

Effacité d'une technique de réaction de polymérisation en chaîne (seminested et multiplex) pour l'identification des trois principales espèces bactériennes responsables de méningites au Burkina Faso

Effectiveness of a polymerase chain reaction using seminested and multiplex strategy for the identification of the three main bacteria responsible for meningitis in Burkina Faso

A. Nikiéma · L. Toé · G. Adjami · R. Ouédraogo Traoré

Reçu le 10 décembre 2008 ; accepté le 17 mars 2009

© Société de pathologie exotique et Springer-Verlag France 2010

Résumé Une étude prospective de neuf mois (1^{er} août 2006 au 30 avril 2007) a été réalisée au Multi Disease Surveillance Centre (MDSC) de Ouagadougou sur 214 échantillons de liquide céphalorachidien (LCR) provenant de cas suspects de méningites bactériennes. L'objectif de l'étude était d'évaluer la performance d'une technique de détection simultanée de *Neisseria meningitidis*, de *Streptococcus sp.* et de *Haemophilus influenzae* par une *polymerase chain reaction* (PCR) en multiplex, utilisant une stratégie de seminested. Sur les 214 échantillons analysés par PCR et par culture, les taux globaux de confirmation des cas suspects de méningites étaient de 64 % par la PCR et 40,1 % par la culture bactérienne ($p = 2 \times 10^{-6}$). En prenant la culture comme référence, la technique PCR a, de façon globale, une sensibilité (Se) de 98,8 % et une spécificité (Sp) de 59,4 %. La Se de la PCR était respectivement de 100, 97,3 et 100 % pour *N. meningitidis*, pour *Streptococcus sp.* et pour *H. influenzae*, avec des Sp respectives de 70, 93,2 et 97,2 %. En conclusion, la technique de seminested PCR est une technique sensible et peut être implémentée dans les laboratoires de référence dans

le but d'une surveillance microbiologique plus exhaustive des méningites bactériennes.

Mots clés *Polymerase chain reaction* (PCR) · Méningite bactérienne · *Neisseria meningitidis* · *Streptococcus sp.* · *Haemophilus influenzae* · Boussé · Ouagadougou · Burkina Faso · Afrique intertropicale

Abstract A prospective study (from August 2006 to April 2007) was carried out with 214 cerebrospinal fluid samples with suspicion of bacterial meningitis. The aim of the study was to assess the effectiveness of the simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus sp.* and *Haemophilus influenzae* using seminested polymerase chain reaction strategy. Among the 214 samples tested by both PCR and culture, the overall confirmation rate was 64% for PCR and 40.1% for culture ($P = 2 \times 10^{-6}$). Taking culture method as the standard reference, the overall sensitivity of PCR was 98.8% and specificity, 59.4%. The sensitivity of PCR was 100, 97.3 and 100% respectively for *N. meningitidis*, *Streptococcus sp.* and *H. influenzae* with respective specificities of 70, 93.2 and 97.2%. In conclusion, the seminested PCR strategy is a sensitive method and it can be implemented in the reference public health laboratories for an exhaustive microbiological surveillance of bacterial meningitis.

Keywords Polymerase chain reaction (PCR) · Bacterial meningitis · *Neisseria meningitidis* · *Streptococcus sp.* · *Haemophilus influenzae* · Boussé · Ouagadougou · Burkina Faso · Sub Saharan Africa

Introduction

Les méningites bactériennes aiguës, dues principalement à *Neisseria meningitidis*, à *Haemophilus influenzae* et à

A. Nikiéma (✉) · R. Ouédraogo Traoré
Université de Ouagadougou, 3, BP 7021 Ouagadougou 03,
Burkina Faso
e-mail : abdouniki@yahoo.fr

A. Nikiéma
Direction des laboratoires, ministère de la Santé,
Ouagadougou, Burkina Faso

L. Toé · G. Adjami
WHO Multi Disease Surveillance Centre (MDSC),
Ouagadougou, Burkina Faso

R. Ouédraogo Traoré
CHU pédiatrique Charles-De-Gaulle,
Ouagadougou, Burkina Faso

Streptococcus pneumoniae, constituent toujours un problème majeur de santé publique, particulièrement dans les pays de la ceinture africaine de la méningite, dont le Burkina Faso qui fait face, chaque année, à de milliers de cas [12]. Les méningites bactériennes aiguës constituent une urgence. L'identification rapide et précise de l'agent étiologique en cause est importante pour une prise en charge thérapeutique adéquate et l'adoption d'une stratégie vaccinale adaptée [15,16].

Le système de surveillance est basé sur une classification des cas selon des orientations cliniques et des examens de laboratoire. Les cas suspects sont détectés sur la base d'une symptomatologie incluant la survenue brutale de fièvre et la présence de signes méningés. Lorsque ces examens cliniques sont confortés par l'isolement du germe par culture ou par un test d'agglutination au latex positif, on parle de cas confirmés. Le plus souvent, la culture n'est pas faite ou n'est pas interprétable. Les suspicions cliniques sont aussi renforcées par un examen macroscopique de l'aspect du liquide céphalorachidien (LCR), une microscopie après coloration de Gram, mais ce sont des examens peu spécifiques et peu sensibles [3,4,6,10]. On parlera alors de cas probables.

Ainsi, la culture apparaît très importante pour la confirmation du diagnostic étiologique de la méningite. Toutefois, elle prend beaucoup de temps (12 à 24 heures) et exige une viabilité du germe. L'isolement de l'agent pathogène peut échouer, suite à l'administration d'une antibiothérapie préalable ou à une mauvaise conservation du LCR [4,6,10].

Dans un tel contexte, un nouveau test moins contraignant que la culture et permettant un diagnostic étiologique rapide et fiable des méningites bactériennes, en complément du panel existant, permettrait d'accroître sensiblement le nombre de cas confirmés.

Depuis quelques années, les techniques de biologie moléculaire, telles que la PCR, constituent une avancée technologique importante dans le domaine de la détection rapide de diverses bactéries dans divers types d'échantillons [1,5,10,11,17,19].

Cependant, des limites objectives sont associées à l'utilisation de la PCR. Il s'agit des résultats faussement positifs liés aux contaminations ou faussement négatifs liés à des échecs de la PCR du fait d'inhibiteurs présents dans le LCR [9,10,13].

Malgré les limites objectives associées à la PCR, de nombreux tests PCR sont utilisés pour le diagnostic des principales espèces bactériennes responsables des méningites aiguës [1,9,11,13,20,21].

En 1994, Radström et al. ont décrit une technique de nested PCR pour l'identification simultanée de *N. meningitidis*, de *H. influenzae* et de *Streptococcus sp.* dans le LCR [14].

Cette étude a montré qu'il était possible de détecter simultanément trois espèces majoritairement responsables de méningites.

Cette technologie de la PCR présente potentiellement un intérêt pour la confirmation des cas suspects de méningites au Burkina Faso et pourrait, in fine, améliorer le système de surveillance. La présente étude a été menée pour évaluer, dans le contexte épidémiologique du Burkina, l'efficacité d'une PCR multiplex pour la détection simultanée de *N. meningitidis*, de *H. influenzae* et de *Streptococcus sp.*

Matériels et méthodes

Nous avons réalisé une étude prospective sur des cas suspects de méningites bactériennes provenant de cinq formations sanitaires, dont trois centres médicaux périphériques (Pissy, Paul-VI et Boussé) et deux centres hospitaliers universitaires (le CHU Yalgado-Ouédraogo et le CHU pédiatrique Charles-de-Gaulle). Ces formations sont situées dans la ville de Ouagadougou, à l'exception du centre médical de Boussé, situé à environ 50 km de Ouagadougou.

Toute personne avec survenue brutale de fièvre (supérieure à 38,5 °C rectale ou 38,0 °C axillaire), une raideur de la nuque, une altération de la conscience ou tout autre signe méningé a été considérée comme un cas suspect et a fait l'objet d'un prélèvement du LCR. Selon la quantité prélevée, 1 à 2 ml de LCR ont été introduits dans les cryotubes pour la PCR. Au niveau des formations sanitaires périphériques, 0,5 à 1 ml de LCR a été inoculé dans le milieu de transport transisolate (TI) en vue de la culture bactérienne.

L'examen cytologique, l'examen microscopique après coloration de Gram et le test d'agglutination au latex (avec le kit Pastorex, Biorad) ont été réalisés dans les laboratoires des sites de prélèvement.

La culture bactérienne a été réalisée dans les deux CHU, tandis que la PCR a été effectuée au laboratoire de biologie moléculaire du Multi Disease Surveillance Center (MDSC) de l'Organisation mondiale de la santé à Ouagadougou.

Les échantillons de LCR destinés à la culture bactérienne ont été acheminés (à partir des CMA) au niveau des laboratoires des CHU, à l'aide des milieux de transport (TI).

Le diagnostic de confirmation de référence est basé sur l'isolement et l'identification de l'agent étiologique par culture.

Pour la PCR, l'extraction de l'ADN bactérien à partir du LCR et son amplification ont été réalisées selon le protocole décrit par Radström et al., utilisant une technique de seminested et de multiplex PCR pour l'identification simultanée de *N. meningitidis*, de *H. influenzae* et de *Streptococcus sp.*

La technique utilisée est basée sur l'amplification du gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomique bactérien.

La première réaction consiste en une amplification avec les amorces universelles externes U3 et Ru8 suivantes :

- *U3* : 5'-AAC T(A/C)C GTG CCA GCA GCC GCG GTA A-3' ;
- *Ru8* : 5'-AAG GAG GTG ATC CA(A/G) CCG CA(G/C) (G/C)TT C-3'.

Cette première réaction génère un amplicon non spécifique d'une espèce bactérienne donnée présente dans l'échantillon de LCR.

La seconde réaction combine trois amorces spécifiques, NM, STR, HI (pour respectivement *N. meningitidis*, *Streptococcus sp.* et *H. influenzae*) suivantes et l'amorce universelle Ru8.

- *NM* : 5'-TGT TGG GCA ACC TGA TTG-3' ;
- *STR* : 5'-GTA CAA CGA GTC GCA AGC-3' ;
- *HI* : 5'-CCT AAG AAG AGC TCA GAG-3'.

Cette seconde réaction génère des amplicons spécifiques de chaque espèce qui se différencient par leurs poids moléculaires. Des échantillons utilisés comme témoins positifs ou témoins négatifs sont également amplifiés.

Le mélange réactionnel (Mix) pour la première réaction était constitué, pour chaque échantillon, de : 5 µl de tampon PCR 10X itrogen, 1,5 µl de MgCl₂ 50 µM, 2,5 µl d'amorce U3 10 µM, 2,5 µl d'amorce Ru8 10 µM, 5 µl de dNTP Mix 2 mM, 0,5 µl de l'enzyme Taq polymérase 5 U/µl, 28 µl d'eau stérile.

Dans cette première réaction, 5 µl d'extrait d'ADN (LCR) sont ajoutés au Mix. Le volume final pour la réaction est de 50 µl.

L'extraction de l'ADN bactérien a été réalisée par chauffage du LCR dans un bain-marie sec à 95 °C pendant dix minutes, suivi d'une centrifugation à 14 000 tours/minute pendant cinq minutes. Le surnageant obtenu après la centrifugation est utilisé comme source d'ADN matrice pour la réaction PCR.

L'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur PeqLab Advanced Primus 96. Le programme d'amplification a comporté une phase de dénaturation initiale à 94 °C pendant cinq minutes, suivie de 28 cycles de réaction (comprenant chacun une phase de dénaturation à 94 °C pendant une minute, une phase d'hybridation à 54 °C pendant une minute et une phase de synthèse à 72 °C pendant deux minutes) et une phase terminale à 72 °C pendant deux minutes.

Pour la seconde réaction, le Mix était constitué, pour chaque échantillon, de : 5 µl de tampon PCR 10X itrogen, 1,5 µl de MgCl₂ 50 µM, 2 µl d'amorce NM 10 µM, 2 µl d'amorce STR 10 µM, 2 µl d'amorce HI 10 µM, 2 µl d'amorce Ru8 10 µM, 5 µl de dNTP Mix 2 mM, 0,5 µl de l'enzyme Taq polymérase 5 U/µl, 25 µl d'eau stérile.

Pour la seconde réaction, 5 µl du produit de la première réaction ont été ajoutés au Mix.

La seconde amplification a été réalisée dans les mêmes conditions que la première, mais a comporté 25 cycles, au lieu de 28 comme dans la première.

La détection des fragments amplifiés s'est faite après migration électrophorétique de 20 µl du produit de la seconde PCR sur gel d'agarose 2 %, auquel on a incorporé du bromure d'éthidium. Les fragments ont été visualisés à l'aide d'un transilluminateur UV de gel.

Les bandes spécifiques à *N. meningitidis* (700 bp), à *H. influenzae* (500 bp) et à *Streptococcus sp.* (300 bp) ont été identifiées par comparaison aux témoins respectifs et à des marqueurs de poids moléculaire.

Afin d'évaluer la performance de la technique PCR dans la détection et l'identification de ces trois principaux germes, nous avons calculé le taux de confirmation, la sensibilité (Se) et la spécificité (Sp) de cette technique.

Les performances ont été calculées en prenant comme référence les résultats de la culture.

Les données recueillies ont été saisies et analysées sur micro-ordinateur avec le logiciel Épi Info 2000™ (version 3.3).

Un test du Chi² a été utilisé avec un seuil de signification *p* inférieur à 0,05 pour la comparaison statistique des résultats.

Résultats

Au cours des neuf mois de l'étude, nous avons analysé 214 échantillons de LCR provenant de cas suspects de méningites. Parmi 210 échantillons qui ont bénéficié d'une analyse cytologique quantitative, 151 échantillons, soit 71,9 %, avaient un nombre de leucocytes supérieur ou égal à 50/mm³ (Tableau 1). Sur 135 échantillons qui ont fait l'objet d'une étude cytologique qualitative, 117 échantillons, soit 86,7 %, avaient un pourcentage de polynucléaires neutrophiles supérieur à 50 % (Tableau 2). L'examen microscopique après coloration de Gram réalisé sur 211 échantillons a permis de noter la présence de germes dans 116 échantillons, soit 55 % (Tableau 3).

Sur les 214 échantillons, la culture bactérienne a permis l'isolement et l'identification de bactéries dans 86 échantillons, soit 40,1 % de taux de confirmation. La PCR réalisée sur

Tableau 1 Répartition des échantillons de LCR selon la cytologie quantitative

Cytologie quantitative (leucocytes/mm ³)	Nombre d'échantillons	Pourcentage
< 5	29	13,8
[5-50[30	14,3
≥ 50	151	71,9
Total	210	100

les mêmes échantillons a permis d'identifier 137 échantillons positifs, soit un taux de confirmation de 64 %. Au total, 52 échantillons ont été confirmés uniquement par PCR, soit 60,4 % de l'ensemble des cas confirmés (Tableau 4).

Le test d'agglutination au latex, réalisé sur 93 échantillons, a donné un taux de confirmation de 51,6 % (Tableau 3).

Parmi les 86 cas de méningites confirmés par la culture, 44 cas (51,16 %) étaient dus à *N. meningitidis* A, 37 cas (43 %) à *S. pneumoniae* (36 cas) ou à *Streptococcus sp.* (un cas) et trois cas (3,5 %) à *H. influenzae b* (Tableau 5).

Tableau 2 Répartition des échantillons de LCR selon la cytologie qualitative

Cytologie qualitative	Nombre d'échantillons	Pourcentage
Polynucléaires neutrophiles > 50 %	117	86,7
Lymphocytes > 50 %	13	9,6
Polynucléaires neutrophiles = 50 %	05	3,7
Lymphocytes = 50 %		
Total	135	100

Les deux autres espèces identifiées par culture étaient *Salmonella sp.* et *Staphylococcus aureus*.

La PCR a identifié correctement tous les cas de *N. meningitidis* et de *H. influenzae*, mais n'a pas pu identifier un cas de *S. pneumoniae*.

La Se et la Sp de la PCR par rapport à la culture de façon globale sont respectivement de 98,8 et 59,46 %. La PCR a été positive dans 52 cas (40,6 %) où la culture était négative (Tableau 6).

La Se et la Sp de la PCR par rapport à la culture pour l'identification de *N. meningitidis*, de *Streptococcus sp.* et de *H. influenzae* sont respectivement de 100 et 78,8 % ; 97,3 et 93,2 % ; 100 et 97,2 % (Tableau 5). Par rapport à la culture et/ou au latex, les Se et les Sp sont respectivement de 98 et 81,2 % ; 95,3 et 97,1 % ; 100 et 98 % (Tableau 7).

Sur 45 cas de tests de latex négatifs, la PCR a été positive dans 21 cas. Cependant, la PCR n'a pu détecter deux cas positifs au latex (Tableau 8). Par rapport à la PCR, la Se et la Sp du test d'agglutination au latex ont été respectivement de 95,8 et 53,3 %.

La Se et la Sp du test d'agglutination au latex par rapport à la culture ont été respectivement de 75,6 et 70,8 % (Tableau 9).

Tableau 3 Résultats de la PCR, de la culture, du test d'agglutination au latex et de la coloration de Gram

Type de test	Résultats des tests		
	Nombre de positif et pourcentage	Nombre de négatif et pourcentage	Total
PCR	137 (64 %)	77 (36 %)	214 (100 %)
Culture	86 (40,1 %)	128 (59,8 %)	214 (100 %)
Latex	48 (51,6 %)	45 (48,4 %)	93 (100 %)
Coloration de Gram	116 (55 %)	95 (45 %)	211 (100 %)

$p = 1,3 \times 10^{-6}$.

Tableau 4 Apport de la PCR dans la confirmation des cas suspects

Nombre total de cas confirmés	Nombre de cas confirmés par culture	Nombre de cas confirmés uniquement par PCR	Amélioration due à la PCR (%)
138	86	52	60,4

$p = 0,002$.

Tableau 5 Répartition des résultats de la PCR en fonction de ceux de la culture pour l'identification de *Neisseria meningitidis*, de *Streptococcus sp.* et de *Haemophilus influenzae*

Résultats PCR	Résultats de la culture					
	N. meningitidis		Streptococcus sp. ^a		H. influenzae	
	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif
Positif	44	36	36	12	3	6
Négatif	00	134	1	165	0	205
	Se = 100 %	Sp = 78,8 %	Se = 97,3 %	Sp = 93,2 %	Se = 100 %	Sp = 97,2 %

^a 36 *S. pneumoniae* et un *Streptococcus sp.*

Tableau 6 Répartition des résultats de la PCR en fonction des résultats de la culture

Résultats PCR	Résultats culture		
	Positif	Négatif	Total
Positif	85	52	137
Négatif	1	76	77
Total	86	128	214
	Se = 98,8 %	Sp = 59,46 %	

Discussion

La surveillance des méningites bactériennes en Afrique en général et au Burkina Faso en particulier est handicapée par un faible taux de confirmation des cas, bien qu'une ponction lombaire soit systématiquement faite sur tous les cas suspects. Ce taux faible s'explique en partie par les contraintes imposées par la culture, le test de référence, exigeant une logistique appropriée pour la conservation et le transport rapide des prélèvements de LCR des centres périphériques vers les laboratoires de référence où s'effectue la confirmation par culture [2,13,16,19]. À cela s'ajoute la faible Se de la culture en cas d'antibiothérapie préalable et, souvent, la densité microbienne dans le LCR qui varie selon l'espèce en cause et la phase de la maladie [17].

Dans notre étude, l'utilisation de la PCR a amélioré le taux de confirmation des cas suspects de méningites de plus de 60 %. Des résultats similaires ont été obtenus dans d'autres pays. Après l'introduction de la détection de méningocoques par PCR, le nombre de cas de maladies invasives à méningocoques confirmés en laboratoire a doublé en Angleterre et au Pays de Galles, alors qu'en Grèce il a plus que triplé par rapport au niveau de base [7,8]. Près du Burkina Faso, au Niger, la PCR a sensiblement amélioré les taux de confirmation [2,18,19].

En termes d'efficacité, notre étude a montré que la PCR multiplex utilisée a permis de confirmer plus de cas suspects de méningites (64 %) que la culture bactérienne (40,1 %). Cela s'explique par le fait que la PCR détectant l'ADN bactérien permet l'identification de germes non viables ou en faible quantité dans le LCR. Cela n'est pas le cas de la culture.

Tableau 8 Répartition des résultats de la PCR en fonction des résultats du test au latex

Résultats PCR	Résultats latex		
	Positif	Négatif	Total
Positif	46	21	67
Négatif	2	24	26
Total	48	45	93
	Se = 95,8 %	Sp = 53,3 %	

Tableau 9 Répartition des résultats du test au latex en fonction des résultats de la culture

Résultats latex	Résultats culture		
	Positif	Négatif	Total
Positif	34	14	48
Négatif	11	34	45
Total	45	48	93
	Se = 75,6 %	Sp = 70,8 %	

Cet avantage de la PCR sur la culture a été rapporté par d'autres auteurs [2,13,18,19].

La forte Se de 98,8 % obtenue avec la PCR démontre que la probabilité de faux-négatifs est faible, et que la PCR améliore de façon significative le taux de confirmation.

L'incapacité de la PCR de détecter un échantillon positif à la culture peut être liée à la présence d'inhibiteurs de PCR. En effet, les échantillons de LCR analysés n'ont pas été préalablement purifiés.

La Sp de 59,4 % de la PCR trouvée est assez faible.

Le nombre élevé de cas négatifs à la culture et positifs à la PCR explique la faible Sp de la technique. Cela met en évidence la limite de l'utilisation de la culture comme méthode de référence dans l'étude.

En prenant la culture comme référence, la technique PCR a une Se supérieure à celle du test d'agglutination au latex. La PCR a également permis de confirmer des cas qui étaient négatifs avec le test au latex.

D'autres études ont démontré la meilleure Se de la PCR par rapport au latex [13].

Tableau 7 Répartition des résultats de la PCR en fonction de ceux de la culture et du latex pour l'identification de *Neisseria meningitidis*, de *Streptococcus sp.* et de *Haemophilus influenzae*

Résultats PCR	Résultats culture et/ou latex					
	N. meningitidis		Streptococcus sp.		H. influenzae	
	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif
Positif	48	31	41	5	05	04
Négatif	01	134	02	166	00	205
	Se = 98 %	Sp = 81,2 %	Se = 95,3 %	Sp = 97,1 %	Se = 100 %	Sp = 98 %

Les résultats obtenus dans cette étude montrent qu'un diagnostic de méningite bactérienne ne doit pas être exclu lorsque la culture ou les autres techniques classiques de laboratoires donnent des résultats négatifs.

L'étude montre également qu'un résultat de PCR négatif ne signifie pas toujours qu'il faut exclure un diagnostic de méningite.

Une réflexion devrait être menée sur les conditions d'utilisation de la PCR dans la surveillance des méningites bactériennes, de même que son utilisation à grande échelle au niveau national. Elle ne peut remplacer la culture, nécessaire aussi bien pour le diagnostic étiologique que pour les tests de Se des souches aux antibiotiques, mais peut constituer un complément utile.

Conclusion

L'étude menée sur l'utilisation de la technique de PCR multiplex pour la détection de *N. meningitidis*, de *Streptococcus sp.* et de *H. influenzae* dans le LCR a permis d'aboutir à des résultats significatifs.

La technique PCR utilisée a permis de confirmer plus de cas suspects de méningites (64 %) que la culture bactérienne (41,1 % de cas suspects confirmés) et le test d'agglutination au latex.

Elle est plus sensible que la technique de coagglutination au latex.

Ces résultats montrent que la technique utilisée est plus sensible que les techniques de bactériologie classique et permet de détecter davantage d'agents étiologiques.

Elle peut avoir un grand intérêt dans le diagnostic et la surveillance microbiologique des méningites bactériennes dans les pays victimes d'épidémies récurrentes de méningite. Elle pourrait être particulièrement utilisée pour l'analyse des échantillons de LCR à culture négative.

Son utilisation devrait être envisagée, car cela permettrait aux autorités sanitaires de mieux documenter les cas de méningite pour un meilleur contrôle de cette maladie.

Conflit d'intérêt : aucun.

Références

1. Backman A, Lantz PG, Radström P, Olcen P (1999) Evaluation of an extended diagnostic PCR assay for detection and verification of the common causes of bacterial meningitis in CSF and other biological samples. *Mol Cell Probes* 13:49–60
2. Chanteau S, Sidikou F, Djibo S, et al (2006) Scaling-up of PCR-based surveillance of bacterial meningitis in the African meningitis belt: indisputable benefits of multiplex PCR assay in Niger. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100:677–80
3. Coovadia YM, Solwa Z (1987) Three latex agglutination tests compared with Gram staining for the detection of bacteria in cerebrospinal fluid. *S Afr Med J* 71:442–4
4. Coovadia YM, Van den ende J, Solwa Z (1989) Comparison of Gram stain and latex agglutination for diagnosis of meningococcal meningitis. *Lancet* 16:677
5. Corless CE, Guiver M, Borrow R, et al (2001) Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol* 39:1553–8
6. Das BK, Gurubacharya RL, Mohapatra TM, Mishra OP (2003) Bacterial antigen detection test in meningitis. *Indian J Pediatr* 70:799–801
7. European Union. Invasive Bacterial Infections Surveillance (EU-IBIS) – Culture-confirmed meningococcal cases by country & year, 1999-2002 (http://www.euibis.org/php/meningo_db_index.htm)
8. European Union. Invasive Bacterial Infections Surveillance (EU-IBIS) – Number of culture-confirmed and/or PCR-confirmed meningococcal disease cases by country & year, 1999-2002. (http://www.euibis.org/php/meningo_db_index.htm)
9. Failace L, Wagner M, Chesky M, et al (2005) Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus sp.* by polymerase chain reaction for the diagnosis of bacterial meningitis. *Arq Neuropsiquiatr* 63:920–4
10. Gray LD, Fedorko DP (1992) Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 5:130–45
11. Hall LMC, Duke B, Urwin G (1995) An approach to the identification of the pathogens of bacterial meningitis by the polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14:1090–4
12. Martet G, Merlin M, Debonne J (1994) Les épidémies de méningites à méningocoques : aspects Africains. *Med Trop* 54: 355–60
13. Parent Du Châtelet I, Traoré Y, Gessner B, et al (2005) Bacterial meningitis in Burkina Faso: surveillance using field-based polymerase chain reaction testing. *Clin Infect Dis* 40:17–25
14. Radström P, Backman A, Qian NY, et al (1994) Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococci* using a seminested PCR strategy. *J Clin Microbiol* 32:2738–44
15. Reinert P (2003) Méningites purulentes chez l'enfant : particularités dans les pays en développement. *Med Trop* 63:481–5
16. Sanou I (2004) Étude des méningites bactériennes en phases épidémiques et interépidémiques au Burkina Faso de 2000 à 2003. Thèse de doctorat unique, université de Ouagadougou (Burkina Faso), p. 165
17. Saruta K, Matsunaga T, Kono M, et al (1997) Simultaneous detection of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by nested PCR amplification from cerebrospinal fluid samples. *FEMS Immunol Med Microbiol* 19:151–7
18. Sidikou F, Djibo S, Taha MK (2003) Enhancement of the surveillance of bacterial meningitis in remote areas in Niger: relevance of PCR assay. *Emerg Infect Dis* 9:486–8
19. Sidikou F, Djibo S, Taha MK, et al (2003) Polymerase chain reaction assay and bacterial meningitis surveillance in remote areas, Niger. *Emerg Infect Dis* 9:1486–8
20. Taha MK (2000) Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 38:855–7
21. Yamamoto Y (2002) PCR in diagnosis of infection: detection of bacteria in cerebrospinal fluids. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:508–14