Oui  Non

20. Si oui, quel est son statut VIH?

Positif  Négatif  Indéterminé

21. Combien de personnes dorment par chambre?  1 à 3  4 à 6  7 et +

22. Les combustibles fossiles (pétrole) sont-ils utilisés pour la cuisson ?  Oui  Non

Si oui, le(s)quel(s) ? \_\_\_\_\_

23. Le(s) parent(s) du patient est (sont) il(s) fumeur(s) de tabac ?  Oui  Non

#### F. EPISODE D'INFECTION DES VOIES RESPIRATOIRES ACTUEL

24. Température (en degrés Celsius) du patient : \_\_\_\_\_

25. Symptômes :  Difficultés à respirer ;  Toux ;  Mal de gorge

Ecoulement nasal ;  Autre(s) symptôme(s) (préciser) : \_\_\_\_\_

26. Le patient a-t'il déjà pris un traitement antibiotique ?  Oui  Non ou

antipyrétique ?  Oui  Non Si oui le(s)quel(s) ? \_\_\_\_\_

27. Durée des symptômes au moment du diagnostic \_\_\_\_\_

28. Type de patient :  Ambulatoire;  Hospitalisé

Questionnaire rempli par : \_\_\_\_\_

Date : \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Signature \_\_\_\_\_

## Annexe 8' : QUESTIONNAIRE

### A. IDENTIFICATION OF HEALTH STRUCTURE AND PATIENT

1) Name of Health centre :

2) Name and surname of patient :

3) N° of patient in the register

4) Telephone N°.: \_\_\_\_\_

5) Registration date : \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

### B. SOCIO-DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS OF PATIENT

6) Age or date of birth : \_\_\_\_\_

7) Gender:  Male  Female

8) Nationality : \_\_\_\_\_

9) Place/Quarter of residence : \_\_\_\_\_

### C. VACCINATION

10) Has the participant already received the Hib (DTC HepB +Hib) vaccin ?  Yes  No

If Yes, precise the date(s): \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

11) Has the participant already received the PCV-13 vaccin ?  Yes ;  No

If Yes, precise the date(s): \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

12) Has the participant already received the Pneumovax 23 vaccin ?  Yes  No

If Yes, precise date : \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

13) Proof of vaccination:  Vaccination card  Oral statement

### D. HISTORY OF RESPIRATORY INFECTION

14) Has the participant been in contact with a known patient?

Yes  No  Don't know

15) Has the patient been treated already for a respiratory infection?

Yes  No  Don't know

If No or Don't know, go to question 16

If Yes to Question 13, answer 14 and 15

16) How many times has the participant been treated for a respiratory infection?

Once  Twice  Thrice

17) Which antibiotic(s) was (were) used? \_\_\_\_\_

18) Duration of treatment received \_\_\_\_\_

#### E. RISK FACTORS

18. Is the HIV status of the patient known?

Yes  No

19. If yes, what is his/her HIV status?

Positive  Negative  Indeterminate

20. How many people sleep in one room?  1 to 3  4 to 6  7 and more

21. Are fossil fuel (kerosene) used for cooking?  Yes  No

If yes, which one? \_\_\_\_\_

22. Do the patient's parent(s) smoke cigarette?  Yes  No

#### F. EPISODE OF EXISTING RESPIRATORY TRACT INFECTION

23. Temperature ( degrees Celsius) of patient : \_\_\_\_\_

24. Symptoms :  Breathing difficulties;  Cough;  Sore throat

Running nose ;  Other symptoms (precise) : \_\_\_\_\_

25. Has the patient taken antibiotic(s)?  Yes  No or antipyretics?  Yes

No

If yes, which one? \_\_\_\_\_

26. Duration of symptoms at diagnosis \_\_\_\_\_


27. Type of patient:  Outpatient ;  Hospitalized

Questionnaire filled by : \_\_\_\_\_

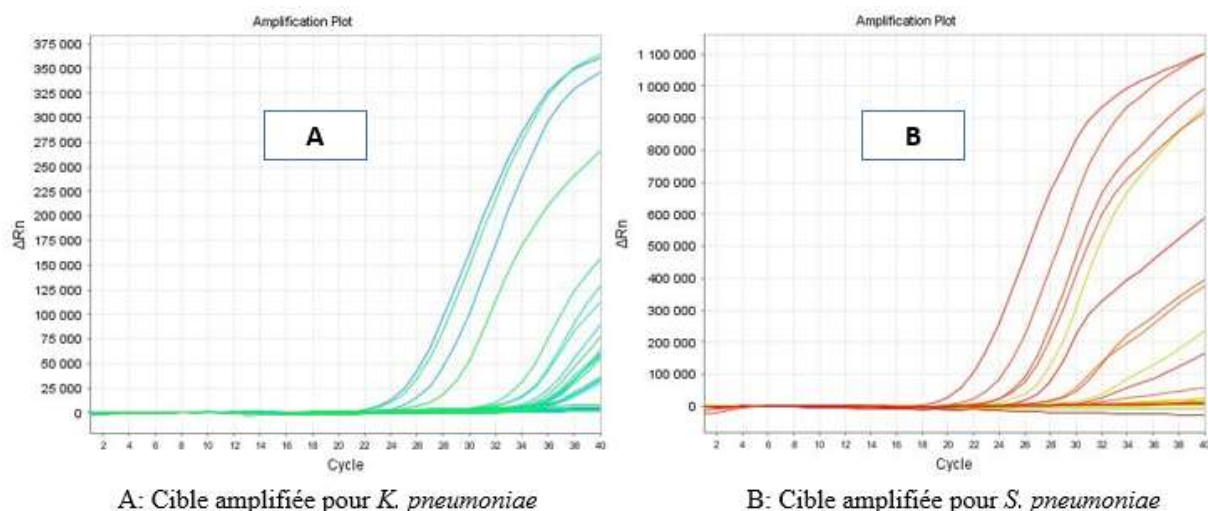
Date : \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Signature \_\_\_\_\_

## Annexe 9: FAST TRACT DIAGNOSTIC RESPIRATORY PATHOGENS 33 (RT-PCR)

Feuille de Paillasse FTD Respiratory Pathogens 33													
	<b>Mastermix</b>					<b>Programme d'amplification</b>							
	Nombres de réactions		1	35			Etapes	Cycles	T°C	Durée			
	Buffer (µL)		12,5	437,5			Transcription inverse	1	42°C	15 min			
	PP mix (µL)		1,5	52,5			Activation enzymatique	1	94°C	3 min			
	Enzyme (µL)		1	35			Amplification	40	94°C	8 sec			
	Total (µL)		15	525					60°C	34 sec			
ARN (µL)		10											
<b>Plan de Plaque FTD Respiratory Pathogens 33</b>													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	PC33				PC33				PC33		X		
B	CN				CN				CN				
C													
D													
E													
F													
G													
H				T-Ext-NEG				T-Ext-NEG				T-Ext-NEG	
<b>Information sur l'amplification</b>													
N° de lot FTD Respiratory Pathogens 33 :						Commentaire :							
Date de péremption FTD Respiratory Pathogens 33 :													
<b>Information sur le manipulateur</b>													
Nom :						Date de manipulation :							
Signature :						Date de signature :							
<b>Pathogènes respiratoires cibles</b>						<b>Contrôles positifs et négatif</b>							
FluRhino PP		FLUA, FLUB, H1N1 & RV				Resp21 PC		Contrôle positif pour PP PP mix (1-5) incluant FLUA, FLUB, H1N1swl, RV, Cor63, Cor229, Cor43, HKU, HPIV1-4, HMPV, HBoV, Mpneu, HRSV, HAAdV, EV & HPeV					
COR PP		OC43, NL63, 229E & HKU1				Resp33 PC2		Contrôle positif pour PP mix (6-8) incluant Saur, Spneu, Cpneu, HIB, Kpneu, Lpneu/Llong, PCP, Salm, Morax, Bord, FLUC and Haeinf.					
ParaEAV PP		HPIV2-4 & IC (EAV)				NC		Contrôle négatif					
BoMpP1 PP		HBoV, Mpneu, HPIV1 & HMPVA/B											
RsEPA PP		HRSVA & B, HAAdV, EV & HPeV											
RespBac PP		Saur, Spneu, Cpneu & HIB											
KLePSa PP		Kpneu, Lpneu/Llong, PCP & Salm											
MoBoCH PP		Morax, Bord, FLUC & Haeinf											

## Annexe 10 : COURBES SIGMOIDALES DES CIBLES AMPLIFIEES PAR RT-PCR (FTD-33)



## Annexe 11 : PREPARATION DES MILIEUX

### Milieu de conservation pour les pneumocoques (pour 100 mL)

Bouillon trypto-caséine-soja additionné de 0,5% de glucose, lait écrémé 2% et de glycérol 10% :

Glucose	0,5 g
Lait écrémé	2 g
Glycérol	10 mL
Bouillon trypto-caséine-soja	Q.S.P 100 mL

Milieu de conservation pour *Haemophilus* (pour 100 mL)

Bouillon cœur-cervelle	80 mL
Glycérol	20 mL

Conservation: deux mois à +4°C

Gélose G2 (GCB: milieu Gc base), pH = 7,2±0,2

Milieu Gc base	145 g
Gélose Bacto	8 g
NaOH	Q.S.P pH = 7,2
H <sub>2</sub> O	3,956 L
Supplément 1	40 mL
Supplément 2	4 mL

Supplément 1 (Conservation : 6 mois à -20°C)

C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	208 g
C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5,2 g
H <sub>2</sub> O	Q.S.P 520 mL

Supplément 2 (conservation : 6 mois à -20°C)

FeN <sub>3</sub> O <sub>9</sub> -9H <sub>2</sub> O	260 mg
H <sub>2</sub> O	Q.S.P 52 mL

Conservation: deux mois à +4°C

### **Milieu chocolat+polyvitex**

Formule typique de la poudre

Peptone spéciale	23 g/L
Chlorure de sodium	5 g/L
Amidon soluble	1 g/L
Gélose	10 g/L
pH final à 25°C ; $7.3 \pm 0.2$	

Suspendre 39 g dans 1 litre d'eau distillée stérile et porter à ébullition pour dissoudre complètement. Stériliser à 121 ° C à l'autoclave pendant 15 minutes. Refroidir à 50 ° C. Enrichir avec 5% v/v de sang défibriné stérile et 2 ampoules de supplément de croissance vitalex. Bien mélanger, distribuer dans des boîtes de Pétri stériles. Conserver les milieux préparés à +4°C pour 14 jours.

### **Milieu gélose Cystine Lactose Electrolyte-Deficient (CLED)**

Formule typique de la poudre pour 1L

Digestion enzymatique de gélatine	4 g
Digestion enzymatique de caséine	4 g
Extrait de bœuf	3 g
Lactose	10 g
L-cystine	0.128 g
Bleu de Bromothymol	0.02 g
Gélose	15 g
pH final à 25°C	$7.3 \pm 0.2$

Suspendre 36 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée stérile et porter à ébullition pour dissoudre complètement. Stériliser à 121 ° C à l'autoclave pendant 15 minutes. Refroidir à 45-50 ° C. Bien mélanger et distribuer dans des boîtes de Pétri stériles. Conserver les milieux préparés à +4°C pour 14 jours.



## Milieu gélose au sang de mouton

Formule typique de la poudre

Tryptone	14 g/L
Peptone neutralisée	4,5 g/L
Extrait de levure	4,5 g/L
Chlorure de sodium	5 g/L
Gélose	12 g/L

pH final à 25°C ;  $7.3 \pm 0.2$

Suspendre 40 g dans 1 litre d'eau distillée stérile et porter à ébullition pour dissoudre complètement. Stériliser à 121 ° C à l'autoclave pendant 15 minutes. Refroidir à 50 ° C et ajouter de manière aseptique 7% de sang de mouton stérile. Distribuer dans des boîtes de Pétri stériles et conserver les milieux préparés à +4°C pour 14 jours.

## Annexe 12 : PREPARATION DES SOLUTIONS

### Coloration de Gram

Colorant primaire : Violet de gentiane

Solution A :

Crystal violet : 2 mg

Ethanol absolu : 20 mL

Solution B :

Oxalate d'ammonium: 0.8 mg

Eau distillée: 80 mL

Mélanger les solutions A et B. Conserver pendant 24 heures et filtrer. Conserver dans une bouteille sombre

Mordant : Lugol

Iode 1 mg

Potassium d'iodure 2 mg

Eau distillée Q.S.P 100 mL

Mélanger et conserver à température ambiante dans une bouteille sombre.

Décolorant : Ethanol/acétone en proportion 4:1

Contre-colorant : Fuchsine

Safranine O 0,34 g

Alcool absolu 10 mL

Eau distillée 90 mL

Mélanger les solutions, filtrer et conserver dans une bouteille sombre

**Tampon phosphate 0,15 M, pH =7,2 ±0,2: mélange de 3 solutions A, B et C**

Solution A

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 42,58 g

H<sub>2</sub>O Q.S.P 2 L

Solution B

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10,25 g

H<sub>2</sub>O Q.S.P 500 mL

Solution C

NaCl 8,76 g

H<sub>2</sub>O Q.S.P 1 L

Conservation : température ambiante pendant un an maximum

Tampon AW1

Ethanol absolu (96-100°C) 135 mL

AW1 98 mL

Conservation : température ambiante pendant un an maximum

Tampon AW2

Ethanol absolu (96-100°C) 160 mL

AW2 66 mL

Conservation : température ambiante pendant un an maximum

Carrier RNA

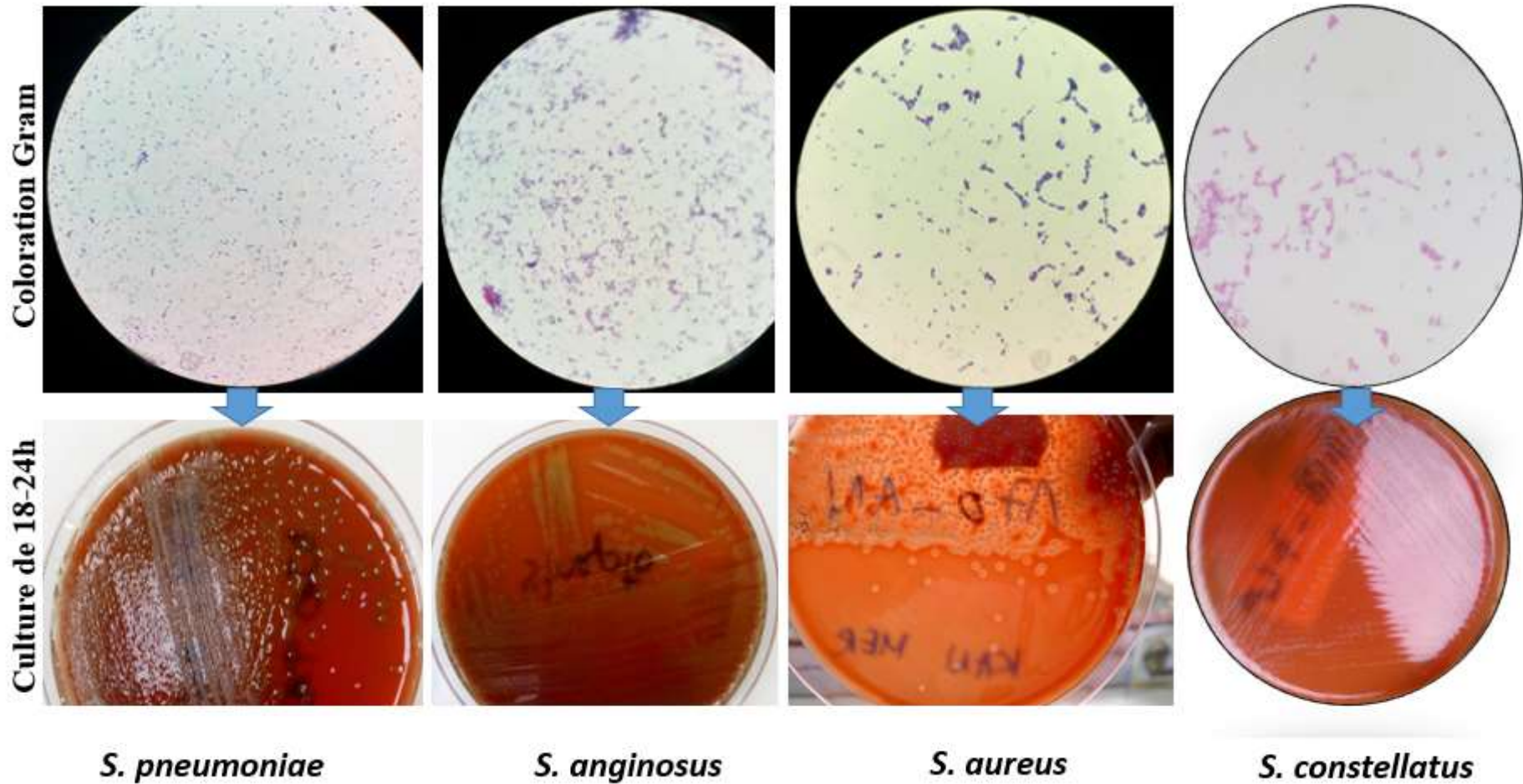
ARN carrier lyophilisé

Eau distillée *DNase/RNase free* 1 mL

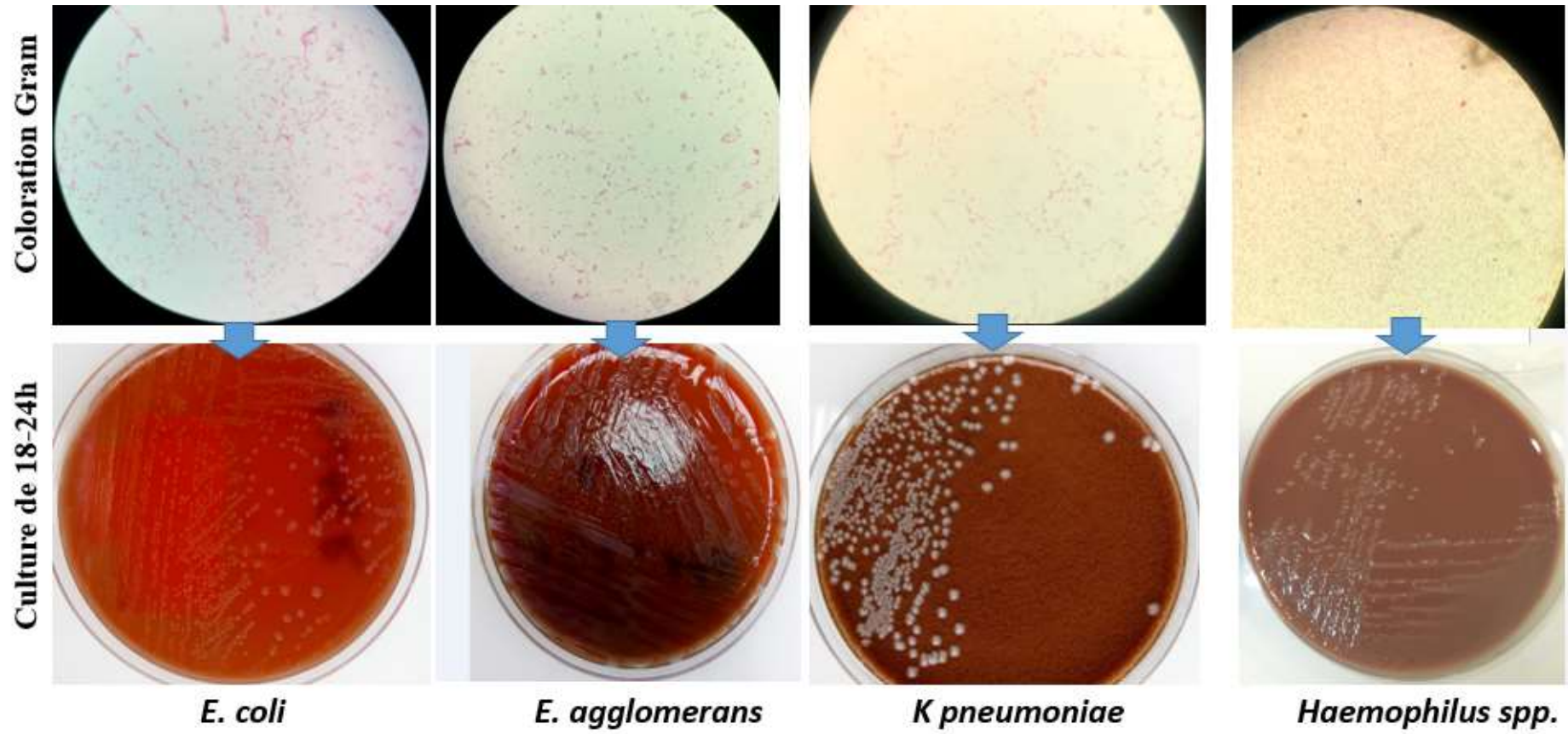
Conservation : température ambiante

Annexe 13 : PROFILS DE QUELQUES BACTERIES ISOLÉES

1- Bactéries à Gram positif



## 2. Bactéries à Gram négatif



## Annexe 14 : RÉSULTATS D'IDENTIFICATION PAR MALDI-TOF

# Bruker Daltonik MALDI Biotyper

## Résultats d'identification



### Détails du projet:

**Nom du projet:** 181023-1639-0020306116  
**Description du projet:** maldi\_serge\_231018  
**Auteur du projet:** admin@CONIFERE-CRBIP  
**Date/Heure de création du projet:** 2018-10-23T16:40:07.630  
**Nombre d'échantillons :** 64  
**Type :** Échantillon standard  
**BTS-QC :** réussi  
**Position BTS-QC :** F7:0  
**ID instrument :** 269944.00738  
**Version du serveur :** 4.1.80 (PYTH) 102 2017-08-226\_04-55-52

### Aperçu des résultats

Nom de l'échantillon	ID de l'échantillon	Organisme (meilleur candidat)	Score Valeur	Organisme (second candidat)	Score Valeur
<a href="#">A1</a> (+++)(A)	015-BN (standard)	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.40</a>	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.35</a>
<a href="#">B1</a> (+++)(A)	015-BN (standard)	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.37</a>	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.36</a>
<a href="#">C1</a> (+++)(A)	157-ACr (standard)	Haemophilus parainfluenzae	<a href="#">2.51</a>	Haemophilus parainfluenzae	<a href="#">2.40</a>
<a href="#">D1</a> (+++)(A)	157-ACr (standard)	Haemophilus parainfluenzae	<a href="#">2.49</a>	Haemophilus parainfluenzae	<a href="#">2.36</a>
<a href="#">E1</a> (+++)(A)	011-9LP (standard)	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.40</a>	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.34</a>
<a href="#">F1</a> (+++)(A)	011-9LP (standard)	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.50</a>	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.42</a>

*Aperçu des résultats -- suite page suivante*

<i>Aperçu des résultats -- suite de la page précédente</i>					
Nom de l'échantillon	ID de l'échantillon	Organisme (meilleur candidat)	Score Valeur	Organisme (second candidat)	Score Valeur
<u>A2</u> (+++)(A)	033-11AB (standard)	Haemophilus haemolyticus	<u>2.25</u>	Haemophilus haemolyticus	<u>2.21</u>
<u>B2</u> (+++)(A)	033-11AB (standard)	Haemophilus haemolyticus	<u>2.31</u>	Haemophilus haemolyticus	<u>2.27</u>
<u>C2</u> (+++)(A)	157-BCr (standard)	Haemophilus parainfluenzae	<u>2.38</u>	Haemophilus parainfluenzae	<u>2.36</u>
<u>D2</u> (+++)(A)	157-BCr (standard)	Haemophilus parainfluenzae	<u>2.43</u>	Haemophilus parainfluenzae	<u>2.38</u>
<u>E2</u> (+++)(A)	033-10AB (standard)	Haemophilus influenzae	<u>2.44</u>	Haemophilus influenzae	<u>2.27</u>
<u>F2</u> (+++)(A)	033-10AB (standard)	Haemophilus influenzae	<u>2.38</u>	Haemophilus influenzae	<u>2.38</u>
<u>A3</u> (+++)(A)	064-BN (standard)	Haemophilus haemolyticus	<u>2.37</u>	Haemophilus haemolyticus	<u>2.36</u>
<u>B3</u> (+++)(A)	064-BN (standard)	Haemophilus haemolyticus	<u>2.32</u>	Haemophilus haemolyticus	<u>2.32</u>
<u>C3</u> (+++)(A)	165-AN (standard)	Haemophilus haemolyticus	<u>2.36</u>	Haemophilus haemolyticus	<u>2.29</u>
<u>D3</u> (+++)(A)	165-AN (standard)	Haemophilus haemolyticus	<u>2.35</u>	Haemophilus haemolyticus	<u>2.30</u>
<u>E3</u> (+++)(A)	156-BN (standard)	Haemophilus influenzae	<u>2.36</u>	Haemophilus influenzae	<u>2.47</u>
<u>F3</u> (+++)(A)	156-BN (standard)	Haemophilus influenzae	<u>2.48</u>	Haemophilus influenzae	<u>2.44</u>
<u>A4</u> (+++)(A)	080-6Cr (standard)	Haemophilus parainfluenzae	<u>2.43</u>	Haemophilus parainfluenzae	<u>2.43</u>
<u>B4</u> (+++)(A)	080-6Cr (standard)	Haemophilus parainfluenzae	<u>2.47</u>	Haemophilus parainfluenzae	<u>2.43</u>
<u>C4</u> (+++)(A)	173-AN (standard)	Haemophilus haemolyticus	<u>2.30</u>	Haemophilus haemolyticus	<u>2.27</u>
<u>D4</u> (+++)(A)	173-AN (standard)	Haemophilus haemolyticus	<u>2.37</u>	Haemophilus haemolyticus	<u>2.36</u>
<i>Aperçu des résultats -- suite page suivante</i>					

<i>Aperçu des résultats -- suite de la page précédente</i>					
Nom de l'échantillon	ID de l'échantillon	Organisme (meilleur candidat)	Score Valeur	Organisme (second candidat)	Score Valeur
<a href="#">E4</a> (+++)(A)	271-EN (standard)	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.51</a>	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.46</a>
<a href="#">F4</a> (+++)(A)	271-EN (standard)	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.46</a>	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.43</a>
<a href="#">A5</a> (+++)(A)	080-5Cr (standard)	Haemophilus parahaemolyticus	<a href="#">2.37</a>	Haemophilus parahaemolyticus	<a href="#">2.23</a>
<a href="#">B5</a> (+++)(A)	080-5Cr (standard)	Haemophilus parahaemolyticus	<a href="#">2.12</a>	Haemophilus parahaemolyticus	<a href="#">2.05</a>
<a href="#">C5</a> (+++)(A)	184-CG (standard)	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.33</a>	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.30</a>
<a href="#">D5</a> (+++)(A)	184-CG (standard)	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.24</a>	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.18</a>
<a href="#">E5</a> (+++)(A)	290-CN (standard)	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.62</a>	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.48</a>
<a href="#">F5</a> (+++)(A)	290-CN (standard)	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.19</a>	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.17</a>
<a href="#">A6</a> (+++)(A)	088-15Cr (standard)	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.24</a>	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.22</a>
<a href="#">B6</a> (+++)(A)	088-15Cr (standard)	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.36</a>	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.30</a>
<a href="#">C6</a> (+++)(A)	215-AAB (standard)	Haemophilus parainfluenzae	<a href="#">2.38</a>	Haemophilus parainfluenzae	<a href="#">2.20</a>
<a href="#">D6</a> (+++)(A)	215-AAB (standard)	Haemophilus parainfluenzae	<a href="#">2.45</a>	Haemophilus parainfluenzae	<a href="#">2.30</a>
<a href="#">E6</a> (+++)(A)	324-BN (standard)	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.54</a>	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.35</a>
<a href="#">F6</a> (+++)(A)	324-BN (standard)	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.26</a>	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.16</a>
<a href="#">A7</a> (+++)(A)	103-5Cr (standard)	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.19</a>	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.19</a>
<a href="#">B7</a> (+++)(A)	103-5Cr (standard)	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.18</a>	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.17</a>
<i>Aperçu des résultats -- suite page suivante</i>					



<i>Aperçu des résultats -- suite de la page précédente</i>					
Nom de l'échantillon	ID de l'échantillon	Organisme (meilleur candidat)	Score Valeur	Organisme (second candidat)	Score Valeur
<a href="#">C7</a> (+++)(A)	276-FN (standard)	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.14</a>	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.12</a>
<a href="#">D7</a> (+++)(A)	276-FN (standard)	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.17</a>	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.09</a>
<a href="#">E7</a> (+++)(A)	BTS (BTS)	<a href="#">Escherichia coli</a>	<a href="#">2.19</a>	<a href="#">Escherichia coli</a>	<a href="#">2.16</a>
<a href="#">F7</a> (+++)(A)	BTS (BTS)	<a href="#">Escherichia coli</a>	<a href="#">2.36</a>	<a href="#">Escherichia coli</a>	<a href="#">2.21</a>
<a href="#">A8</a> (+++)(A)	108-13Cr (standard)	Haemophilus parainfluenzae	<a href="#">2.47</a>	Haemophilus parainfluenzae	<a href="#">2.44</a>
<a href="#">B8</a> (+++)(A)	108-13Cr (standard)	Haemophilus parainfluenzae	<a href="#">2.33</a>	Haemophilus parainfluenzae	<a href="#">2.32</a>
<a href="#">C8</a> (+++)(A)	291-AN (standard)	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.35</a>	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.31</a>
<a href="#">D8</a> (+++)(A)	291-AN (standard)	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.38</a>	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.37</a>
<a href="#">E8</a> (+++)(A)	080-5Cr (standard)	Haemophilus parahaemolyticus	<a href="#">2.25</a>	Haemophilus parahaemolyticus	<a href="#">2.18</a>
<a href="#">F8</a> (+++)(A)	080-5Cr (standard)	Haemophilus parahaemolyticus	<a href="#">2.23</a>	Haemophilus parahaemolyticus	<a href="#">2.10</a>
<a href="#">A9</a> (+++)(A)	117-9Cr (standard)	Haemophilus parainfluenzae	<a href="#">2.51</a>	Haemophilus parainfluenzae	<a href="#">2.47</a>
<a href="#">B9</a> (+++)(A)	117-9Cr (standard)	Haemophilus parainfluenzae	<a href="#">2.53</a>	Haemophilus parainfluenzae	<a href="#">2.40</a>
<a href="#">C9</a> (+++)(B)	298-BN (standard)	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.14</a>	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.09</a>
<a href="#">D9</a> (+++)(B)	298-BN (standard)	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.14</a>	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.13</a>
<a href="#">A10</a> (+++)(A)	122-12Cr (standard)	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.18</a>	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.13</a>
<a href="#">B10</a> (+++)(A)	122-12Cr (standard)	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.23</a>	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.18</a>
<i>Aperçu des résultats -- suite page suivante</i>					

*Aperçu des résultats -- suite de la page précédente*

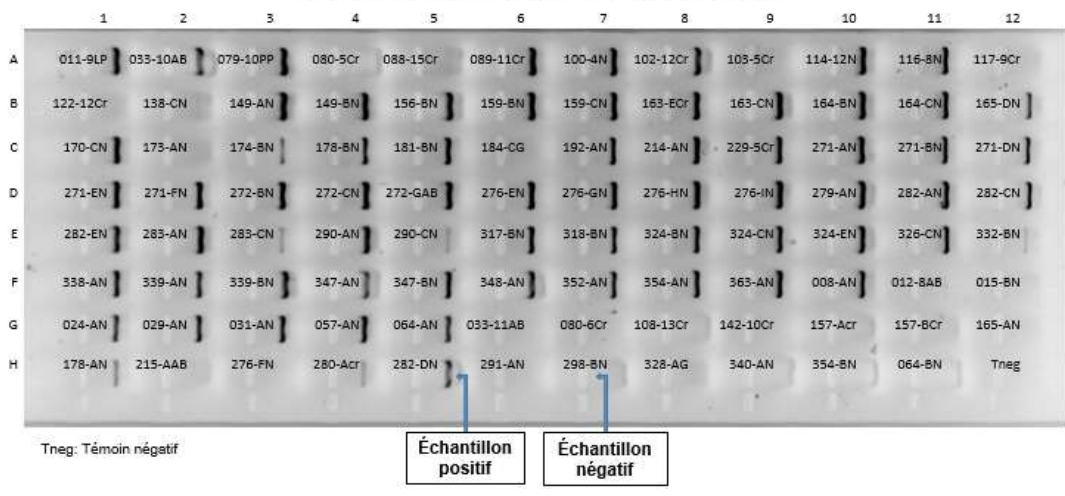
Nom de l'échantillon	ID de l'échantillon	Organisme (meilleur candidat)	Score Valeur	Organisme (second candidat)	Score Valeur
<a href="#">C10</a> (+++)(B)	328-AG (standard)	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.39</a>	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.36</a>
<a href="#">D10</a> (+++)(B)	328-AG (standard)	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.22</a>	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.25</a>
<a href="#">A11</a> (+++)(A)	138-CN (standard)	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.55</a>	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.53</a>
<a href="#">B11</a> (+++)(A)	138-CN (standard)	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.54</a>	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.44</a>
<a href="#">C11</a> (-)(B)	340-AN (standard)	<b>Aucune identification possible</b>	<a href="#">1.65</a>	<b>Aucune identification possible</b>	<a href="#">1.65</a>
<a href="#">D11</a> (+)(B)	340-AN (standard)	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">1.74</a>	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">1.70</a>
<a href="#">A12</a> (+++)(A)	142-10Cr (standard)	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.24</a>	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.20</a>
<a href="#">B12</a> (+++)(A)	142-10Cr (standard)	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.14</a>	Haemophilus haemolyticus	<a href="#">2.13</a>
<a href="#">C12</a> (+++)(A)	354-BN (standard)	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.09</a>	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.08</a>
<a href="#">D12</a> (+++)(A)	354-BN (standard)	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.04</a>	Haemophilus influenzae	<a href="#">2.00</a>

## Correspondances des scores

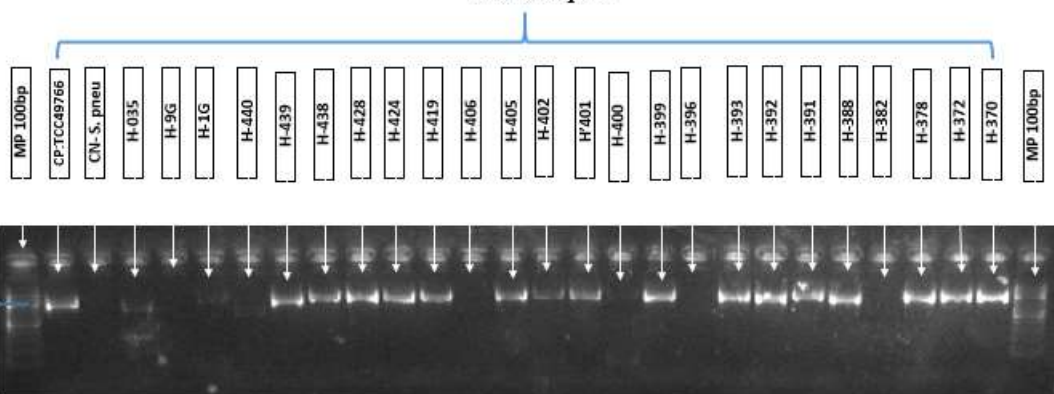
Valeur	Description	Symboles	Couleur
2.00 - 3.00	Identification avec une haute confiance	(+++)	vert
1.70 - 1.99	Identification avec une faible confiance	(+)	jaune
0.00 - 1.69	Aucune identification possible	(-)	rouge

## Annexe 15 : PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES DES DIFFÉRENTS GÈNES CIBLES AMPLIFIÉS PAR PCR

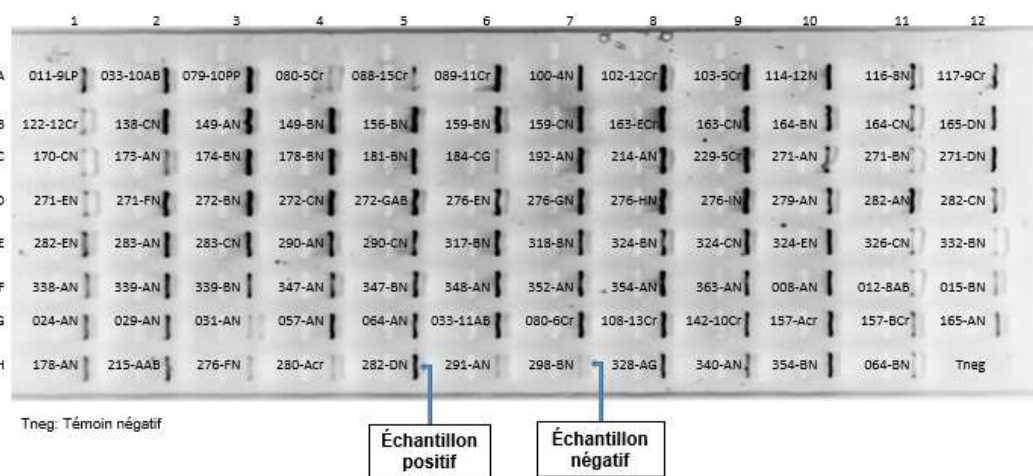
### 1- Amplification du gène *ompP2* codant pour la protéine P2 de la membrane externe: *Haemophilus influenzae*



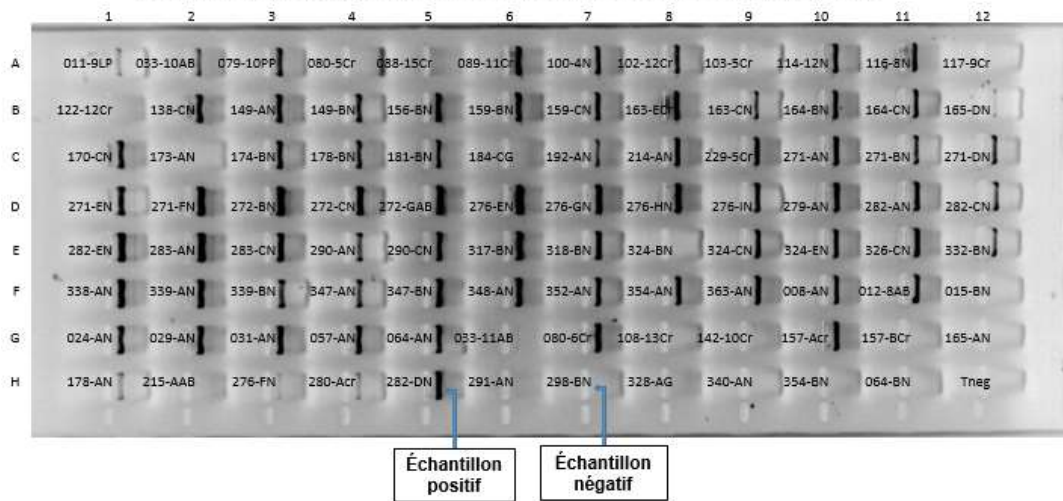
#### Gène *ompP2*



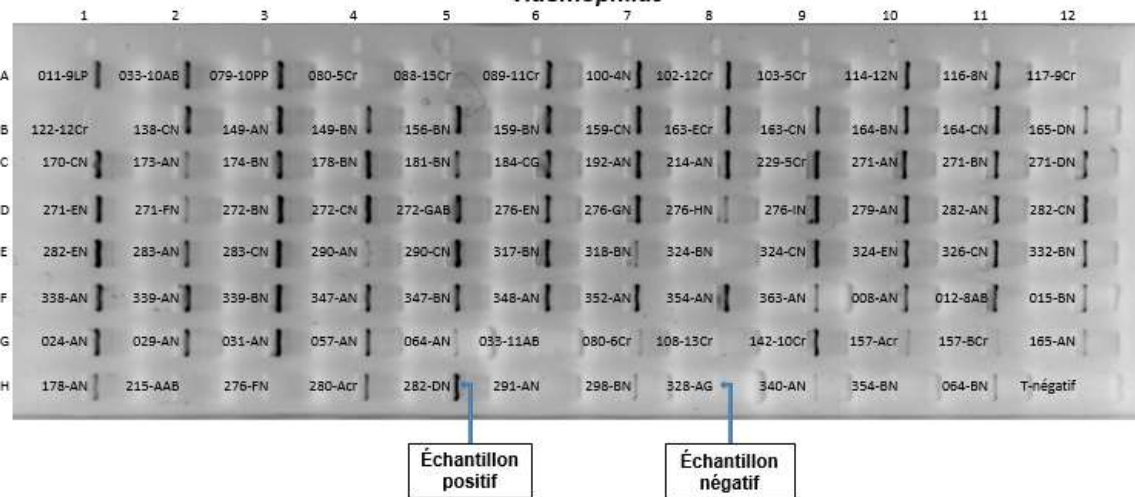
### 2- Amplification du gène *hpd* codant pour la protéine D de la membrane externe: *Haemophilus*



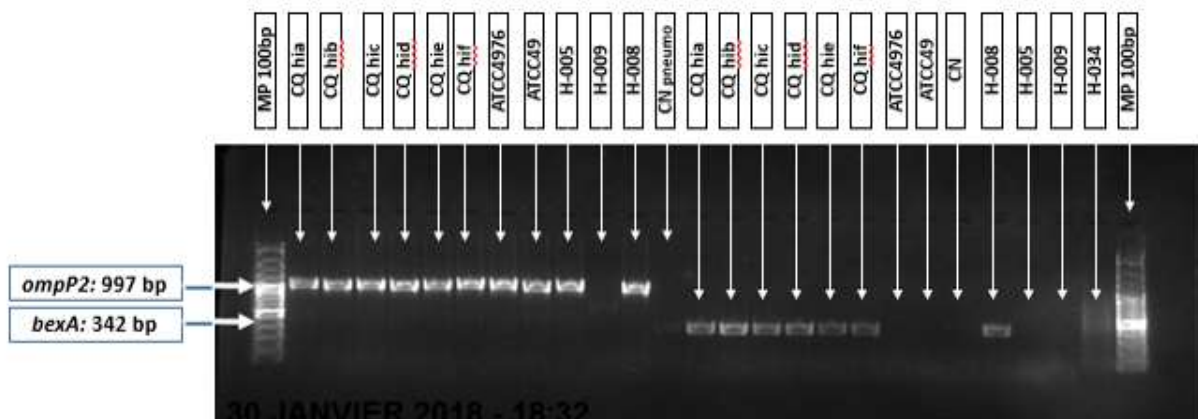
### 3- Amplification du gène *fuck* codant la fucolokinase : *Haemophilus*



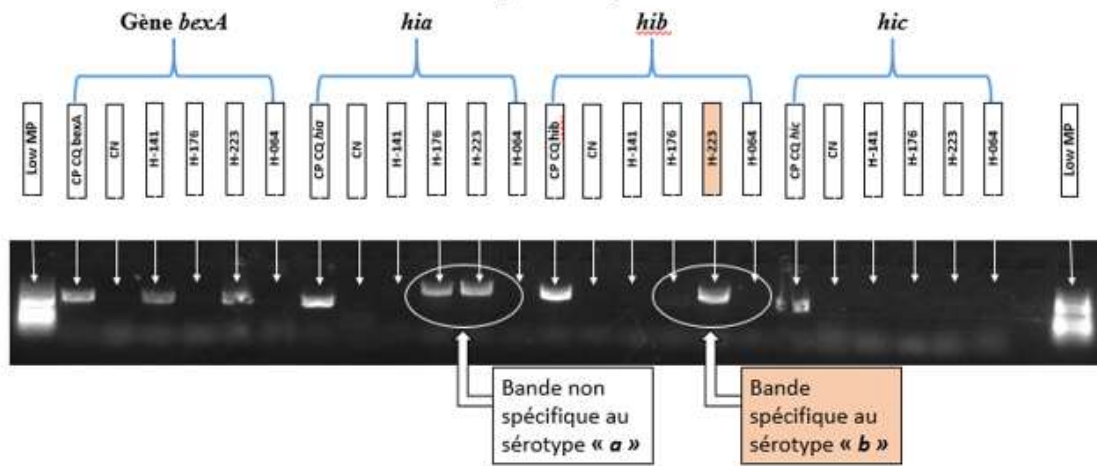
### 4- Amplification du gène *iga* codant pour l'Immunoglobuline (Ig)A protease: *Haemophilus*



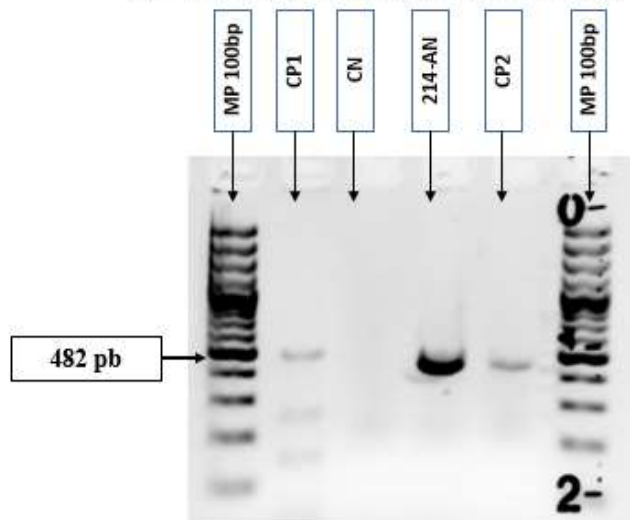
### 5- Amplification du gène de la région I (*bexA*) impliqué dans la biosynthèse des *Haemophilus influenzae* typables



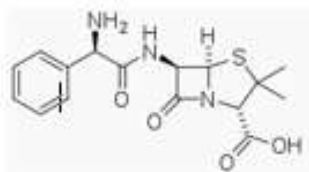
**6- Amplification du gène de la région II de biosynthèse du type capsulaire des *Haemophilus influenzae***



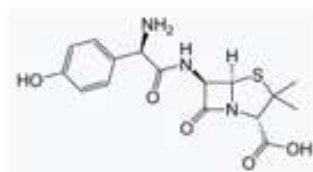
**7- Amplification du gène de la région II de biosynthèse du type capsulaire des *Haemophilus influenzae* sérotype b**



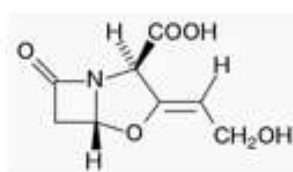
## Annexe 16 : STRUCTURE CHIMIQUE DES ANTIBIOTIQUES



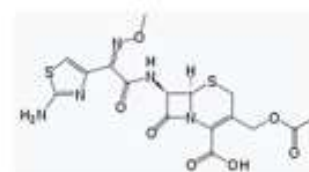
Ampicilline



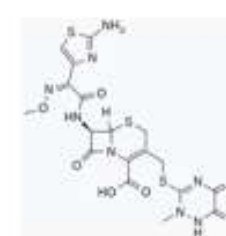
Amoxicilline



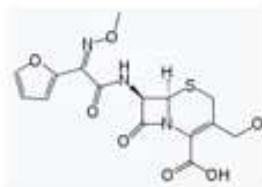
Acide clavulanique



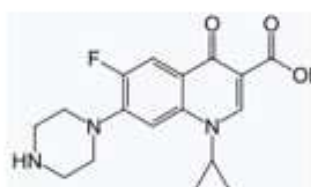
Céfotaxime



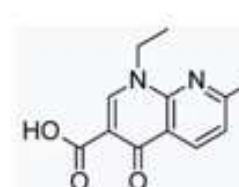
Ceftriaxone



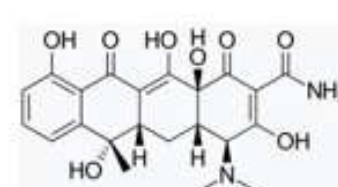
Céfuroxime



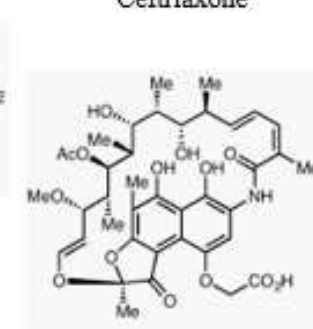
Ciprofloxacine



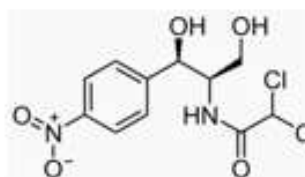
Acide nalidixique



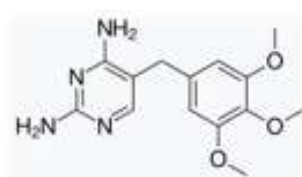
Tétracycline



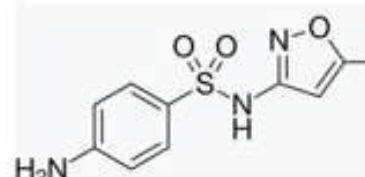
Rifampicine



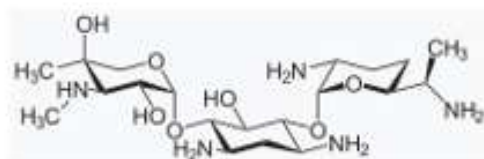
Chloramphénicol



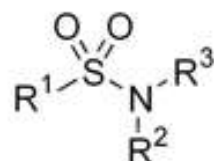
Triméthoprime



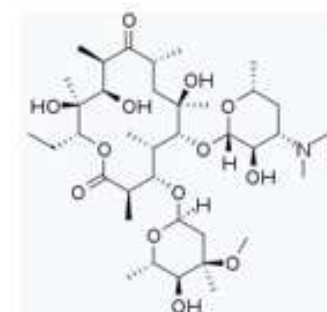
Sulfaméthoxazole



Gentamicine



Sulfonamide



Erythromycine

## Annexe 17 : IDENTIFICATION ET ANTIBIOGRAMME DES ESPECES *Haemophilus*

SOUCHE : \_\_\_\_\_ Numéro de paillasse : \_\_\_\_\_  
Date : \_\_\_\_\_

**Biotype :**  uréase  indole  ODC  **Gram**

**Génosérotypage :** *bexA* :  CT = (CT contrôle + = )

*bcs*  (Hib)      *fcs*  (Hif)      *ecs*  (Hie)      *acs*  (Hia)      *dcs*  (Hid)

**Sérotype (séroagglutination) :**

### ANTIBIOGRAMME :

bêta-lactamase

Antibiotiques	Charge du disque	Ø critiques (mm)		Résultats	
		S ≥ - R <	Ø (mm)	R	S
Penicilline G	1UI	≥ 12 mm			
		< 12 mm			
Amoxicilline	2µg	16			
Amoxicilline/Acide Clavulanique	2/1µg	15			
Céfotaxime	5 µg	R > 0,125			
Ceftriaxone		R > 0,125			
Gentamicine	15µg	16 -14			
Chloramphénicol	30µg	28			
Tétracycline	30UI	25-22			
Cotrimoxazole	1,25/23,75 µg	23-20			
Acide nalidixique	30µg	[R] < 23			
Ofloxacine		[R > 0,5]			
Lévofoxacine		[R > 1]			
Ciprofloxacine		[R > 0,5]			
Sulfonamides	300 µg	[R] < 25			
Triméthoprime	5 µg	[R] < 25			
Cotrimoxazole	25 µg	[R] < 20 et [S] ≥ 23			

Tableau des antibiotiques E-test à réaliser en fonction de l'activité β-lactamase

	β-lactamase positive	β-lactamase négative
E-test	Co-amoxiclav , Céfotaxime, Ceftriaxone	Amoxicilline, Céfotaxime

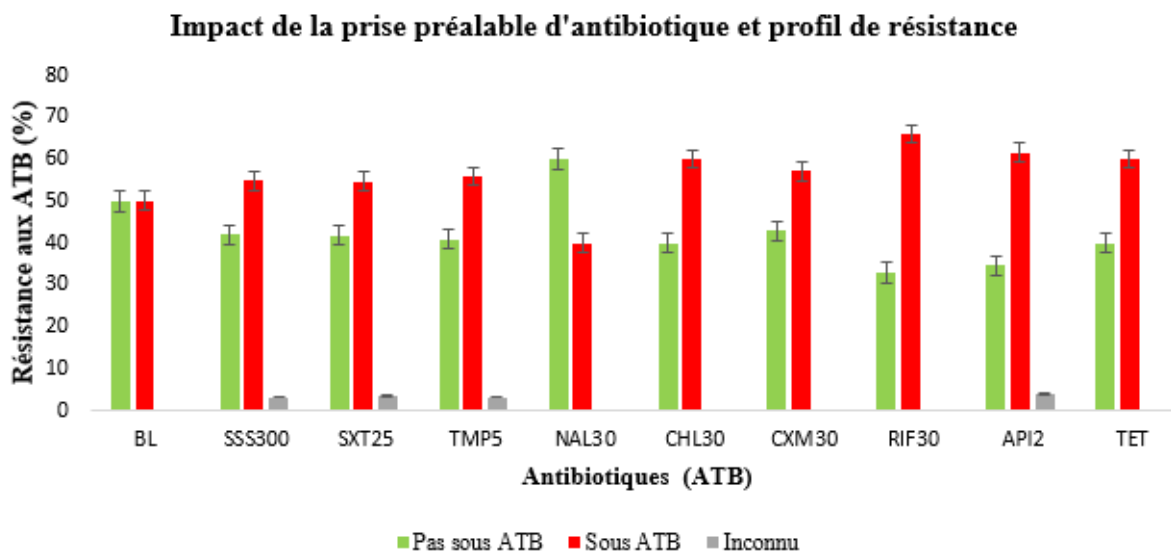
### Annexe 18 : INDICE DE DIVERSITÉ DE SIMPSON

ST;adk;atpG;frdB;fuck;mdh;pgi;recA	Fréquence absolue	Fréquence relative
10000;22;146;11;43;35;18;15	1	0,025
1043;50;12;32;50;147;193;125	1	0,025
107;33;8;16;16;49;2;3	1	0,025
1218;33;8;16;16;17;2;127	1	0,025
12;1;1;1;13;13;25;16	1	0,025
1482;14;107;52;1;22;1;5	1	0,025
1494;1;1;101;10;1;31;13	1	0,025
149;3;9;8;13;14;8;4	1	0,025
1523;14;7;15;14;9;235;1	1	0,025
159;33;8;16;16;17;2;29	1	0,025
165;44;2;16;37;17;2;3	1	0,025
1894;69;20;7;1;26;36;29	1	0,025
2142;1;2;7;41;17;14;10	1	0,025
2143;3;3;22;15;161;138;21	1	0,025
2144;4;15;106;87;26;186;41	1	0,025
2145;5;115;7;15;26;14;29	1	0,025
2147;6;42;43;9;15;52;35	1	0,025
2148;6;20;7;14;84;92;43	1	0,025
2149;42;57;131;18;22;70;4	1	0,025
2150;43;115;6;30;7;231;160	1	0,025
2151;60;20;7;7;51;49;31	1	0,025
2152;123;26;1;10;15;49;48	1	0,025
2153;146;115;6;4;108;231;160	1	0,025
2154;202;54;38;12;7;3;48	1	0,025
222;6;20;23;1;33;29;7	1	0,025
233;14;7;13;7;17;13;1	1	0,025
243;1;1;1;14;59;14;5	1	0,025
262;63;50;22;15;30;40;3	1	0,025
264;5;8;58;14;91;13;29	1	0,025
408;1;1;1;1;1;21;5	1	0,025
411;14;7;13;30;1;21;1	1	0,025
436;40;1;1;10;15;1;5	1	0,025
474;3;54;65;1;64;78;48	1	0,025
481;5;1;1;1;1;2;91	1	0,025
57;14;7;13;7;17;13;17	1	0,025
589;107;20;7;12;26;92;29	1	0,025
644;1;8;1;14;174;14;13	1	0,025
764;1;1;1;70;15;21;5	1	0,025
860;1;121;1;1;1;1;5	1	0,025
914;1;1;1;14;89;127;37	1	0,025
<b>Uniques: 40</b>	<b>Total: 40</b>	<b>Total: 1</b>

Intervalle de confiance à 95% : [1.0, 1.0], Indice de Simpson = 1.



## Annexe 19 : IMPACT DE LA PRISE PRÉALABLE D'ANTIBIOTIQUE ET PROFIL DE RÉSISTANCE



Antibiotiques (ATB), Bêta-lactamase (BL), Ampicilline (API2, 2 $\mu$ g), Chloramphenicol (CHL30, 30  $\mu$ g), Acide Nalidixique (NAL30, 30 $\mu$ g), Cefuroxime (CXM30, 30  $\mu$ g), Co-trimoxazole (SXT25, 25  $\mu$ g), Tetracycline (TET30, 30  $\mu$ g) et Rifampicine (RIF30, 30 $\mu$ g).

## LISTE DES PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE

1. **Tchatchouang S**, Bigna JJ, Nzouankeu A, Fonkoua MC, Nansseu JR, Ndangang MS, Kenmoe S, Penlap VB, Njouom R. Prevalence of respiratory bacterial infections in people with lower respiratory tract infections in Africa: the BARIAFRICA systematic review and meta-analysis protocol. *BMJ Open*. 2018 Sep 10;8(9):e023592. doi: 10.1136/bmjopen-2018-023592.
2. **Tchatchouang S**, Nzouankeu A, Donkeng V, Eyangoh S, Ngando L, Penlap V, Fonkoua MC, Pefura-Yone EW, Njouom R. Prevalence of Opportunistic Pathogens *Pneumocystis jiroveci* and Tubercle Bacilli in HIV-Infected Patients with Respiratory Infections in Yaounde, Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2019 May;35(5):428-429. doi: 10.1089/AID.2018.0216. Epub 2019 Feb 14.
3. **Tchatchouang S**, Nzouankeu A, Kenmoe S, Ngando L, Penlap V, Fonkoua MC, Pefura-Yone EW, Njouom R. Bacterial Aetiologies of Lower Respiratory Tract Infections among Adults in Yaoundé, Cameroon. *Biomed Res Int*. 2019 Apr 17;2019:4834396. doi: 10.1155/2019/4834396. eCollection 2019.
4. **Tchatchouang S**, Ariane Nzouankeu, Eva Hong, Aude Terrade, Mélanie Denizon, Ala-Eddine Deghmane, Suzie Moyo Tetang Ndiang, Eric-Walter Pefura-Yone, Véronique Penlap Beng, Richard Njouom, Marie-Christine Fonkoua and Muhamed-Kheir Taha. Analysis of *Haemophilus* species in patients with respiratory tract infections in Yaoundé, Cameroon. *International Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.08.040>.
5. **Tchatchouang S**, Bigna JJ, Kenmoe S, JR Nansseu, Ndangang MS, Nzouankeu A, Fonkoua MC, Penlap VB, Temfack E, Njouom R. Bacterial Aetiologies of lower Respiratory tract Infections in Africa: The BARIAFRICA meta-analysis. *BMC Infectious Diseases* (Under review).
6. **Tchatchouang S**, Ariane Nzouankeu, Suzie Moyo, Veronique Penlap, Marie-Christine Fonkoua, Richard Njouom. Bacterial profile in hospitalized children with acute respiratory tract infections in Yaoundé, Cameroon. (Under submission).

# BMJ Open Prevalence of respiratory bacterial infections in people with lower respiratory tract infections in Africa: the BARIAFRICA systematic review and meta-analysis protocol

Serges Tchatchouang,<sup>1,2,3</sup> Jean Joel Bigna,<sup>4</sup> Ariane Nzouankeu,<sup>1</sup> Marie-Christine Fonkoua,<sup>1</sup> Jobert Richie Nansseu,<sup>5</sup> Marie S Ndangang,<sup>6</sup> Sebastien Kenmoe,<sup>2</sup> Véronique B Penlap,<sup>3</sup> Richard Njouom<sup>2</sup>

**To cite:** Tchatchouang S, Bigna JJ, Nzouankeu A, *et al.* Prevalence of respiratory bacterial infections in people with lower respiratory tract infections in Africa: the BARIAFRICA systematic review and meta-analysis protocol. *BMJ Open* 2018;**8**:e023592. doi:10.1136/bmjopen-2018-023592

► Prepublication history and additional material for this paper are available online. To view these files, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2018-023592>).

Received 13 April 2018  
Revised 8 June 2018  
Accepted 26 July 2018



© Author(s) (or their employer(s)) 2018. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

For numbered affiliations see end of article.

**Correspondence to** Professor Richard Njouom; njouom@pasteur-yaounde.org

## ABSTRACT

**Introduction** The burden of lower respiratory tract infections (LRTIs) is a substantial public health concern. However, the epidemiology of LRTI and its bacterial aetiologies are poorly characterised, particularly in the African continent. Providing accurate data can help design cost-effective interventions to curb the burden of respiratory infections in Africa. Therefore, the aim of this systematic review and meta-analysis will be to determine the prevalence of respiratory Bacterial Aetiologies in people with low Respiratory tract Infections in Africa (BARIAFRICA) and associated factors.

**Methods and analysis** We will search PubMed, EMBASE, Web of Science, African Journals Online, Cumulative Index to Nursing and Allied Health Literature, and Global Index Medicus to identify studies that reported the prevalence (of enough data to compute this estimate) of respiratory bacterial infections in people with LRTIs in Africa from 1 January 2000 to 31 March 2018, without any linguistic restrictions. Study selection, data extraction and risk of bias assessment will be conducted independently by two investigators. Heterogeneity will be evaluated using the  $\chi^2$  test on Cochran's Q statistic and quantified with H and I<sup>2</sup> statistics. Prevalence will be pooled using a random-effect meta-analysis model. Subgroup and meta-regression analyses will be used to identify sources of heterogeneity of prevalence estimates. This study will be reported according to the guidelines of the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses.

**Ethics and dissemination** Since this study will be based on published data, it does not require ethical approval. This systematic review and meta-analysis is intended to serve as a basis for determining the burden of LRTIs, for identifying data gaps and for guiding future investigations in Africa. The final report will be published in peer-reviewed journals, presented in conferences and submitted to relevant health policy makers.

**PROSPERO registration number** CRD42018092359.

## Strengths and limitations of this study

- To the best of our knowledge, this work will be the first systematic review and meta-analysis reporting the prevalence of respiratory bacterial infection in people with lower respiratory tract infections in Africa.
- This study will inform and guide policy and practice in decision-making, and guide researchers in future investigations in the field of respiratory bacterial infections.
- Two review authors will independently assess the study selection, data extraction and risk of bias in included studies.
- The study will be limited by the broad spectrum of definition of cases of lower respiratory tract infection according to the authors of included articles.

## INTRODUCTION

Respiratory tract infections are common conditions among humans, with a high burden in terms of public health.<sup>1</sup> Depending on their location, diseases can be divided into upper and lower respiratory tract infections (LRTIs).<sup>2</sup> LRTIs including bronchitis, bronchiolitis and pneumonia<sup>3</sup> are heavy burden diseases, and also cause significant economic losses in low-income/middle-income countries and especially those in Sub-Saharan Africa.<sup>4 5</sup> In Sub-Saharan Africa, LRTIs rank third after HIV/AIDS and malaria in terms of causes of mortality. LRTIs are the leading cause of death in nine African countries.<sup>6</sup> A systematic analysis in 2015 found that LRTIs caused 2.74 million deaths and 103 million disability-adjusted life-years (DALYs) worldwide, making them the fifth leading cause of death overall and the second leading cause of DALYs.<sup>7</sup> Compared

to other regions, the burden of these infections is higher in Sub-Saharan Africa and Asia, where the highest mortality are among children under 5. For instance, 546.8 and 511.3 deaths per 100 000 were reported in Somalia and Chad, respectively. Meanwhile, the lowest reported mortality was in Finland in Western Europe, with 0.65 deaths per 100 000.<sup>7</sup> Several bacteria have been identified as the aetiology of LRTIs, including *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus), *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* species, *Streptococcus viridans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Proteus* species.<sup>7 8</sup> The epidemiology of LRTIs in Africa can be specific based on sociodemographical, environmental and ecological specificities. A systematic review performed between 2000 and 2015 showed the prevalence of respiratory pathogens in children under 5 living in Sub-Saharan African countries.<sup>9</sup> Apart from the fact that the systematic review focused only on children, it did not take into account data from entire Africa and did not perform any meta-analysis of the included studies. To the best of our knowledge, there is no previous review that assessed respiratory bacterial aetiologies in people with LRTIs in Africa. We present here a protocol for a systematic review and meta-analysis to summarise data on the prevalence of respiratory Bacterial Aetiologies in people with low Respiratory tract Infections in Africa (BARIAFRICA), with the aim to provide accurate data for designing cost-effective interventions to curb the burden of respiratory infections in Africa and to guide future research.

### Review questions

1. What is the prevalence and aetiologies of respiratory bacterial infections among people with LRTIs living in Africa?
2. What are the sources of heterogeneity of the prevalence of respiratory bacterial infections in people with LRTIs in Africa?

## METHODS AND ANALYSIS

### Design and registration

This systematic review and meta-analysis protocol will be conducted following the Centre for Reviews and Dissemination guidelines.<sup>10</sup> The present BARIAFRICA systematic review and meta-analysis protocol was reported according to the Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis Protocols.<sup>11</sup> The study protocol was registered with PROSPERO registration number CRD42018092359.

### Criteria to consider studies for this review

#### Inclusion criteria

1. Types of studies: We will consider cross-sectional studies, case-control studies, baseline data of cohort studies, surveillance data, as well as control group (without any intervention) of clinical trials.
2. Types of participants: We will consider studies conducted in people with clinically diagnosed LRTIs residing

in Africa regardless of age group and settings. LRTIs had to be diagnosed by a physician.

3. Types of outcomes: We will consider studies reporting the prevalence of respiratory bacterial infections regardless of laboratory diagnostic technique used (or enough data to compute this estimate). Prevalence will be calculated as the number of respiratory bacterial infection on the number of people with LRTI among which specific bacteria were searched.
4. Studies that have been published from 1 January 2000 until 31 March 2018.
5. Studies published regardless of language of publication.

#### Exclusion criteria

1. Studies conducted during or after outbreak period.
2. Case reports, letters, conference abstracts, comments, editorials and case series (<30 participants).
3. Studies with imported cases of respiratory bacterial infections.

### Search strategy for identifying relevant studies

The search strategy including the name of all African countries and their synonyms will be applied in electronic databases. The name of the country in the language relevant to that region will also be applied. Relevant articles will be searched by combining keywords in the field of lower respiratory infections and the names of African subregions. The following databases will be used: Medline through PubMed, EMBASE, Web of Science, Cumulative Index to Nursing and Allied Health Literature, African Journals Online, and Global Index Medicus. The search strategy used in PubMed is presented in online supplementary table 1. The search strategy will be adapted for other databases. The reference list of the eligible articles and relevant reviews will be manually searched to identify additional studies.

### Selection of studies for inclusion in the review

Using the Rayyan application,<sup>12</sup> two review authors will independently select records based on titles and abstracts. Any disagreement will be solved by discussion and consensus, or will involve a third review author as an arbitrator. Studies in language different from English or French will be translated using Google Translate and considered for eligibility. Two review authors will independently evaluate the full text of the selected records. Discrepancies will be resolved by consensus or by an arbitration of a third review author. The agreement between the two first review authors will be estimated by Cohen's kappa coefficient.<sup>13</sup>

### Risk of bias assessment

The evaluation of included studies for risk bias will be done using an adapted version of the risk of bias tool for prevalence studies developed by Hoy *et al.*<sup>14</sup> Based on this tool, studies will be rated as low risk, moderate risk and high risk with scores  $\leq 5$ , 6–8 and  $> 8$ , respectively. The defined questions will be scored with 0 for no and 1 for yes. The total score of each article will be calculated by the

sum of its points. Discrepancy in risk of bias assessment among the review authors will be solved by discussion and consensus, or by arbitration of a third review author.

### Data extraction and management

Study characteristics such as name of the first author, year of publication, study population, number of bacteria searched, age range, study design, setting, diagnostic criteria and outcomes measured, location, country in which the study was conducted, criteria for sample selection and sample size, city, latitude, longitude, altitude, clinical presentation, number of clinical isolates, comorbid conditions/underlying conditions, number of patients tested, number of patients infected with bacteria, diagnostic technique used, and male proportion will be recorded. Prevalence by country will be calculated for multinational studies. Where cases and samples for estimating prevalence will not be available, we will contact the corresponding author of the study to request the missing information. The countries will be grouped into regions according to the United Nations Statistics Division (UNSD). Lower respiratory infections will be classified as bronchitis, bronchiolitis and pneumonia. Data extraction will be done independently by two review authors. Disagreements between the two review authors will be solved by discussion, or if necessary will involve a third review author for arbitration.

### Data synthesis

Data will be analysed using the 'meta' and 'metafor' packages of the R statistical software (V.3.4.4, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Unadjusted prevalence will be recalculated based on the information on crude numerators and denominators provided by individual studies. Prevalence will be reported with their 95% confidence and prediction intervals. To keep the effect of studies with extremely small or extremely large prevalence estimates on the overall estimate to a minimum, the variance of the study-specific prevalence will be stabilised with the Freeman-Tukey double arcsine transformation before pooling the data with the random-effects meta-analysis model.<sup>15</sup> Only studies conducted in populations with close clinical presentation/underlying conditions and with same laboratory diagnostic technique will be pooled together. If it is not possible to conduct meta-analysis, data will be synthesised using a narrative approach. Egger's test will be used to detect the presence of publication bias.<sup>16</sup> A p value <0.10 on Egger's test will be considered indicative of statistically significant publication bias. Heterogeneity will be evaluated by the  $\chi^2$  test on Cochran's Q statistic,<sup>17</sup> which will be quantified by H and I<sup>2</sup> values. The I<sup>2</sup> statistic estimates the percentage of total variation across studies due to true between-study differences rather than chance. In general, I<sup>2</sup> values greater than 60%–70% indicate the presence of substantial heterogeneity.<sup>18</sup>

In the case of substantial heterogeneity, subgroup and meta-regression analyses will be used to investigate

sources of heterogeneity. Subgroup analyses will be performed for the following subgroups: children versus adults, UNSD African regions, level of country income, clinical presentation, setting (primary care, intensive care and emergency units, inpatients, outpatients) and study period of inclusion. Univariable and multivariable meta-regression analyses will be used to test for an effect of study and participants' characteristics (year of publication, seasonality, setting, clinical presentation, comorbid conditions, number of screened bacteria, age groups, population, UNSD regions, absolute latitude (distance to equator), latitude, longitude and altitude). To be included in multivariable meta-regression analysis, a p value <0.25 in univariable analysis will be required. For categorical variables, the global p value will be considered for inclusion in multivariable models. We will apply a manual forward selection procedure to identify factors independently associated with the variation of the overall prevalence. We will successively add in the model the more significantly associated variables. The final model that will be considered is the one with the lowest Bayesian Information Criterion. A p value <0.05 will be considered statistically significant. Following crude overall prevalence, we will conduct two sensitivity analyses to assess the robustness of our findings. The first one will include only studies with low risk of bias and the second only studies reporting data of a full year(s) period (complete season(s)).

### Potential amendments

We do not plan to make any changes to this protocol. However, if substantial changes occur during the review, they will be reported in the published results.

### Patient and public involvement

Patients and the public were not involved in the conception and design of this protocol.

### ETHICS AND DISSEMINATION

This work relies on published data and therefore does not require an ethical approval. The findings will be published in a scientific peer-reviewed journal. They will be also submitted to conferences and to relevant public health actors.

### CONCLUSIONS

Taking into account the burden of LRTIs in Africans, the findings from this systematic review and meta-analysis will be useful for health stakeholders and will provide information that can lead to efficient strategies for controlling the burden of LRTIs in Africa. As all settings in Africa are not able to diagnose bacterial aetiologies in people with LRTI, knowledge of major respiratory bacterial infections can help in this case to orientate the first-line treatment. Different definitions of LRTIs and inclusion



criteria would lead to substantial heterogeneity during meta-analysis.

#### Author affiliations

<sup>1</sup>Department of Bacteriology, Centre Pasteur of Cameroon, International Network of Pasteur Institutes, Yaoundé, Cameroon

<sup>2</sup>Department of Virology, Centre Pasteur of Cameroon, International Network of Pasteur Institutes, Yaoundé, Cameroon

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

<sup>4</sup>Department of Epidemiology and Public Health, Centre Pasteur of Cameroon, International Network of Pasteur Institutes, Yaoundé, Cameroon

<sup>5</sup>Department of Public Health, Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

<sup>6</sup>Department of Medical Information and Informatics, Rouen University Hospital, Rouen, France

**Contributors** ST, JJB, SK and RN conceived the protocol, and AN, MSN, VBP and M-CF designed the protocol. ST, JJB and SK drafted the manuscript. ST, JJB, SK, MSN, AN, VBP, M-CF and RN revised the successive drafts of the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

**Funding** The authors have not declared a specific grant for this research from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

**Competing interests** None declared.

**Patient consent** Not required.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

**Open access** This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

#### REFERENCES

- Khan S, Priti S, Ankit S. Bacteria etiological agents causing lower respiratory tract infections and their resistance patterns. *Iran Biomed J* 2015;19:240–6.
- Neumark T. *Treatment of respiratory tract infections in primary care with special emphasis on Acute Otitis Media (Medical Dissertations)*: Linköping University, 2010.
- Kocsis B, Szabo D. New treatment options for lower respiratory tract infections. *Expert Opin Pharmacother* 2017;18:1345–55.
- WHO. *Estimating the burden of respiratory diseases. Practical Approach to Lung Health: manual on initiating PAL Implementation*. Geneva: WHO, 2008:138.
- Bates M, Mudenda V, Mwaba P, et al. Deaths due to respiratory tract infections in Africa: a review of autopsy studies. *Curr Opin Pulm Med* 2013;19:229–37.
- GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015;385:117–71.
- GBD 2015 LRI Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect Dis* 2017;17:1133–61.
- Uzoamaka M, Ngozi O, Johnbull OS, et al. Bacterial etiology of lower respiratory tract infections and their antimicrobial susceptibility. *Am J Med Sci* 2017;354:471–5.
- Sanou AM, Cissé A, Millogo T, et al. Systematic review of articles on etiologies of acute respiratory infections in children aged less than five years in Sub-Saharan Africa, 2000–2015. *EC Microbiology* 2016;6:556–71.
- Centers for reviews and dissemination. CRD's guidance for undertaking reviews in healthcare. 2009.
- Moher D, Shamseer L, Clarke M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Syst Rev* 2015;4:1.
- Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, et al. Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev* 2016;5:210.
- Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med* 2005;37:360–3.
- Hoy D, Brooks P, Woolf A, et al. Assessing risk of bias in prevalence studies: modification of an existing tool and evidence of interrater agreement. *J Clin Epidemiol* 2012;65:934–9.
- Barendregt JJ, Doi SA, Lee YY, et al. Meta-analysis of prevalence. *J Epidemiol Community Health* 2013;67:974–8.
- Egger M, Davey Smith G, Schneider M, et al. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 1997;315:629–34.
- Cochran WG. The combination of estimates from different experiments. *Biometrics* 1954;10:101–29.
- Higgins JP, Thompson SG. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat Med* 2002;21:1539–58.

## Letter to the Editor

**Prevalence of opportunistic pathogens *Pneumocystis jiroveci* and tubercle bacilli in HIV-infected patients with respiratory infections in Yaounde, Cameroon**

Serges Tchatchouang<sup>1,2,3</sup>, Ariane Nzouankeu<sup>2</sup>, Valerie Donkeng<sup>4</sup>, Sara Eyangoh<sup>4</sup>, Laure Ngando<sup>2</sup>, Veronique Penlap<sup>3</sup>, Marie-Christine Fonkoua<sup>2</sup>, Eric-Walter Pefura-Yone<sup>5</sup> and Richard Njouom<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Virology, Centre Pasteur of Cameroon, Member of the International Network of Pasteur Institutes, P.O. Box 1274, Yaounde, Cameroon

<sup>2</sup>Department of Bacteriology and Mycology, Centre Pasteur of Cameroon, Member of the International Network of Pasteur Institutes, P.O. Box 1274, Yaounde, Cameroon

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaounde 1, Yaounde, Cameroon

<sup>4</sup>Department of Mycobacteriology, Centre Pasteur of Cameroon, Member of the International Network of Pasteur Institutes, P.O. Box 1274, Yaounde, Cameroon

<sup>5</sup>Department of pneumology, Jamot Hospital, Yaounde, Cameroon

\* Corresponding author: Department of Virology, Centre Pasteur of Cameroon, Member of the International Network of Pasteur Institutes, 451 Street 2005, P.O. Box 1274, Yaounde II, Yaounde, Cameroon. Telephone: (+237) 222 23 18 03 - Fax 222 23 15 64. E-mail: njouom@pasteur-yaounde.org

**Running title:** opportunistic respiratory infections and HIV

**Keywords:** Opportunistic infection, TB, PCP, HIV/AIDS, respiratory infection

Sir,

Respiratory infections remain a major cause of morbidity among people living with HIV <sup>1</sup>. Tuberculosis (TB) and pneumocystosis are opportunistic diseases associated with HIV/AIDS infection, yet other common HIV opportunistic infections may be caused by **bacteria, fungi, parasites and viruses** <sup>2</sup>. In Cameroon, 34% of HIV-infected patients also have TB, placing this country among the 30 countries with the highest burden for TB/HIV co-infection <sup>3</sup>. However, limited data are available on clinical evidence of respiratory tract infections (RTIs) with pneumocystosis and bacteria.

HIV-positive and -negative patients with RTIs were screened for bacteria, *Pneumocystis jirovecii* (PCP) and tubercle bacilli infections from January 2017 to January 2018 at the Jamot Hospital in Yaounde (Table 1). For this purpose, clinical samples including nasopharyngeal swabs, bronchoalveolar lavages, pleural fluids and sputa, were subjected to bacterial culture and multiplex RT-PCR analyses targeting 10 bacteria and PCP. Specimens from suspected TB patients were subjected to microscopy, culture and/or GeneXpert analysis.

A total of 211 participants with RTIs including 80 HIV-infected patients (37.9%) were enrolled. The median age of the study population was 42.8 years with a male to female sex ratio of 1.43. The median duration of clinical signs before diagnosis was 30 days and the common clinical symptoms were cough (94.8%), dyspnea (89.1%), breathlessness (85.8%), asthenia (84.4%), fever (60.2%) and chest pain (58.8%). Only diarrhea (23.8%), vomiting (22.5%) and conjunctivitis (5%) were significantly associated to HIV-positive patients ( $p < 0.05$ ). Most of the study participants were on antibiotic therapy (83.4%) prior to laboratory diagnosis. Bacterial detection rate by culture was approximately 20% in both HIV-positive and -negative patients. *Haemophilus influenzae* (4.7%) and *Streptococcus pneumoniae* (3.8%) were the most represented bacteria detected.

The overall detection rate of TB bacilli was 17.1% and was higher in HIV-positive subjects (25%) compared to HIV-negative subjects (12.2%) ( $p = 0.023$ ). Regarding PCP, 48.8% (39/80) of HIV-positive patients were treated by prophylaxis and PCP was detected in only 8.8% of HIV-positive patients. A 10% TB/PCP co-infection rate was found.



Our results have several implications: data on bacterial detection rate in both HIV-positive and -negative patients are not opportunistic in our context.

TB remains one of the most widely distributed infectious disease among HIV-positive patients. For over a decade, data reporting on the frequency of PCP among HIV-infected patients from Cameroon has been scarce<sup>4</sup>. Low PCP detection rate could be due to the widespread use of prophylaxis against opportunistic infections together with highly active antiretroviral therapy that has reduced the risk of life-threatening infection, hence confirming the benefits of PCP prophylaxis.

The presence of TB/PCP co-infection indicates that HIV-infected patients with TB are at increased risk of PCP infections. Therefore, laboratory testing of PCP could improve the diagnosis and management of RTIs in HIV-infected patients.

Though TB remains the main opportunistic infection among HIV-positive patients with RTIs, PCP infections should be investigated for a better follow-up of these patients.

## References

1. Davis JL, Fei M, Huang L. Respiratory infection complicating HIV infection. *Curr Opin Infect Dis.* Apr 2008;21(2):184-190.
2. Graham SM, Gibb DM. HIV disease and respiratory infection in children. *Br Med Bull.* 2002;61:133-150.
3. WHO. *Global tuberculosis report.* Geneva: World Health Organization 2017.
4. Nkoo Amvene S, Mbozo'O Mvondo G, Afane Ze E, Biwole Sida M. [Pulmonary lesions in Cameroonian HIV-positive subjects: etiologies and radiological aspects]. *Journal de Radiologie.* 2004/09/01/ 2004;85(9):1447.

**Table 1. Microbial detection among HIV positive and negative patients with RTIs following age groups**

Age group (years)	TB cases		PCP		Bacteria	
	HIV+ (%)	HIV- (%)	HIV+ (%)	HIV- (%)	HIV+ (%)	HIV- (%)
<20 (n= 13)	0	6 (4.6)	0	0	0	3 (2.3)
20-30 (n= 27)	4 (5)	1 (0.8)	1 (1.3)	0	3 (3.8)	2 (1.5)
30-40 (n= 53)	6 (7.5)	3 (2.3)	3 (3.8)	0	6 (7.5)	5 (3.8)
40-50 (n= 34)	3 (3.8)	3 (2.3)	2 (2.5)	0	2 (2.5)	3 (2.3)
50-60 (n= 41)	5 (6.3)	0	1 (1.3)	0	4 (5)	5 (3.8)
>60 (n= 43)	2 (2.5)	3 (2.3)	0	0	1 (1.3)	8 (6.1)
<b>Total</b>	<b>20 (25)</b>	<b>16(12.2)</b>	<b>7 (8.8)</b>	<b>0</b>	<b>16 (20)</b>	<b>26 (19.8)</b>

Abbreviation: TB, tuberculosis; PCP: *Pneumocystis jirovecii*; RTIs, respiratory tract infections; (+), positive; (-), negative; %, percentage

## Research Article

# Bacterial Aetiologies of Lower Respiratory Tract Infections among Adults in Yaoundé, Cameroon

Serges Tchatchouang,<sup>1,2,3</sup> Ariane Nzouankeu,<sup>2</sup>  
Sebastien Kenmoe,<sup>1</sup> Laure Ngando,<sup>2</sup>  
Veronique Penlap,<sup>3</sup> Marie-Christine Fonkoua,<sup>2</sup>  
Eric-Walter Pefura-Yone,<sup>4</sup> and Richard Njouom<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Virology, Centre Pasteur of Cameroon, Member of the International Network of Pasteur Institutes, P.O. Box 1274, Yaoundé, Cameroon

<sup>2</sup>Department of Bacteriology, Centre Pasteur of Cameroon, Member of the International Network of Pasteur Institutes, P.O. Box 1274, Yaoundé, Cameroon

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon

<sup>4</sup>Department of Pneumology, Janot Hospital, P.O. Box 4021, Yaoundé, Cameroon

Correspondence should be addressed to Richard Njouom; [njouom@pasteur-yaounde.org](mailto:njouom@pasteur-yaounde.org)

Received 23 January 2019; Revised 28 March 2019; Accepted 11 April 2019; Published 17 April 2019

Academic Editor: Roberto Cangemi

Copyright © 2019 Serges Tchatchouang et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Lower respiratory tract infections (LRTIs) remain a challenge in African healthcare settings and only few data are available on their aetiology in Cameroon. The purpose of this study was to access the bacterial cause of LRTIs in patients in Cameroon by two methods. *Methods.* Participants with LRTIs were enrolled in the referral centre for respiratory diseases in Yaoundé city and its surroundings. To detect bacteria, specimens were tested by conventional bacterial culture and a commercial reverse-transcriptase real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. One hundred forty-one adult patients with LRTIs were enrolled in the study. Among the participants, 46.8% were positive for at least one bacterium. *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* were the most detected bacteria with 14.2% (20/141) followed by *Klebsiella pneumoniae*, 9.2% (13/141), *Staphylococcus aureus*, 7.1% (10/141), and *Moraxella catarrhalis*, 4.3% (6/141). Bacterial coinfection accounted for 23% (14/61) with *Haemophilus influenzae* being implicated in 19.7% (12/61). The diagnostic performance of RT-PCR for bacteria detection (43.3%) was significantly different from that of culture (17.7%) ( $p < 0.001$ ). Only *Streptococcus pneumoniae* detection was associated with empyema by RT-PCR ( $p < 0.001$ ). These findings enhance understanding of bacterial aetiologies in order to improve respiratory infection management and treatment. It also highlights the need to implement molecular tools as part of the diagnosis of LRTIs.

## 1. Introduction

Lower respiratory tract infections (LRTIs) are major cause of morbidity and mortality globally [1]. In Africa, they are one of the most prevalent causes of death [2]. Particularly in sub-Saharan Africa, high case fatality ratios were reported in Somalia and Chad with 546.8 and 511.3 deaths per 100 000 inhabitants, respectively, when compared to the lowest mortality (0.65 deaths per 100 000 inhabitants) registered in Finland (Europe) [2]. LRTI is a broad terminology

encompassing different clinical presentations and aetiologies, which may vary according to, for example, age and season among others [3]. Overall, viruses are responsible for a large proportion of LRTIs but antibiotics are often unnecessarily prescribed for their treatment without any laboratory testing [4, 5] and can contribute to the emergence of antimicrobial resistance [6]. Other causes of LRTIs are bacteria: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus* being the most common [2, 7, 8].

However, studies on bacterial aetiologies of LRTIs in Cameroon are limited. In addition, the few studies performed in the 90's used traditional culture methods [9, 10]. Although culture is still considered to be the gold standard, the method has important disadvantages, such as a longer time to result, the stringent specimen collection and transport condition and the risk of inhibited growth of the pathogens due to previous antibiotic treatment [11, 12]. As a consequence, many patients in African healthcare centres remain undiagnosed despite clinical evidence of LRTIs.

The development of nucleic acid amplification tests (NAATs) has revolutionized clinical bacteriology [13]. They are promising alternative diagnostic methods. Compared to culture, they are able to provide results within a few hours, are sensitive, and do not require viable organisms [14, 15]. Using NAATs, the viral aetiology of respiratory infections in Cameroon has been largely documented [16, 17]; meanwhile bacterial aetiology on the other hand remains unexplored. Knowing the aetiology of LRTIs can help avoid unnecessary antibiotherapy in healthcare settings.

Our overall aim was to identify the respiratory bacteria of patients presenting with symptoms and clinical signs of LRTI at a referral centre for respiratory diseases in Yaoundé, Cameroon. Here we report on the bacteria that were detected using a commercial real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in addition to traditional culture methods.

## 2. Methodology

**2.1. Study Design.** We conducted a prospective study among patients presenting with symptoms and clinical signs of LRTI at the pneumology department of the Jamot Hospital in Yaoundé from mid-January 2017 to mid-January 2018. This hospital is the management centre for respiratory diseases of Yaoundé city and its surroundings. LRTIs were cases of bronchitis, bronchiolitis, and pneumonia diagnosed by the physician. Adult patients who presented at least two of the following symptoms were included in the study after written informed consent was obtained: fever, cough, dyspnoea, wheezing, chest pain, or sore throat. Any prior antimicrobial treatment taken by the patient was also recorded before microbiological investigations. Patients diagnosed with pulmonary tuberculosis or with infections other than LRTIs were excluded. Sociodemographic data and clinical signs were recorded before enrolment. Empiric antibiotic therapy was not administered to patients before laboratory investigation. To guide antibiotic selection in the follow-up of participants, drug susceptibility testing was done and provided to the physicians but is not presented here.

**2.2. Ethics and Consent to Participate.** The study was reviewed and approved by the participating hospital and the National Research Ethics Committee of Cameroon (N°2017/03/876/CE/CNERSH/SP). All participants and/or the parents/legal guardians of minors provided written informed consent before enrolment. In addition, assent was sought for participants below the age of 21 year, legal age of majority in Cameroon.

**2.3. Sample Collection.** Clinical samples consisted of bronchoalveolar lavages (BALs) and fluids drained from pleural effusion (FPEF) or pleural empyema (FPEm) depending on the clinical and radiological presentation of the patients. Empyema was considered as collection of pus in the pleural space with secondary inflammation of the visceral and parietal pleura [18]. The samples were transported at ambient temperature and within 1 hour after collection to Centre Pasteur of Cameroon (CPC) for diagnostic testing (microscopy, bacterial culture, and anatomopathology analysis for FPEf). Upon receipt at the CPC, the samples were divided into two aliquots. One aliquot was immediately used for bacterial culture; the other was stored in medium (universal transport medium) and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until molecular amplification.

**2.4. Bacterial Culture.** According to the French REMIC guidelines, a loopful ( $10\ \mu\text{L}$ ) of the sample (BAL and pleural fluids) was plated onto chocolate, 5% sheep blood agar (BA) media, and Cysteine-Lactose-Electrolyte-Deficient (CLED) plates. After inoculation, the agar plates were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$ , with the chocolate and BA agar plates in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere and the CLED agar in normal atmosphere, for 18 to 24 hours. For isolation of anaerobic bacteria, FPEm was inoculated onto 5% sheep blood agar plates and was incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 18 to 72 hours using GENbag anaer (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) to generate anaerobic growth conditions.

For pleural fluids, all growth bacteria were considered as positive irrespective of number of colonies. For BAL, protected bronchoalveolar lavage was done to avoid contamination by the oropharyngeal commensal flora. BAL fluids were serially diluted (dilutions of 1:10, 1:100, and 1:1000) and bacterial growth was defined as significant when present as  $\geq 10^4$  colony forming units (cfu) per mL.

Isolated colonies were identified using Gram staining, common biochemical tests [19], and the Vitek Compact 2 system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

**2.5. RNA Extraction.** RNA was extracted from all samples using the QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. A final elution volume of  $60\ \mu\text{L}$  of RNA was stored in 1.5 mL Eppendorf tubes at  $-20^{\circ}\text{C}$  until amplification.

**2.6. Molecular Amplification.** The RNAs were tested using the commercial RT-PCR assay Fast-track Diagnostics Respiratory pathogens (Fast-track Diagnostics, Junglinster, Luxembourg). This kit enabled targeting 10 bacteria: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* type b, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila/longbeachae*, *Salmonella* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella* spp. (except *Bordetella parapertussis*), and *Haemophilus influenzae*. The manufacturer's instructions were followed, briefly: a volume of  $10\ \mu\text{L}$  of RNA was added to  $15\ \mu\text{L}$  of fast tract master mix (buffer, primers, probes, and enzyme). Amplification was performed in an ABI PRISM 7500 RT-PCR machine (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). An internal control was added to all samples to

TABLE 1: Sociodemographic and clinical characteristics of the study population.

Study population	Total (n=141)	Positive bacterial culture (n=25)
<b>Age</b>		
Median age in years (IQR)	50 (34.7- 62.1)	48 (32.9-62.8)
18-35 years (young adults)	37 (26.2)	8 (32)
36-55 years (middle-aged adults)	56 (39.7)	9 (36)
>55 years (old adults)	48 (34)	8 (32)
<b>Gender</b>		
Males	90 (63.8)	16 (64)
Females	51 (36.2)	9 (36)
Smoking habit	30 (21.3)	2 (8)
Duration of symptoms (days)	45 (21-90)	45 (37.5-67.7)
<b>Clinical signs</b>		
Cough	123 (87.2)	22 (88)
Dyspnoea	121 (85.8)	22 (88)
Breathlessness	117 (83)	20 (80)
Asthenia	107 (75.9)	19 (76)
Fever	90 (63.8)	16 (64)
Chest pain	85 (60.3)	13 (52)
Myalgia	60 (42.6)	5 (20)
Arthralgia	31 (22)	5 (20)
Headaches	24 (17)	1 (4)
Sore throat	14 (9.9)	2 (8)
Vomiting	11 (7.8)	2 (8)
Diarrhea	10 (7.1)	0
Rhinorrhea	7 (5)	1 (4)
Conjunctivitis	2 (1.4)	0

Data are number and percentage in brackets; IQR: interquartile range; n: number.

ensure validity of the assay. Positive and negative controls were included in each experiment.

**2.7. Statistical Analysis.** Data were analysed using the Statistical Package for Social Sciences software (version 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Distribution of categorical variables was compared using the chi-square or Fisher's exact tests as appropriate. Independent *t*-test was done for mean comparison between groups. Results of bacterial detection by culture and RT-PCR were compared using the McNemar test. The significance level was set at 0.05.

### 3. Results

**3.1. Study Population.** Overall, a total of 141 patients were enrolled; the male/female sex ratio was 1.8. The patients' age ranged from 18 to 94 years with a median age of 50 years (interquartile range: 34.7-62.1). No mean age difference was noticed among males and females ( $p=0.786$ ). The sociodemographic and clinical characteristics of the patients are summarised in Table 1. The most predominant symptoms were cough (87.2%), dyspnoea (85.8%), breathlessness (83%), asthenia (75.9%), fever (63.8%), chest pain (60.3%), and myalgia (42.6%). Among the type of specimens collected, FPEf accounted for 47.1% (67/141), BAL for 28.4% (40/141), and FPEm for 24.1% (34/141). The majority of patients

(76.6%) had already taken antimicrobials (beta-lactams, sulfonamides, aminoglycoside, macrolides, and quinolones) before the enrolment.

**3.2. Bacterial Detection.** Bacteria were detected in 17.7% (25/141) and 43.3% (61/141) of the samples using traditional culture and RT-PCR, respectively ( $p<0.001$ ). Combining both techniques, an aetiological bacterial agent was detected in 46.8% (66/141) of the samples. Both methods detected more frequently *S. pneumoniae* (14.2% by RT-PCR versus 5.7% by culture), *H. influenzae* (14.2% by RT-PCR versus 3.5% by culture), and *K. pneumoniae* (9.2% by RT-PCR versus 3.5% by culture).

As the BALs were sampled aseptically, we obtained 14 bacterial growths out of the 40 plated. One culture exhibited two bacterial species out of 14. The BAL cultures for which the less bacterial growth was noted had  $10^4$  cfu/mL. For pleural fluids, the bacterial growth ranged from 7 to more than  $10^6$  cfu/mL.

There was no association between clinical symptoms of inclusion and bacterial detection methods ( $p>0.05$ ). There was an association between myalgia and bacterial culture ( $p=0.014$ ). There was no difference for bacterial detection among patients under antibiotics prior to the diagnosis and those who were not ( $p=0.757$ ). Results according to sample type and method are presented in Table 2. *S. pneumoniae* was

TABLE 2: Bacteria detected in fluids from lower respiratory tract by culture and RT-PCR.

Bacteria	FPEf (n=67)		BAL (n=40)		FPEm (n=34)	
	Culture (%)	RT-PCR (%)	Culture (%)	RT-PCR (%)	Culture (%)	RT-PCR (%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 (1.5)	3 (7.1)	2 (5)	4 (10)	5 (14.7)	13 (38.2)
<i>Haemophilus influenzae</i>	0	7 (11.4)	4 (10)	9 (22.5)	1 (2.9)	4 (11.7)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (1.5)	4 (5.7)	4 (10)	4 (10)	0	5 (14.7)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0	0	0	4 (10)	0	2 (5.9)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	3 (4.3)	0	3 (7.5)	1 (2.9)	4 (11.7)
<i>Streptococcus anginosus</i>	0	/	0	/	1 (2.9)	/
<i>Streptococcus constellatus</i>	0	/	0	/	1 (2.9)	/
<i>Enterobacter agglomerans</i>	0	/	1 (2.5)	/	0	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	/	2 (5)	/	0	/
<i>Citrobacter koseri</i>	0	/	1 (2.5)	/	0	/
<i>Legionella species</i>	/	0	/	3 (7.5)	/	3 (8.9)
<b>Total</b>	<b>2 (3)</b>	<b>17 (25.4)</b>	<b>14 (35)</b>	<b>27 (67.5)</b>	<b>9 (26.5)</b>	<b>31 (91.1)</b>

BAL: bronchoalveolar lavage; RT-PCR: reverse-transcriptase real-time polymerase chain reaction; FPEf: fluid drained from pleural effusion; FPEm: fluid drained from pleural empyema.

TABLE 3: Level of coinfections in lower respiratory tract by RT-PCR.

Infection level	Pathogens	Number	Clinical samples
Double bacterial infection	<i>Haemophilus influenzae</i> + <i>Legionella</i> species	1	FPEm
	<i>Haemophilus influenzae</i> + <i>Streptococcus pneumoniae</i>	3	2 BAL + 1 FPEm
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> + <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	FPEm
	<i>Haemophilus influenzae</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>	3	FPEf, 2 BAL
	<i>Haemophilus influenzae</i> + <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	BAL+ FPEf
Triple bacterial infection	<i>Haemophilus influenzae</i> + <i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	FPEm
	<i>Haemophilus influenzae</i> + <i>Legionella</i> species + <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	BAL
	<i>Haemophilus influenzae</i> + <i>Legionella</i> species + <i>Moraxella catarrhalis</i>	1	FPEm

RT-PCR: reverse-transcriptase real-time polymerase chain reaction; BAL: bronchoalveolar lavage; FPEf: fluid drained from pleural effusion; FPEm: fluid drained from pleural empyema.

significantly more detected in FPEm ( $p < 0.001$ ) compared to the other sample types.

**3.3. Coinfections.** Multiple bacteria or bacterial coinfections were detected in a total of 14/61 (23%) specimens using RT-PCR. Only one case of coinfection was reported with culture: *Pseudomonas aeruginosa* and *Citrobacter koseri* (4%; 1/25) in BAL. Table 3 shows the different coinfections obtained according to the clinical sample.

#### 4. Discussion

The diagnosis and management of respiratory tract infections are great challenges in Africa due to the socioeconomic burden and limited access to good healthcare and hospitals. In order to formulate adequate guideline for the management of LRTIs, including diagnosis and treatment, data on the aetiology of the LRTIs should be obtained. This study focused on establishing the bacterial aetiology of LRTIs following diagnostic tools and type of clinical samples. One hundred and forty-one clinical samples from patients presenting symptoms of LRTIs were subjected to bacterial investigations using traditional culture and RT-PCR.

At least one bacterium could be detected in 46.8% of the 141 patients clinically diagnosed with LRTIs. This prevalence is similar to 45.2% found in Enugu State, Nigeria [20], but higher than the 24% reported in Tunisia [21]. Using the same diagnostic approach, prevalence of 77% and 85.7% was reported in Gambia and in Osun State, Nigeria, respectively [22, 23]. The prevalence rates may be explained by the differences in study designs and geographic areas. Indeed, the spread of respiratory infections varies between populations and countries, depending on difference in geography, climate, and socioeconomic conditions [24–27]. In addition, we reported the bacterial aetiology of LRTIs in adults, whereas most studies included only children. The lower prevalence rate compared to Gambia and Nigeria might also be explained by the high percentage (76.6%) of patients who used antibiotics before enrolment.

*S. pneumoniae* was the leading pathogen of LRTIs followed by *H. influenzae* and *K. pneumoniae*. *S. pneumoniae* was also found to be the main cause of LRTIs in a study in Malawi [28] and Tunisia [21]. However, other studies in Nigeria, which is a neighboring country of Cameroon, reported *K. pneumoniae* as the most detected pathogen [8, 20] in LRTIs or *S. aureus* in Tunisia [29]. *S. pneumoniae* remains an important pathogen in LRTIs even with the introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine [30]. This suggests that further investigations are needed for vaccine impact. Conversely, no *H. influenzae* type b was observed. Although *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, and *K. pneumoniae* were the key bacteria, there was a remarkable variation in distribution of these etiologic agents between clinical samples.

We observed an association between bacterial detection and type of clinical sample. The bacterial detection rate was the lowest in FPEf compared to the other clinical samples. The frequency of bacterial detection in FPEf (3% by culture) was as low as the one observed in Spain, where 7% (14/191) of fluids from uncomplicated parapneumonic pleural effusions were culture-positive [31]. The low detection level could be due to the fact that 80.6% of FPEf were from patients undergoing an antimicrobial treatment.

In FPEm, the bacterial detection rate by culture (26.5%) was low compared to previous results obtained in the Jamot Hospital (Yaoundé, Cameroon) 8 years ago, where the bacterial detection rate was 53.7% [32] and also compared to a study in Lleida Spain, reporting a culture positivity rate of 66% [31]. But our bacterial detection rate in FPEm was higher compared to the one obtained in San Sebastian, Spain, where only 10% of bacteria-positive FPEm was detected by culture between January 2005 and December 2012 [33]. Also in the study performed in San Sebastian, the use of antibiotics prior to bacteriological investigations was high (81.7%). However, the study performed in Lleida did not report on the prior use of antibiotics. Most bacterial detections were in FPEm and we hypothesize that this could be due to the nutrient-rich medium of FPEm supporting the growth of pathogenic



bacteria such as *S. pneumoniae* strains. This may be one of the reasons why pneumococci are a common bacterial cause of empyema. Thus, the high density and persistent growth of *S. pneumoniae* in pleural fluid highlight the importance of draining infected effusions [34].

We found *H. influenzae* to be the key pathogen in BAL, which is different from what has been observed in lung aspirates of Malawian and Gambian children with *S. pneumoniae* [22, 35]. Our result in BAL is also different from the ones in Korean adults with methicillin-resistant *S. aureus* [36] as the most frequently isolated bacterium. Overall, bacterial profiles from BAL vary among studies [37].

The RT-PCR increased the yield of bacteria detection by 25.5%. As previously reported [33], the use of molecular tool has greatly improved microbial diagnosis of LRTIs. In the present study, only 25 positive cultures were obtained among the 141 patients. Concordant with a recent study conducted in Sweden [38], using the RT-PCR, we were able to detect the noncultivable and fastidious pathogen *Legionella species* which is overlooked by routine standard culture. Rapid detection of uncommon pathogens from LRTI samples by molecular tool might be important in the clinical routine. Almost all coinfections were detected using RT-PCR. Bacterial coinfection rate was near to the 18.9% of inpatients with nonresponding community-acquired pneumonia in Belgium [39]. This finding suggests that molecular assay is the most useful method to detect coinfections representing near-past and current infections.

**Limitations.** Antibiotic treatment prior to the diagnosis and delay of patients could be biases for real pathogen frequencies reported in this study.

## 5. Conclusion

Bacterial aetiology was more reported in cases of LRTI with empyema. *S. pneumoniae* and *H. influenzae* were the most commonly detected bacteria. The molecular tool used during investigation detected significantly more bacteria than traditional culture and may be an additional helpful tool for diagnosis of LRTIs. Nevertheless, control of antibiotic use and early diagnosis are crucial when managing LRTIs.

## Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

## Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

This work was supported by the United States Department of Health and Human Services [Grant no. 6 DESP060001-01-01] via the International Network of Pasteur Institutes. The

authors' gratitude goes towards participants. They appreciate the collaboration of the Yaoundé Jamot Hospital staff.

## References

- [1] C. J. L. Murray and A. D. Lopez, "Measuring the global burden of disease," *The New England Journal of Medicine*, vol. 369, no. 5, pp. 448–457, 2013.
- [2] "Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015," *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 17, no. 11, pp. 1133–1161, 2015.
- [3] S. Khan, P. Singh, M. Ansari, and K. Gurung, "Bacteria etiological agents causing lower respiratory tract infections in the western part of Nepal," *Immosina Journal of Medicine and Biomedical Sciences*, vol. 6, no. 1, pp. 3–8, 2014.
- [4] L. Ren, Z. Xiang, L. Guo, and J. Wang, "Viral infections of the lower respiratory tract," *Current Infectious Disease Reports*, vol. 14, no. 3, pp. 284–291, 2012.
- [5] A. T. Pavia, "Viral infections of the lower respiratory tract: Old viruses, new viruses, and the role of diagnosis," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 52, no. 4, pp. S284–S289, 2011.
- [6] A. S. Ouedraogo, H. Jean Pierre, A. L. Bañuls, R. Ouedraogo, and S. Godreuil, "Emergence and spread of antibiotic resistance in West Africa: contributing factors and threat assessment," *Medecine et Sante Tropicales*, vol. 27, no. 2, pp. 147–154, 2017.
- [7] M. Uzoamaka, O. Ngozi, O. S. Johnbull, and O. Martin, "Bacterial etiology of lower respiratory tract infections and their antimicrobial susceptibility," *The American Journal of the Medical Sciences*, vol. 354, no. 5, p. 471, 2017.
- [8] C. A. Egbe, C. Ndiokwere, and R. Omoregie, "Microbiology of lower respiratory tract infections in Benin city, Nigeria," *Malaysian Journal of Medical Sciences*, vol. 18, no. 2, pp. 27–31, 2011.
- [9] S. Koulla-Shiro, C. Kuaban, and L. Belec, "Acute community-acquired bacterial pneumonia in human immunodeficiency virus (HIV) infected and non-HIV-infected adult patients in Cameroon: Aetiology and outcome," *Tubercle and Lung Disease*, vol. 77, no. 1, pp. 47–51, 1996.
- [10] S. Koulla-Shiro, C. Kuaban, and L. Bélec, "Microbial etiology of acute community-acquired pneumonia in adult hospitalized patients in Yaounde-Cameroon," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 3, no. 2, pp. 180–186, 1997.
- [11] D. J. Cook, J. M. Fitzgerald, G. H. Guyatt, and S. Walter, "Evaluation of the protected brush catheter and bronchoalveolar lavage in the diagnosis of nosocomial pneumonia," *Journal of Intensive Care Medicine*, vol. 6, no. 4, pp. 196–205, 1991.
- [12] "Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 171, no. 4, pp. 388–416, 2005.
- [13] K. B. Laupland and L. Valiquette, "The changing culture of the microbiology laboratory," *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, vol. 24, no. 3, pp. 125–128, 2013.
- [14] A. Endimiani, K. M. Hujer, A. M. Hujer et al., "Are we ready for novel detection methods to treat respiratory pathogens in hospital-acquired pneumonia?" *Clinical Infectious Diseases*, vol. 52, supplement 4, pp. S373–S383, 2011.

- [15] M. Lung and G. Codina, "Molecular diagnosis in HAP/VAP," *Current Opinion in Critical Care*, vol. 18, no. 5, pp. 487–494, 2012.
- [16] S. Kenmoe, P. Tchendjou, M.-A. Vernet et al., "Viral etiology of severe acute respiratory infections in hospitalized children in Cameroon, 2011–2013," *Influenza and Other Respiratory Viruses*, vol. 10, no. 5, pp. 386–393, 2016.
- [17] R. Njouom, E. L. Yekwa, P. Cappy, A. Vabret, P. Boisier, and D. Rousset, "Viral etiology of influenza-like illnesses in Cameroon, January–December 2009," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 206, supplement 1, pp. S29–S35, 2012.
- [18] M. Ried, J. Graml, C. Groer, H.-S. Hofmann, and Z. Szklavari, "Para- and postpneumonic pleural empyema: current treatment strategies in children and adults," *Zentralblatt für Chirurgie*, vol. 140, Supplement 1, pp. S22–S28, 2015.
- [19] W. C. Winn, S. D. Allen, A. Stephen et al., *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th edition, 2006.
- [20] M. Uzoamaka, O. Ngozi, O. S. Johnbull, and O. Martin, "Bacterial etiology of lower respiratory tract infections and their antimicrobial susceptibility," *The American Journal of the Medical Sciences*, vol. 354, no. 5, pp. 471–475, 2017.
- [21] M. Fekih Hassen, A. Ben Haj Khalifa, N. Tilouche et al., "Severe community-acquired pneumonia admitted at the intensive care unit: Main clinical and bacteriological features and prognostic factors: A Tunisian experience," *Revue de Pneumologie Clinique*, vol. 70, no. 5, pp. 253–259, 2014.
- [22] S. R. C. Howie, G. A. J. Morris, R. Tokarz et al., "Etiology of severe childhood pneumonia in the Gambia, West Africa, determined by conventional and molecular microbiological analyses of lung and pleural aspirate samples," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 59, no. 5, pp. 682–685, 2014.
- [23] B. P. Kuti and O. A. Oyelami, "Risk factors for parapneumonic effusions among children admitted with community-acquired pneumonia at a tertiary hospital in south-west Nigeria," *African Journal of Respiratory Medicine*, vol. 10, no. 1, pp. 26–34, 2014.
- [24] T. B. Kwofie, Y. A. Anane, B. Nkrumah, A. Annan, S. B. Nguah, and M. Owusu, "Respiratory viruses in children hospitalized for acute lower respiratory tract infection in Ghana," *Virology Journal*, vol. 9, article no. 78, 2012.
- [25] X. Huo, Y. Qin, X. Qi et al., "Surveillance of 16 respiratory viruses in patients with influenza-like illness in Nanjing, China," *Journal of Medical Virology*, vol. 84, no. 12, pp. 1980–1984, 2012.
- [26] J. del Valle Mendoza, A. Cornejo-Tapia, P. Weigl et al., "Incidence of respiratory viruses in Peruvian children with acute respiratory infections," *Journal of Medical Virology*, vol. 87, no. 6, pp. 917–924, 2015.
- [27] B. Cui, D. Zhang, H. Pan et al., "Viral aetiology of acute respiratory infections among children and associated meteorological factors in southern China," *BMC Infectious Diseases*, vol. 15, p. 124, 2015.
- [28] T. K. Hartung, D. Chimbayo, J. J. G. van Oosterhout et al., "Etiology of suspected pneumonia in adults admitted to a high-dependency unit in Blantyre, Malawi," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 85, no. 1, pp. 105–112, 2011.
- [29] S. Hamouda, K. Chraïet, F. Khalsi et al., "Community-acquired pleuropneumonia in children: Bacteriological and therapeutic challenges," *La Tunisie Médicale*, vol. 94, no. 4, pp. 290–297, 2016.
- [30] L. F. Pittet and K. Posfay-Barbe, "Pneumococcal vaccines for children: A global public health priority," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 18, no. 5, pp. 25–36, 2012.
- [31] J. M. Porcel, A. Esquerda, M. Vives, and S. Bielsa, "Etiology of Pleural Effusions: Analysis of More than 3,000 Consecutive Thoracenteses," *Archivos de Bronconeumología*, vol. 50, no. 5, pp. 161–165, 2014.
- [32] E. W. Yone Pefura, C. Kuaban, S. Leonie, and E. Afane Ze, "Non-tuberculous purulent pleural effusion in adults in Yaounde, Cameroon," *Medecine et Sante Tropicales*, vol. 22, no. 1, pp. 35–39, 2012.
- [33] J. M. Marimón, M. Morales, G. Cilla, D. Vicente, and E. Pérez-Trallero, "Detection of bacteria and viruses in the pleural effusion of children and adults with community-acquired pneumonia," *Future Microbiology*, vol. 10, no. 6, pp. 909–915, 2015.
- [34] N. D. Popowicz, S. M. Lansley, H. M. Cheah et al., "Human pleural fluid is a potent growth medium for Streptococcus pneumoniae," *PLoS ONE*, vol. 12, no. 11, Article ID e0188833, 2017.
- [35] E. D. Carrol, L. A. Mankhambo, M. Guiver et al., "PCR improves diagnostic yield from lung aspiration in Malawian children with radiologically confirmed pneumonia," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 6, Article ID e21042, 2011.
- [36] E. S. Kim, E.-C. Kim, S.-M. Lee et al., "Bacterial yield from quantitative cultures of bronchoalveolar lavage fluid in patients with pneumonia on antimicrobial therapy," *Korean Journal of Internal Medicine*, vol. 27, no. 2, pp. 156–162, 2012.
- [37] M. El-Shabrawy and R. H. EL-Sokkary, "Role of fiberoptic bronchoscopy and BAL in assessment of the patients with non-responding pneumonia," *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*, vol. 65, no. 3, pp. 613–620, 2016.
- [38] M. Ullberg, P. Lühje, P. Mölling, K. Strålin, and V. Özenci, "Broad-range detection of microorganisms directly from bronchoalveolar lavage specimens by PCR/electrospray ionization-mass spectrometry," *PLoS ONE*, vol. 12, no. 1, Article ID e0170033, 2017.
- [39] I. De Schutter, E. De Wachter, F. Crokaert et al., "Microbiology of bronchoalveolar lavage fluid in children with acute nonresponding or recurrent community-acquired pneumonia: Identification of nontypeable haemophilus influenzae as a major pathogen," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 52, no. 12, pp. 1437–1444, 2011.

## Journal Pre-proof

Analysis of *Haemophilus* species in patients with respiratory tract infections in Yaoundé, Cameroon

Serges Tchatchouang, Ariane Nzouankeu, Eva Hong, Aude Terrade, Mélanie Denizon, Ala-Eddine Deghmane, Suzie Moyo Tetang Ndiang, Eric-Walter Pefura-Yone, Véronique Penlap Beng, Richard Njouom, Marie-Christine Fonkoua, Muhamed-Kheir Taha



PII: S1201-9712(20)30669-X  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.08.040>  
Reference: IJID 4537  
To appear in: *International Journal of Infectious Diseases*  
Received Date: 22 June 2020  
Revised Date: 13 August 2020  
Accepted Date: 16 August 2020

Please cite this article as: { doi: <https://doi.org/>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2020 Published by Elsevier.

**Analysis of *Haemophilus* species in patients with respiratory tract infections in Yaoundé, Cameroon**

**Running title:** Haemophilus influenzae infections

Serges Tchatchouang<sup>1,2,3,4</sup>, Ariane Nzouankeu<sup>2</sup>, Eva Hong<sup>4</sup>, Aude Terrade<sup>4</sup>, Mélanie Denizon<sup>4</sup>, Ala-Eddine Deghmane<sup>4</sup>, Suzie Moyo Tetang Ndiang<sup>5</sup>, Eric-Walter Pefura-Yone<sup>6</sup>, Véronique Penlap Beng<sup>3</sup>, Richard Njouom<sup>1</sup>, Marie-Christine Fonkoua<sup>2</sup> and Muhamed-Kheir Taha<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Virology, Centre Pasteur of Cameroon, Yaoundé, Cameroon

<sup>2</sup>Department of Bacteriology, Centre Pasteur of Cameroon, Yaoundé, Cameroon

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, University of Yaoundé 1, Cameroon

<sup>4</sup>Invasive Bacterial Infections Unit, National Reference Centre for Meningococci and *Haemophilus influenzae*, Institut Pasteur, Paris, France

<sup>5</sup> Department of Pediatrics, Essos Hospital Centre, P.O Box Yaoundé, Cameroon

<sup>6</sup> Department of Pneumology, Jamot Hospital, P.O. Box 4021, Yaoundé, Cameroon

\*Correspondence: [muhamed-kheir.taha@pasteur.fr](mailto:muhamed-kheir.taha@pasteur.fr)

Highlight

- Little is known on *Haemophilus* infections and their antibiotic resistance in Africa.
- Molecular approaches including whole genome sequencing can be helpful.
- Nontypable *Haemophilus influenzae* predominated.
- These isolates showed highly diverse genetic structures.
- Increasing resistance to beta lactams is observed.

Journal Pre-proof

**ABSTRACT**

**Objectives:** To identify *Haemophilus* species and characterize antimicrobial susceptibility of isolates from patients with respiratory tract infections (RTIs) in Cameroon.

**Methods:** Isolates (n=95) were from patients with RTIs obtained from two Hospitals in Yaoundé, Cameroon. Isolates were identified by biochemical assay, PCR-based method, MALDI-TOF and whole genome sequencing. Antibiotic minimum inhibitory concentrations were determined by E-test.

**Results:** *H. influenzae* was the most prevalent species varying from 76.8% to 84.2% according to different methods. The isolates were mainly nontypable (n=70, 96%). Three isolates of *H. influenzae* were capsulated (b, e and f). The isolates were genetically diverse and 40 unique sequence types were identified including 11 new ones. Resistance to ampicillin was observed among 55.3% (52/94) and 9% (14/52) produced TEM-1  $\beta$ -lactamase. PBP3 mutations occurred in 57.7% of ampicillin resistant isolates (30/52). Eleven isolates were chloramphenicol resistant with 80% producing chloramphenicol acetyltransferase (8/10). Four *Haemophilus* isolates were rifampicin resistant with two mutations in *rpoB* gene. Five isolates were ciprofloxacin resistant and harbored mutations in the quinolone resistance determining regions of *gyrA* and *parC* genes.

**Conclusion:** *H. influenzae* isolates are highly diverse and show high levels of antibiotic resistance. *H. influenzae* serotype b is still circulating in the post-vaccination era.

**Keywords:** Respiratory tract infection; *Haemophilus* species; typing, antibiotic resistance; whole genome sequencing

## INTRODUCTION

The genus *Haemophilus* is a member of the family *Pasteurellaceae* and is usually represented as non-motile, aerobic or facultative anaerobic Gram negative coccobacillus (Winslow et al., 1917). The most known species is *H. influenzae* which is classified into six serotypes (a to f) on the basis of capsular polysaccharide as well as non-encapsulated type (non typable). *H. haemolyticus*, *H. parahaemolyticus* and *H. parainfluenzae* are also species of the genus *Haemophilus* (Winslow et al., 1917). These species are among the early colonizers of the upper respiratory tract. However, they can also provoke respiratory tract infections (RTIs) in children and the elderly. Additionally, they are (particularly *H. influenzae*) major cause of severe invasive infections such as meningitis and bacteremia. *H. influenzae* serotype b is the most virulent and was estimated in 2007 to account globally for approximately 400,000 deaths annually (WHO 2006).

*Haemophilus* infections in Cameroon reported with a prevalence of 20% in 2008 in the upper respiratory tract among school children in Buea (Ndip et al., 2008), 27.7% in bacterial meningitis in children in three hospital located in Yaoundé, Dschang and Kousseri (Gervaix et al., 2012) and 3.7% in non-tuberculosis purulent pleural effusion in adults in Yaoundé in 2012 (Pefura Yone et al., 2012). Considering antibiotic resistance, the isolates were frequently resistant to  $\beta$ -lactams (penicillin, 100%; ampicillin, 60%), sulfonamides (100%) and chloramphenicol (30%) (Ndip et al., 2008).

Vaccination against *H. influenzae* serotype b was introduced in Cameroon in 2009 through the Expanded Program on Immunization and it is free of charge for children aged 0-11 months. Vaccine coverage varies from 22.8% to 93.3% according to localities (Ateudjieu et al., 2020, Chiabi et al., 2017, Gervaix et al., 2012). Since the introduction of this vaccine in many countries, the burden of *Haemophilus* related infections has been increasingly dominated by non-typable *H. influenzae* (NTHi). For instance, no meningitis with Hib was recorded in the

North of Cameroon after the introduction of the vaccine (Massenet and Tapindjin-Gake 2010), showing the positive effect of the vaccine. Vaccine failure has been observed in other countries (Lee et al., 2008, Purohit et al., 2014) and *Haemophilus* species as pathogens in RTIs after introduction of the Hib conjugated vaccine have not been well studied in Cameroon because most data focused on phenotypic characterization. Moreover, discriminating between NTHi and other *Haemophilus* species is challenging and misidentification of *H. haemolyticus* as NTHi was reported (Pickering et al., 2014, Zhang et al., 2014) due to the high similarity in morphology and biochemical characteristics between them. Usually, NTHi are associated with respiratory tract infections that result in antibiotic prescription and probabilistic antibiotic therapy can select resistant isolates. Whilst *H. haemolyticus* is rarely associated with disease (Anderson et al., 2012). Identifying correctly *Haemophilus* species in infection is currently an expanding area of study because of the impact on diagnostic and treatment, knowing that all these *Haemophilus* species present potential risk of triggering invasive and severe infections. Their colonization begins in the upper airways and can spread throughout the respiratory tract potentially leading to invasive infections (van Belkum et al., 2007). Our objective was to describe the molecular epidemiology of *Haemophilus* species isolated from patients with respiratory tract infections in Yaoundé, Cameroon.

## METHODOLOGY



### **Patients and bacterial isolates**

From January 2017 to March 2018, isolates of *Haemophilus* species were recovered from hospitalized patients with respiratory tract infections who attended Jamot Hospital and Essos Hospital Centre in Yaoundé, Cameroon. The Jamot Hospital is the reference hospital for management of respiratory diseases in Yaoundé and its surroundings. The Essos Hospital Centre is one of the reference hospitals for pediatrics and the main site for recruitment of children with severe respiratory tract infection in the city of Yaoundé as part of influenza surveillance. Patients were enrolled consecutively in the site studies. Patients who presented at least two of the following symptoms: fever, cough, dyspnoea, wheezing, chest pain or sore throat were considered suffering from respiratory tract infections. Up to 100% of patients from Essos Hospital Centre suffered from upper respiratory tract infections whereas 89% of the patients from the Jamot Hospital suffered from lower respiratory tract infections. Age and sex of patients, history of *H. influenzae* type b immunization and prior antibiotic therapy were documented. The clinical samples from which *Haemophilus* isolates were detected are: nasopharyngeal swabs, pleural fluids, sputa and broncho-alveolar lavage. The isolates were therefore mostly from non-invasive infections. Across the sites, more than half of the participants had taken antibiotics prior to admission (68.6%) and bacterial growth was associated to this parameter.

### **Bacterial growth, DNA preparation**

Isolates were cultured onto polyvitex chocolate agar plates and incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 18 to 24 hours. DNA extraction for PCR and next generation sequencing were performed as previously described (Deghmane et al., 2019).

### **Bacterial identification**

*Haemophilus* species were initially identified by colony morphology, Gram stain and requirement for growth factors (V-, X- and XV-factors). PCR of the *ompP2*, *bexA*, *fucK*, *iga* and *hpd* genes was applied as previously described (Deghmane et al., 2019). Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) Biotyper, version 3.0 (Bruker Daltonics, Champs sur Marne, France) was performed as previously described (Hong et al., 2019). Genetic identification was done by ribosomal Multi Locus Sequence Typing (rMLST) on pubmlst.org site, BLAST analysis for homology of *rpoB* gene was performed on <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> for the identification of *Haemophilus* species.

### **Serotyping**

Slide agglutination kit was performed (ImmuLex *Haemophilus influenzae* type a-f antisera, MEDIFF, Aubagne, France). A PCR to detect the capsule-producing gene *bexA* and *cap* genes for determining capsular serotypes was also performed in all *H. influenzae* isolates. (Falla et al., 1994).

### **Susceptibility testing**

Disk diffusion method was used according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) standards (EUCAST, <http://www.eucast.org/>) and minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by E tests following manufacturer's guide (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France). B-lactamase activity was screened for all isolates by the Chromogenic nitrocephin test (nitrocefin disks, bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France). The *H. influenzae* strains ATCC49247 and ATCC49766 were used as controls.

### **Whole genome sequencing analysis**

Illumina technology (NextSeq 500, Illumina) was used. Library preparation was performed as previously described (Deghmane et al., 2019). The Multilocus sequence typing (MLST) profiles for *H. influenzae* were extracted from the whole genome sequence through the website (<http://pubmlst.org/hinfluenzae/>), Allele numbers and ST were assigned. The relationship search between STs generated in this study and existing STs in the MLST global database was evaluated by eBURST analysis in the Phyloviz 2.0 software (Francisco et al., 2009, Nascimento et al., 2017). Other tools were also used and available on the Pubmlst database (genome comparator tools).

WGS data were also analyzed using a “gene-by-gene” approach using the annotated reference strain (Rd KW20) on the Bacterial Isolate Genome Sequence Database (BIGSdb) platform on PubMLST (Jolley and Maiden 2010). SplitsTree4 (version 4.14.6) was used to visualize the resulting distance matrices as Neighbour-net networks (Huson and Bryant 2006). Grape Tree was also drawn on the basis of comparisons of allelic profiles for the isolates with complete MLST data. IDs of *H. influenzae* isolates with complete MLST data are given in the Supplementary Table to allow retrieving of WGS sequences in FASTA formats.

Multiple alignments of *rpoB*, *gyrA* and *ftsI* proteins were done with Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). For *ftsI* profile not determined by Illumina sequencer, Sanger sequencing was applied. Neighbor-Net SplitsTree graphs were generated using SplitsTree4 to visualize trees of *Haemophilus* species from distance matrices.

### **Molecular mechanism of antibiotic resistance**

From the sequencing data, mutations/alterations in genes encoding enzymes associated to antibiotic resistance were extracted from <http://pubmlst.org/hinfluenzae/> on the basis of published data from the literature. The mutations associated to fluoroquinolone resistances were detected from the quinolone resistance-determining regions (QRDRs) of *gyrA*, *parC* and *parE*

genes (Puig et al., 2014). Similarly, mutations associated to rifampicin were extracted from *rpoB* gene (Cruchaga et al., 2003). For chloramphenicol resistance, chloramphenicol acetyltransferase (*cat*) gene production was searched. For  $\beta$ -lactams, three approaches were considered: production of  $\beta$ -lactamases, mutations in the *ftsI* gene encoding penicillin-binding protein 3 (PBP3) or both mechanisms (Dabernat et al., 2002, Deghmane et al., 2019). ROB-1 or TEM-1  $\beta$ -lactamases were determined by DNA sequence comparisons (Livrelli et al., 1991). Mutations in the *ftsI* gene encoding PBP3 were determined using <http://pubmlst.org/hinfluenzae/> (Deghmane et al., 2019).

### Data analysis

Data were analyzed using the Statistical Package for Social Sciences software (version 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). For isolate identification, the agreement between methods was estimated. The chi-square test was used to compare categorical variables. Statistically significant differences were defined as those for which the probability of occurrence was <5%.

## RESULTS

Ninety-five apparent *Haemophilus* isolates from 440 patients (21.6%) suffering from respiratory tract infections were collected among whom 62.1% were females (59/95). As shown in the Table 1, 77.9% (74/95) of *Haemophilus* isolates were from children. Hib immunization status could be determined in 73.7% cases (70/95). Antibiotic treatment prior to bacterial culture was 54.7% (52/95).

### Identification

On the basis of phenotypic growth requirement, 80 (84.2%) isolates of the 95 tested isolates in this study were identified as *H. influenzae* while the remaining 15 isolates were identified as *H. parainfluenzae*. The MALDI-TOF allowed to identify 74 isolates as *H. influenzae* (Table 2). Molecular identification by WGS revealed 73 *H. influenzae* (76.8%) and 15 *H. haemolyticus* (15.8%), 6 *H. parainfluenzae* (6.3%) and 1 *Actinobacillus porcitonisillarum* (1.1%). WGS-based identification served as reference and *rpoB* sequencing showed the best correlation with WGS data (99%). rMLST identified all *H. parainfluenzae* and *Actinobacillus porcitonisillarum* as *Aggregatibacter segnis*. MALDI-TOF identified *Actinobacillus porcitonisillarum* as *H. parahaemolyticus*. Identification agreement between *rpoB* BLAST and MALDI-TOF was 98.9% and that of rMLST and *rpoB* BLAST was 90.5%.

### Serotyping

Out of the 73 *H. influenzae* isolates, 3 encapsulated isolates (4.1%) were identified in female patients by agglutination test and PCR with agreement of 100%. These serotypes were type b, e and f. The remaining isolate did not possess capsulation locus. Serotype b isolate occurred in a child of 12 years old not immunized against Hib. The serotype e and f occurred in patients of 1 (immunized) and 33 years old (not immunized) respectively.

### Antibiotic resistance

AMC (Amoxicillin/Clavulanic acid) and CRO (Ceftriaxone) were the most active antibiotics (100%) in all *Haemophilus* isolates. The main resistance rates included SXT (Trimethoprim/Sulfamethoxazole), API (Ampicillin), TET (Tetracycline) and CHL (Chloramphenicol) with 91%, 55.3%, 10.6% and 10.6% respectively (figure 1). The resistance to nalidixic acid and rifampicin were 4.2% for both. Of the ampicillin-resistant isolates, 14 produced  $\beta$ -lactamase among which 35.7% of isolates demonstrated multiple resistance to SXT25, TET30, API2 and CHL30 (5/14).  $\beta$ -lactamase-positive rates were high in children (78.6%; 11/14).

### Ampicillin resistance mechanisms

Of the 52 ampicillin resistant *Haemophilus* isolates, there were 14 new *ftsI* alleles identified in this study. Several *ftsI* alleles (n=40) had mutations in the transpeptidase domain of the *ftsI* gene related to decreased susceptibility. Out of the 14 *Haemophilus* isolates producing  $\beta$ -lactamase, 28.6% (4/14) exhibited also mutations in the *ftsI* gene encoding PBP3. The genetic platform bearing *TEM-1* was detected in all  $\beta$ -lactamase producing isolates. Table 3 summarizes the amino acid changes observed.

Among the 31 resistant *H. influenzae* isolates, 20 isolates showed mutations in *ftsI* of which 10 were of group II and 10 belonged to group III (Table 3) according to (Deghmane et al., 2019). In addition to the common E398D and I488V substitutions, 5 out of the 6 *H. parainfluenzae* ampicillin-non-susceptible isolates displayed mutations as shown in Table 3. Of the 15 *H. haemolyticus*, 14 were ampicillin resistant and all showed mutations in *ftsI* gene.

### Chloramphenicol acetyltransferase production

Of the 10 resistant *Haemophilus* isolates to chloramphenicol, there were 1 *H. parainfluenzae*, 2 *H. haemolyticus* and 7 *H. influenzae*. The molecular mechanism underlying this resistance was the production of chloramphenicol acetyltransferase enzyme in these isolates except for two *H. influenzae* isolates. These two resistant isolates did not display 50S subunit ribosomal mutations.

#### **Mutations in the QRDRs**

All QRDRs of *gyrA* (DNA gyrase subunit A), *parC* (DNA topoisomerase IV subunit A) and *parE* (DNA topoisomerase IV subunit B) sequences of susceptible and non-susceptible *Haemophilus* isolates were compared with those of *H. influenzae* loci HEAM01394, HAEM01649 and HAEM01650 respectively through the MLST website (<http://pubmlst.org/hinfluenzae/>). Five isolates showed mutations in the QRDRs of *gyrA*, of which, 3 were resistant to ciprofloxacin (on the basis of the diameter of the inhibition zone) and 2 susceptible isolates that exhibited only a S84L mutation as shown in the Table 4. The resistant isolates presented changes at position 84 in *gyrA* and mutations in *parC*. Among resistant isolates with MIC > 2 µg/mL, mutations involved two substitutions at the 84 and 88 positions in QRDRs of *gyrA*. No mutation was obtained in *gyrB* or *parE*.

#### **Mutations in the *rpoB* gene**

None of the isolates that were identified as *H. influenzae* was resistance to rifampicin. However, 4 non *H. influenzae* isolates (4.3% of all tested isolates) were rifampicin resistant including 1 *H. haemolyticus* and 3 *H. parainfluenzae* isolates. Several mutations were detected in the *rpoB* genes encoding the beta subunit of the RNA polymerase in the three *H. parainfluenzae*. Mutation within the cluster I region (507-533) of *rpoB* gene (D516N and N518D) were observed in the two *H. parainfluenzae* isolates with MIC of 32 µg/ml. The *H.*

*haemolyticus* isolate showed no mutation and showed MIC of rifampicin of 1.5 µg/ml (Table 5). None of the rifampicin-susceptible isolates revealed mutations within the rifampicin-resistance determining region of the *rpoB* gene which are described to be associated to resistance.

### Genetic relationships among the isolates

The genetic relatedness among *Haemophilus* species was displayed from the alignment of protein sequences of *ftsI*, *gyrA* and *rpoB* (figure 2). *ftsI* phylogenetic tree allowed separation of the three species (*H. influenzae*, *H. haemolyticus* and *H. parainfluenzae*). This was also the case for *rpoB*-based phylogenetic tree.

The *gyrA* (Figure 2B) gave the less discriminant profile while the phylogenetic tree from *ftsI* (figure 2A) gave a better profile with the different species well separated.

We next analysed the MLST-based genetic relatedness of *H. influenzae* isolates. Out of the 73 *H. influenzae* isolates, 46 have complete MLST profile with all the seven housekeeping genes (*adh*, *atpG*, *fucK*, *frdb*, *mdh*, *pgi* and *recA*) that showed 40 distinct STs. A single isolate represented 34 unique ST while 12 other isolates represented 6 other unique STs (2 isolates per ST) (Fig. 3). The diversity among the 46 *H. influenzae* isolates is also reflected by the high Simpson's Index of diversity that was 1 with 95% confidence interval [1.0, 1.0]. The isolates were highly diverse and several STs in our study corresponded to new STs that were included in the pubmlst database. It is noteworthy that the unique serotype b isolate belonged to ST-222 that is quite different from the ST-6 to which belong the majority of invasive serotype b isolate (Deghmane et al., 2019). The GrapeTree analysis also showed highly diverse structure of the tree and few isolates were linked by less than three different alleles of the 7 MLST genes (Fig. 3). The metadata of these 46 isolates were also very diverse (polysaccharide capsule, age, sex, sample type, study site). The remaining 27 isolates lack one or more housekeeping genes of the



seven loci of the MLST scheme. We therefore compared the whole set of the 73 isolates using WGS analysis using “Gene Comparator” of the BIGSdb against the loci of the reference strain Rd KW20. The neighbour network is presented in Fig. 4 also showed highly diverse structure of the bacterial isolates of this study.

The eBURST algorithm generated from different 40 STs, a single clonal complex and 46 singletons, revealing a high level of genetic diversity in this population structure of *H. influenzae*.

## DISCUSSION

All *Haemophilus* species were correctly identified by *rpoB* analysis and MALDI-TOF on the basis of WGS-based identification. The rMLST failed to identify *H. parainfluenzae* isolates,

because they are most closely related to *Aggregatibacter segnis* (Murphy et al., 2015). NTHi represented 95.9% of *H. influenzae* isolates (70/73). This result is similar to other studies (Chang et al., 2011, Setchanova et al., 2013). In our study, 1.4% (1/73) of *H. influenzae* was type b isolated in a non-vaccinated participant but was genetically distinct from invasive Hib isolates.

Resistance towards the folate pathway inhibitors was frequent and was encountered in 85% of the tested isolates. This result is similar to those in Ethiopia, Thailand and Turkey (Kuvat et al., 2015, Lulitanond et al., 2012, Mulu et al., 2018). As in our study, isolates from these studies were mainly from patients with RTIs. Further studies may need to distinguish between invasive and non-invasive isolates as antibiotic resistance frequencies may differ between these isolates (Deghmane et al., 2019). Moreover, carriage isolates from asymptomatic carriers should be considered.

Resistance to  $\beta$ -lactams was of great importance since they are first line drugs for many bacterial infections. A total of 55.3% of isolates were resistant to  $\beta$ -lactams. We reported 14.7% of isolates were  $\beta$ -lactamase positive, similar to 13.3% reported in North African countries (Algeria, Morocco and Tunisia) (Benouda et al., 2009) but lower than the observed frequencies (over 20%) in several sub-Saharan African countries (Senegal, Democratic Republic of Congo and Central African Republic) (Bercion et al., 2007, Kacou-Ndouba et al., 2016, Ndiaye et al., 2009). All  $\beta$ -lactamase producing *Haemophilus* isolates harboured TEM-1 gene (Tristram et al., 2007).

Among the 25% of *Haemophilus* isolates which had a mutation in their PBP3, the N526K mutation was the most recurrent in *H. influenzae* followed by the D350N mutation. This result is similar to many other studies in Spain (Puig et al., 2013) and Portugal (Barbosa et al., 2011). The mutations associated with resistance in *H. haemolyticus* were similar to those published in many studies using the sequence of the Rd KW20 strain as reference (Maddi et al., 2017, Marti

et al., 2015, Witherden and Tristram 2013). The analysis of mutations conferring ampicillin resistance in *H. haemolyticus* took *H. influenzae* as a reference strain (Marti et al., 2016). Twelve resistant isolates did not exhibit any mutations. The antibiotic resistance mechanism of these remaining  $\beta$ -lactam antibiotic resistant isolates could be due to altered antibiotic permeability and efflux as demonstrated in Gram negative bacteria (Wilke et al., 2005).

Resistance to fluoroquinolones that was previously considered extremely rare in *Haemophilus* species (Pérez-Trallero et al., 2010, Puig et al., 2015) is emerging worldwide with regards of 4.2% recorded in the present study. It is associated with mutations in the genes encoding the DNA gyrase (*gyrA*) and topoisomerase IV (*parC* and *parE*) in *Haemophilus* species. The amino acid substitutions are S84L, D88N/Y in GyrA and S84F/I/R, D88N/Y in ParC, as reported in previous studies (Abotsi et al., 2017, Puig et al., 2015, Rodriguez-Martinez et al., 2011). Only *Haemophilus* isolates with MICs > 2  $\mu$ g/ml of ciprofloxacin exhibited mutations 84 and 88 in both *gyrA* and *parC*. This result is different from many other studies where isolates with  $2 > \text{MICs} (\mu\text{g/ml}) > 0.5$  presented at least two mutations (Faccione et al., 2016, Shoji et al., 2014). However, two isolates had mutation at position 84 of GyrA but showed susceptible phenotype. Similarly, in Japan, 3 susceptible *H. influenzae* isolates had a single mutation (two Ser84-Leu mutations in the *gyrA* gene and one mutation at Gly82-Arg in *parC*) (Shoji et al., 2014). Our findings are different from most studies which show that the mutation at position 84 was associated to fluoroquinolone resistance. In South Africa, it has been found that the only mutation at position 84 in GyrA was associated to fluoroquinolone resistance (Elliott et al., 2003). The S84L mutation was found in both susceptible and resistant isolates suggesting that it is an initial but not a sufficient step in the development of fluoroquinolone resistance (Seyama et al., 2017, Shoji et al., 2014).

After analysing the sequence of rifampicin-resistance determining region of the *rpoB* gene, 2 resistant isolates out of 4 showed 2 substitutions in the conserved cluster I region (507-

533) of *rpoB* gene (D516N and N518D), considered as markers of rifampicin resistance (Abadi et al., 1996, Cruchaga et al., 2003, Goldstein 2014). Other amino acid changes outside clusters (amino acids 507-533; amino acids 563–572 and amino acid 687) including F506S, V634I, T724I and L979V were detected in resistant isolates of *H. parainfluenzae* but not in susceptible isolates suggesting that they could play a role in rifampicin resistance. The resistance mechanism in *H. haemolyticus* with MIC of 1.5 µg/ml without any mutation in the rifampicin-resistance determining region of the *rpoB* gene highlighted the fact that amino acid substitution in the *rpoB* gene is not the only resistance mechanism in *Haemophilus* species. (Abadi et al., 1996, Cruchaga et al., 2003, Goldstein 2014).

Among the 94 *Haemophilus* isolates, 10.6% were resistant to chloramphenicol that is lower than 21.7% reported in Cameroon in 2001 (Fonkoua et al., 2001). The difference in resistance profile can be linked to the fact that most *Haemophilus* isolates were not invasive. Additionally, chloramphenicol, is no longer used in routine due to the side effect. Production of chloramphenicol acetyltransferase enzyme was recorded in 81.8% of resistant isolates. Indeed, enzymatic inactivation by acetylation of the drug via different types of chloramphenicol acetyltransferases is the the first and still most frequently encountered mechanism of bacterial resistance to chloramphenicol (Tristram et al., 2007). However, 2 resistant isolates of *Haemophilus* species (18.2%) remained with unknown resistance mechanism and we hypothesized that it could be due to other mechanism such as efflux systems, inactivation by phosphotransferases, mutations of the target site and permeability barriers (Schwarz et al., 2004).

High genetic diversity was observed but no association was found between the ST and clinical and demographic parameters. Similar results have already been reported in USA, Spain and Italy (Giufre et al., 2018, Puig et al., 2013, Schumacher et al., 2012). In summary, *Haemophilus* respiratory infections are dominated by highly diverse NTHi in Cameroon showing high level

of antibiotic resistance. Vaccines for NTHi would be of great interest with regards to its detection rate.

#### **Funding sources**

This work was supported by the United States Department of Health and Human Services [grant number 6 DESP060001-01-01], The Institut Pasteur and the Institut Pasteur International Network (RIIP) through Traineeship Grants Calmette and Yersin.

#### **Ethical approval**

Ethical approval for this study was granted from the National Research Ethics Committee of Cameroon N°2017/03/876/CE/CNERSH/SP. Written informed consent was obtained from all participants. For minors to enter the study, parents or guardians gave written informed consent.

#### **Conflict of interest**

We have no conflict of interest to declare.

#### **Acknowledgments:**

The authors want to thank the participating hospitals (Jamot and Essos Centre Hospitals) and all participants.

#### **References**

- Abadi FJ, Carter PE, Cash P, Pennington TH. Rifampin resistance in *Neisseria meningitidis* due to alterations in membrane permeability. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:646-51.
- Abotsi RE, Govinden U, Essack SY. Mechanisms of antibiotic resistance in *Haemophilus parainfluenzae*. *Southern African Journal of Infectious Diseases* 2017; 32:111-4.

- Anderson R, Wang X, Briere EC, Katz LS, Cohn AC, Clark TA , et al. *Haemophilus haemolyticus* Isolates Causing Clinical Disease. *Journal of clinical microbiology* 2012; 50:2462-5.
- Ateudjieu J, Yakum MN, Goura AP, Tembei AM, Ingrid DK, Bit'a Landry B , et al. EPI immunization coverage, timeliness and dropout rate among children in a West Cameroon health district: a cross sectional study. *BMC Public Health* 2020; 20:228.
- Barbosa AR, Giufre M, Cerquetti M, Bajanca-Lavado MP. Polymorphism in *ftsI* gene and (beta)-lactam susceptibility in Portuguese *Haemophilus influenzae* strains: clonal dissemination of beta-lactamase-positive isolates with decreased susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2011; 66:788-96.
- Benouda A, Ben Redjeb S, Hammami A, Sibille S, Tazir M, Ramdani-Bouguessa N. Antimicrobial resistance of respiratory pathogens in North African countries. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)* 2009; 21:627-32.
- Bercion R, Bobossi-Serengbe G, Gody JC, Beyam EN, Manirakiza A, Le Faou A. Acute Bacterial Meningitis at the 'Complexe Pédiatrique' of Bangui, Central African Republic. *Journal of tropical pediatrics* 2007; 54:125-8.
- Chang A, Kaur R, Michel LV, Casey JR, Pichichero M. *Haemophilus influenzae* vaccine candidate outer membrane protein P6 is not conserved in all strains. *Hum Vaccin* 2011; 7:102-5.
- Chiabi A, Nguefack FD, Njapndounke F, Kobela M, Kenfack K, Nguefack S , et al. Vaccination of infants aged 0 to 11 months at the Yaounde Gynaeco-obstetric and pediatric hospital in Cameroon: how complete and how timely? *BMC Pediatr* 2017; 17:206.
- Cruchaga S, Perez-Vazquez M, Roman F, Campos J. Molecular basis of rifampicin resistance in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:1011-4.
- Dabernat H, Delmas C, Seguy M, Pelissier R, Faucon G, Bennamani S , et al. Diversity of beta-lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:2208-18.
- Deghmane AE, Hong E, Chehboub S, Terrade A, Falguieres M, Sort M , et al. High diversity of invasive *Haemophilus influenzae* isolates in France and the emergence of resistance to third generation cephalosporins by alteration of *ftsI* gene. *J Infect* 2019; 79:7-14.
- Elliott E, Oosthuizen D, Johnson MM, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance in *Haemophilus influenzae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 52:734-5.
- Faccione D, Lopez-Ruitti P, Vazquez M, Guerriero L, Lucero C, Galletti P , et al. Molecular characterization of a clinical *Haemophilus parainfluenzae* isolate with cefotaxime resistance and decreased susceptibility to fluoroquinolones. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2016; 44:507-9.
- Falla TJ, Crook DW, Brophy LN, Maskell D, Kroll JS, Moxon ER. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2382-6.
- Fonkoua MC, Cunin P, Sorlin P, Musi J, Martin PMV. Les méningites d'étiologie bactérienne à Yaoundé (Cameroun) en 1999-2000. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 2001; 94:300-3.
- Francisco AP, Bugalho M, Ramirez M, Carrico JA. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics* 2009; 10:152.
- Gervaix A, Taguebue J, Bescher BN, Corbeil J, Raymond F, Alcoba G , et al. Bacterial meningitis and pneumococcal serotype distribution in children in cameroon. *Pediatr Infect Dis J* 2012; 31:1084-7.

- Giufre M, Fabiani M, Cardines R, Riccardo F, Caporali MG, D'Ancona F , et al. Increasing trend in invasive non-typeable *Haemophilus influenzae* disease and molecular characterization of the isolates, Italy, 2012-2016. *Vaccine* 2018; 36:6615-22.
- Goldstein BP. Resistance to rifampicin: a review. *The Journal of antibiotics* 2014; 67:625-30.
- Hong E, Bakhalek Y, Taha MK. Identification of *Neisseria meningitidis* by MALDI-TOF MS may not be reliable. *Clin Microbiol Infect* 2019; 25:717-22.
- Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 2006; 23:254-67.
- Jolley KA, Maiden MC. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics* 2010; 11:595.
- Kacou-Ndouba A, Revathi G, Mwathi P, Seck A, Diop A, Kabedi-Bajani MJ , et al. Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2011-14 in the Democratic Republic of Congo, Ivory Coast, Republic of Senegal and Kenya. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2016; 71 Suppl 1:i21-i31.
- Kuvat N, Nazik H, Berkiten R, Ongen B. Tem-1 and Rob-1 Presence and Antimicrobial Resistance in *Haemophilus Influenzae* Strains, Istanbul, Turkey. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2015; 46:254-61.
- Lee YC, Kelly DF, Yu LM, Slack MP, Booy R, Heath PT , et al. *Haemophilus influenzae* type b vaccine failure in children is associated with inadequate production of high-quality antibody. *Clin Infect Dis* 2008; 46:186-92.
- Livrelli V, Peduzzi J, Joly B. Sequence and molecular characterization of the ROB-1 beta-lactamase gene from *Pasteurella haemolytica*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:242-51.
- Lulitanond A, Chanawong A, Pienthaweechai K, Sribenjalux P, Tavichakorntrakool R, Wilailuckana C , et al. Prevalence of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolated from patients of a teaching hospital in Thailand. *Jpn J Infect Dis* 2012; 65:122-5.
- Maddi S, Kolsun U, Jackson S, Barraclough R, Maschera B, Simpson KD , et al. Ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* from COPD patients in the UK. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* 2017; 12:1507-18.
- Marti S, Puig C, de la Campa AG, Tirado-Velez JM, Tubau F, Domenech A , et al. Identification of *Haemophilus haemolyticus* in clinical samples and characterization of their mechanisms of antimicrobial resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2016; 71:80-4.
- Marti S, Puig C, de la Campa AG, Tirado-Velez JM, Tubau F, Domenech A , et al. Identification of *Haemophilus haemolyticus* in clinical samples and characterization of their mechanisms of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2015; 71:80-4.
- Massenet D, Tapindjin-Gake M. Positive effect of the introduction of *Haemophilus influenzae* type b vaccination in the expanded program on immunization in Cameroon. *Vaccine* 2010; 28:6404-5.
- Mulu W, Yizengaw E, Alemu M, Mekonnen D, Hailu D, Ketemaw K , et al. Pharyngeal colonization and drug resistance profiles of *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Haemophilus influenzae* among HIV infected children attending ART Clinic of Felegehiwot Referral Hospital, Ethiopia. *PloS one* 2018; 13:e0196722-e.
- Murphy TF, Kirkham C, Jones MM, Sethi S, Kong Y, Pettigrew MM. Expression of IgA Proteases by *Haemophilus influenzae* in the Respiratory Tract of Adults With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The Journal of infectious diseases* 2015; 212:1798-805.

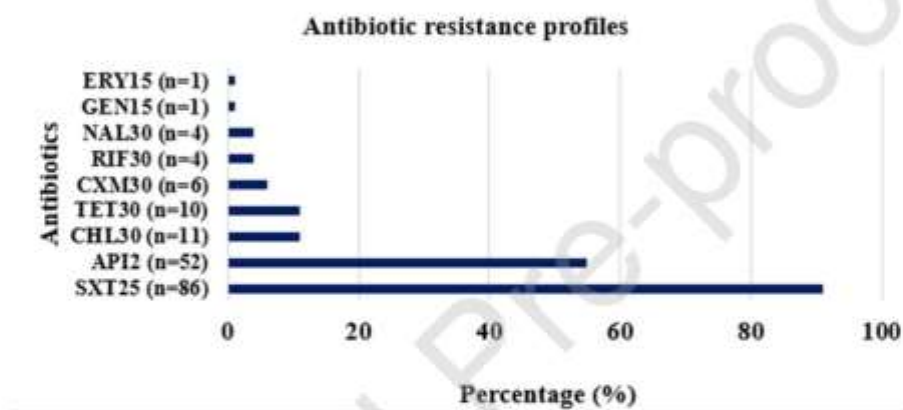
- Nascimento M, Sousa A, Ramirez M, Francisco AP, Carrico JA, Vaz C. PHYLOViZ 2.0: providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. *Bioinformatics* 2017; 33:128-9.
- Ndiaye AG, Boye CS, Hounkponou E, Gueye FB, Badiane A. Antimicrobial susceptibility of select respiratory tract pathogens in Dakar, Senegal. *Journal of infection in developing countries* 2009; 3:660-6.
- Ndip RN, Ntiege EA, Ndip LM, Nkwelang G, Akoachere JF, Akenji TN. Antimicrobial resistance of bacterial agents of the upper respiratory tract of school children in Buea, Cameroon. *J Health Popul Nutr* 2008; 26:397-404.
- Pefura Yone EW, Kuaban C, Leonie S, Afane Ze E. [Nontuberculous purulent pleural effusion in adults in Yaounde, Cameroon]. *Medecine et sante tropicales* 2012; 22:35-9.
- Pérez-Trallero E, Martín-Herrero JE, Mazón A, García-Delafuente C, Robles P, Iriarte V , et al. Antimicrobial Resistance among Respiratory Pathogens in Spain: Latest Data and Changes over 11 Years (1996-1997 to 2006-2007). *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2010; 54:2953-9.
- Pickering J, Richmond PC, Kirkham LA. Molecular tools for differentiation of non-typeable *Haemophilus influenzae* from *Haemophilus haemolyticus*. *Front Microbiol* 2014; 5:664.
- Puig C, Calatayud L, Marti S, Tubau F, Garcia-Vidal C, Carratala J , et al. Molecular epidemiology of nontypeable *Haemophilus influenzae* causing community-acquired pneumonia in adults. *PLoS one* 2013; 8:e82515.
- Puig C, Domenech A, Garmendia J, Langereis JD, Mayer P, Calatayud L , et al. Increased biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates from patients with invasive disease or otitis media versus strains recovered from cases of respiratory infections. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80:7088-95.
- Puig C, Tirado-Velez JM, Calatayud L, Tubau F, Garmendia J, Ardanuy C , et al. Molecular characterization of fluoroquinolone resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59:461-6.
- Purohit P, Al-Obaid IaA, Omar NGA-D. The first reported case of possible *Haemophilus influenzae* type b vaccine failure from Kuwait and literature-review. *Journal of infection and public health* 2014; 7:99-105.
- Rodriguez-Martinez JM, Lopez-Hernandez I, Pascual A. Molecular characterization of high-level fluoroquinolone resistance in a clinical isolate of *Haemophilus parainfluenzae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2011; 66:673-5.
- Schumacher SK, Marchant CD, Loughlin AM, Bouchet V, Stevenson A, Pelton SI. Prevalence and genetic diversity of nontypeable *Haemophilus influenzae* in the respiratory tract of infants and primary caregivers. *The Pediatric infectious disease journal* 2012; 31:145-9.
- Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS microbiology reviews* 2004; 28:519-42.
- Setchanova LP, Kostyanov T, Markovska R, Miloshev G, Mitov IG. Serotypes, antimicrobial susceptibility, and beta-lactam resistance mechanisms of clinical *Haemophilus influenzae* isolates from Bulgaria in a pre-vaccination period. *Scandinavian journal of infectious diseases* 2013; 45:81-7.
- Seyama S, Wajima T, Yanagisawa Y, Nakaminami H, Ushio M, Fujii T , et al. Rise in *Haemophilus influenzae* With Reduced Quinolone Susceptibility and Development of a Simple Screening Method. *The Pediatric infectious disease journal* 2017; 36:263-6.
- Shoji H, Shirakura T, Fukuchi K, Takuma T, Hanaki H, Tanaka K , et al. A molecular analysis of quinolone-resistant *Haemophilus influenzae*: Validation of the mutations in Quinolone Resistance-Determining Regions. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2014; 20:250-5.



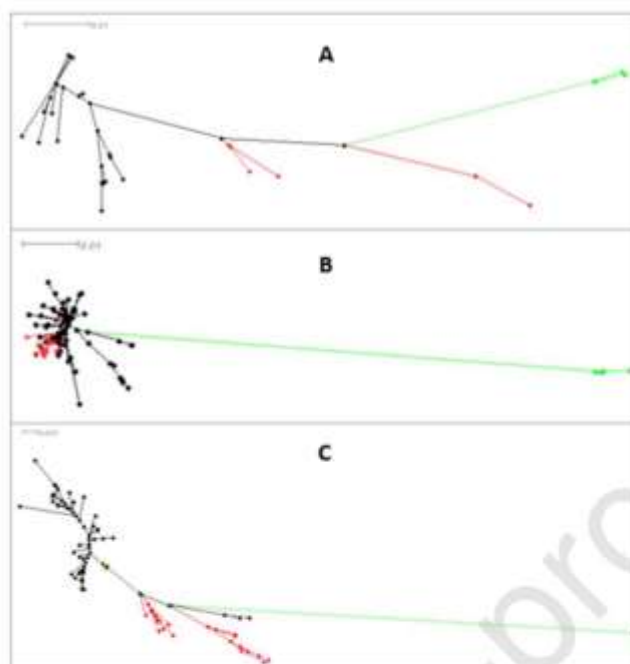
- Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial Resistance in *Haemophilus influenzae*. Clin Microbiol Rev 2007; 20:368-89.
- van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2007; 13 Suppl 3:1-46.
- WHO. WHO position paper on *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. (Replaces WHO position paper on Hib vaccines previously published in the Weekly Epidemiological Record. . Wkly Epidemiol Rec 2006; 81:445-52.
- Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NC. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. Current opinion in microbiology 2005; 8:525-33.
- Winslow CE, Broadhurst J, Buchanan RE, Krumwiede C, Rogers LA, Smith GH. The Families and Genera of the Bacteria: Preliminary Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. J Bacteriol 1917; 2:505-66.
- Witherden EA, Tristram SG. Prevalence and mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance in *Haemophilus haemolyticus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2013; 68:1049-53.
- Zhang B, Kunde D, Tristram S. *Haemophilus haemolyticus* is infrequently misidentified as *Haemophilus influenzae* in diagnostic specimens in Australia. Diagn Microbiol Infect Dis 2014; 80:272-3.

### Legends of figures

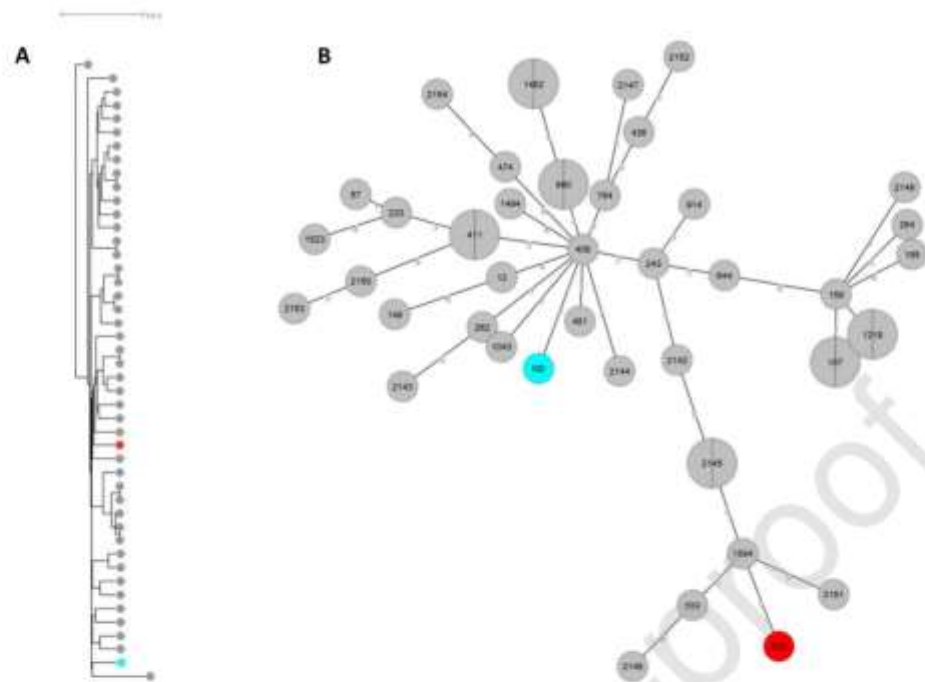
**Figure 1.** Antibiotic resistance profile of *Haemophilus* isolates. n: number of resistant isolates; API2: Ampicillin 2 $\mu$ g; CHL30: Chloramphenicol 30  $\mu$ g; NAL30: Nalidixic acid 30 $\mu$ g; CXM30: Cefuroxime 30  $\mu$ g;SXT25: Co-trimoxazole 25  $\mu$ g; GEN15: Gentamicin 15 $\mu$ g; TET30: Tetracycline 30  $\mu$ g; RIF30 Rifampicin 30 $\mu$ g; ERY15: Erythromycin 15  $\mu$ g.



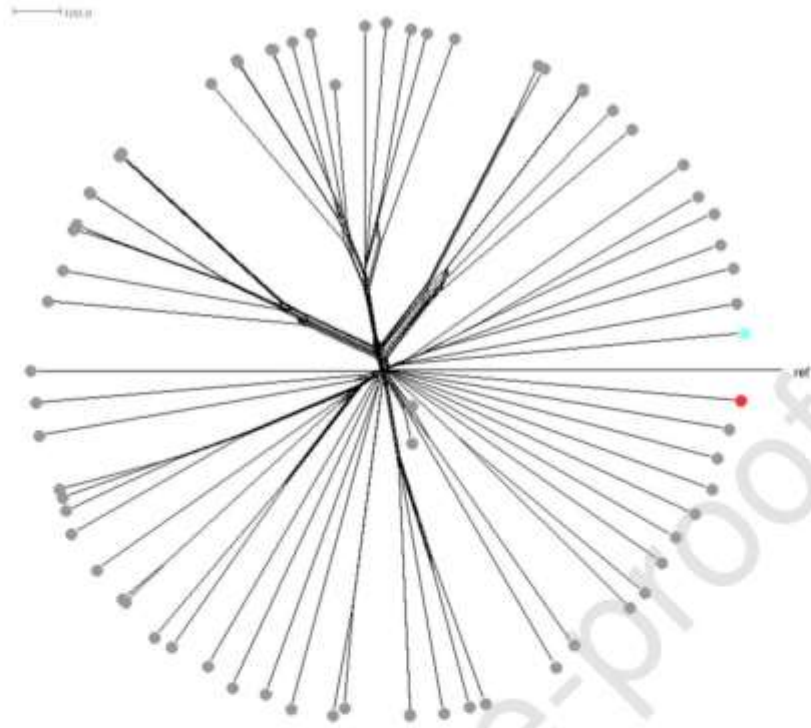
**Figure 2.** Neighbor-Net SplitsTree graphs generated using SplitsTree4 to visualize trees of *Haemophilus* species isolated from patients with respiratory infections. It shows the genetic relatedness of *Haemophilus* species based on three genes: *ftsI* (A), *gyrA* (B) and *rpoB*(C). Black color indicates *Haemophilus influenzae*; Green color indicates *Haemophilus parainfluenzae*; red color indicates *Haemophilus haemolyticus*.



**Figure 3.** (A) UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) tree of 46 *H. influenzae* sequences constructed from the seven MLST loci. The linkage distance shows the number of nucleotide substitutions. (B) A grapeTree based on the 7 MLST loci from the 46 genome of isolates with complete MLST data. The nodes were drawn to scale according to the number of isolates (indicated by the pie chart) of each node. The branches between the nodes were drawn to scale and the number of different alleles between the two connected nodes is indicated on the branch. The grey node corresponded to non-typeable isolates (HiNT). The two typeable isolates were indicated in red (serotype b) and cyan (serotype f).



**Figure 4.** A neighbour-network based on allelic profiles all the 73 isolates compared to the annotated loci of the reference strain Rd KW20 (ref). Individual isolate is represented by circles and the colour of the circle indicates the serotype of the corresponding isolate. The non-typable isolates (HiNT) were represented by grey circle. The two typeable isolates were indicated in red circle (serotype b) and cyan circle (serotype f).



**Table 1. Characteristics of the study population**

Patient characteristics	N=95	JH	EHC	Hib vaccine coverage (%)
Gender				
Male	36	10	26	28 (77.8)
Female	59	15	44	44 (74.6)
Median age (IQR)	3.2 (1.1-10.6)	37.7 (27.4-54.7)	2.4 (0.8-4.1)	/
Age group (years)				
< 5	66	2	64	65 (98.5)
5-15	8	2	6	5 (62.5)
>15	21	21	0	0
Clinical samples				
Nasopharyngeal swab	73	3	70	/
Pleural fluid	2	2	0	/
Bronchioalveolar aspirate	5	5	0	/
Sputum	15	15	0	/
Antibiotic treatment	52	18	34	/

/: Not applicable; JH: Jamot Hospital; EHC: Essos Hospital Centre

**Table 2. Identification of *Haemophilus* isolates following methods**

	<i>H. influenzae</i> (%)	<i>H. Haemolyticus</i> (%)	<i>H. parainfluenzae</i> (%)	<i>H. segnis</i> (%)	<i>A. porcitosillarum</i> (%)	<i>H. parahaemolyticus</i> (%)
growth factors	80 (84.2)	0	15 (15.8)	0	0	0
PCR	73 (76.8)	Not applicable	Not applicable	Not applicable	Not applicable	Not applicable
MALDI-TOF	74 (77.9)	14 (14.7)	6 (6.3)	0	0	1 (1.1)
rMLST	73 (76.8)	14 (14.7)	0	8 (8.4)	0	0
<i>rpoB</i> BLAST	72 (75.8)	16 (16.8)	6 (6.3)	0	1 (1.1)	0
Whole genome BLAST	73 (76.8)	15 (15.8)	6 (6.3)	0	1 (1.1)	0

Table 3. Mutations in part of PBP3 among 40 ampicillin resistant *Haemophilus* isolates

<i>Haemophilus</i> species	Number of isolates	<i>fstI</i>	<i>blaTEM-I</i>	<i>fstI</i> group	Amino acid substitutions
<i>Haemophilus influenzae</i>	2	2	0	III	D350N; M377I; A502V; N526K
	3	6, 55, 127	0	II	D350N
	4	43	0	III	D350N; G490E; N526K
	2	97	0	II	A502V; R517H
	1	119	0	III	D350N; M377I; G490E; A502V; N526K
	2	120	0	III	D350N; G490E; A502V; N526K
	1	121	0	II	G490E; N526K
	1	122	0	III	I449V; N526K
	1	123	0	II	A437S
	3	126	3	II	A502S
	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	8	/	1	/
1		/	0	/	F332L; K344R; I348V; D350N; T352G; S353A; K355T; L356V; M377I; P392A; S406G; P408S ; V418A ; A437S; V461I; I519L
4		/	0	/	K344R; D350N; T352G; K355T; L356V; M377I
1		/	0	/	K344R; D350N; T352G; K355T; L356V; A368V; M377I
1		/	0	/	K344R; D350N; T352G; K355T; L356V; M377I; K486Q; G490E
2		/	0	/	V342A K344R I348V D350N T352G K355T L356V A368P M377I S406G P408D D410E V418R I420V A444S V461I K477Q I488V I491M
2		/	0	/	V342A; K344R; I348V; D350N; T352G; K355T; L356V; A368P; M377I; E398D; S406G; P408D; D410E; V418R; I420V; A444S; V461I; K477Q; I491M
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	2	/	0	/	V342A; K344R; I348V; D350N; T352G; K355T; L356V; A368P; M377I; E398D; S406G; P408D; D410E; V418R; I420V; A444S; V461I; K477Q; I491M



1 / 0 / V342A; K344R; I348V;  
 D350N; T352G;  
 K355T; L356V;  
 A368P; M377I;  
 S406G; P408D; D410E;  
 V418R; I420V;  
 A444S; V461I;  
 K477Q; I491M

/: Not applicable; A: Alanine; D: Aspartate; E: Glutamate; F: Phenylalanine; G: Glycine; H: Histidine; I: Isoleucine; K: Lysine; L: Leucine; M: Methionine; N: Asparagine; P: Proline; Q: Glutamine; R: Arginine; S: Serine; T: Threonine; V: Valine; *bla*TEM-1:  $\beta$ -lactamase TEM-1.

**Table 4. Inhibitory diameters, MICs of fluoroquinolones and the amino acid mutations of the QRDRs of *gyrA* and *parC* in the *Haemophilus* isolates**

Isolates	<i>Haemophilus</i> species	Disk diffusion inhibitory zone diameter (mm)		MIC ( $\mu$ g/ml)	Mutation(s) in QRDR	
		NAL	CIP	CIP	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>
108-13Cr	<i>H. parainfluenzae</i>	10	14	4	S84L, D88Y	S84F, D88Y
173-AN*	<i>H. haemolyticus</i>	31	34	0.19	S84L	None
178-AN	<i>H. influenzae</i>	6	14	2	S84L, D88N	S84I
283-CN*	<i>H. influenzae</i>	33	35	0.012	S84L	None
326-CN	<i>H. influenzae</i>	15	25	1	S84L	S84R

\*Susceptible *Haemophilus* isolates with amino acid substitutions in *gyrA* gene  
 D: Aspartate; F: Phenylalanine; I: Isoleucine; L: Leucine; N: Asparagine; R: Arginine; S: Serine; Y: Tyrosine.

**Table 5. Inhibitory diameters, MICs of rifampicin and the amino acid mutations of the *rpoB* gene in *Haemophilus* isolates.**

Isolates	<i>Haemophilus</i> species	RIF30 inhibition zone (mm)	RIF, MIC ( $\mu$ g/ml)	<i>rpoB</i> mutation
080-6Cr	<i>H. parainfluenzae</i>	17	32	F506S, N518D, T724I, L979V
117-9Cr	<i>H. parainfluenzae</i>	17	2	V634I, L979V
157-Acr	<i>H. parainfluenzae</i>	11	32	D516N, T724I, L979V
340-AN	<i>H. haemolyticus</i>	16	1.5	No mutation

RIF: Rifampicin; MIC: Minimal inhibitory concentration; D: Aspartate; F: Phenylalanine; I: Isoleucine; N: Asparagine, S: Serine; T: Threonine; V: Valine