

## Etude des *Neisseria meningitidis* isolés en République du Mali en 1970

V. BURIAN,<sup>1</sup> Y. FOFANA<sup>2</sup> & O. SOW<sup>3</sup>

*Au cours du programme de surveillance des infections à méningocoques, réalisé en Afrique sous les auspices de l'OMS en République du Mali, on a effectué des sondages bactériologiques. Au cours des mois de janvier à mai 1970, on a examiné 2581 sujets pour savoir s'ils étaient porteurs de Neisseria meningitidis.*

*Parmi les souches isolées chez les porteurs, le sérotype A a été identifié dans 27 % des cas, le sérotype B dans 8,8 % et le sérotype C dans 1,3 %. Pour la première fois en Afrique, on a isolé le sérotype X et le sérotype Y. Le sérotype X représentait 8,2 % et le sérotype Y 3,9 % de toutes les souches isolées. Sur des malades atteints de méningite cérébro-spinale, on n'a isolé que le sérotype A. Parmi les souches isolées, il y avait une résistance sérieuse aux sulfamides.*

Au cours des mois de janvier à mai 1970, qui est la période épidémique en République du Mali, on a fait des sondages bactériologiques. Le but de cette étude était de définir quels types sérologiques du méningocoque circulaient parmi la population et surtout de se rendre compte de l'état de résistance aux sulfamides et aux antibiotiques.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### *Les populations à sonder*

- Les enfants des écoles situées dans des quartiers différents à Bamako et dans la ville de Koulikoro;
- les enfants vus dans les dispensaires préventifs;
- les membres des familles des malades et les écoliers en contact direct avec des malades souffrant de méningite cérébro-spinale.

Les collectivités visées étant averties par avance, les maîtres d'école préparaient les fiches collectives et prenaient une part active au cours des prélèvements. Grâce à cette organisation, il a été possible de faire jusqu'à 150 prélèvements par heure. La collaboration avec les services de santé scolaire et avec les écoles mêmes a été excellente.

<sup>1</sup> Chef, Laboratoire de recherche sur les méningocoques, Centre d'Epidémiologie et de Microbiologie, Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie, Prague, Tchécoslovaquie.

<sup>2</sup> Directeur, Laboratoire de Biologie, Bamako, Mali.

<sup>3</sup> Chef de la Division de médecine socio-préventive, Ministère de la Santé publique et des Affaires sociales, Bamako, Mali.

#### *L'équipe de prélèvements rhino-pharyngés*

L'équipe de prélèvements sur le terrain se composait de travailleurs du Service des Grandes Endémies. Tous les prélèvements étaient exécutés par le même travailleur pour maintenir l'uniformité de l'exécution des prélèvements. Parce qu'aucun fil de chromomolybdène n'était disponible pour fabriquer des écouvillons, on s'est servi de rayons de roues de bicyclette, système qui a fait ses preuves.

#### *Technique de prélèvement rhino-pharyngé*

Le prélèvement s'effectue assez rapidement sur le voile du palais en arrière de la luette. On procède sous contrôle visuel en immobilisant la langue à l'aide d'un abaisse-langue, sans toucher la muqueuse orale. Les prélèvements étaient effectués le matin à jeun.

On a pratiqué les prélèvements directement dans les classes ou dans les locaux mis à notre disposition par l'administration des écoles.

Les écouvillons prélevés étaient mis en récipient isotherme et transportés rapidement par automobile au laboratoire, où ils étaient ensemencés sans délai sur milieu de Thairy-Martin. Le délai maximal entre le prélèvement et l'ensemencement dans les boîtes de Pétri ne dépassait pas 30 minutes.

On a effectué aussi une série de prélèvements dans la ville de Koulikoro, à 60 km environ de Bamako. Cette ville a été visitée par une équipe de prélèvement, accompagnée par un assistant de laboratoire,

Les écouvillons étaient ensemencés immédiatement ou dans les 30 minutes suivant le prélèvement sur milieu de Thairy-Martin et transportés au laboratoire dans un isotherme. Pendant le transport, les boîtes de Pétri étaient placées avec le couvercle en haut.

Une méthode analogue a été suivie au cours des examens réalisés dans les familles des malades et au cours des dépistages épidémiologiques.

#### *Liquide céphalo-rachidien*

Les liquides céphalo-rachidiens provenant de l'hôpital « Lazarette des Roches » de Bamako étaient transportés au laboratoire à motocyclette dans un isotherme et colorés dès l'arrivée selon la méthode de Pick-Jacobson et celle de Gram.

On ensemencait le liquide céphalo-rachidien sur le milieu de Mueller-Hinton et la lecture était faite après 24 à 48 heures.

#### *Méthodes microbiologiques*

*Culture et identification de Neisseria meningitidis.* Les procédés de travail étaient en fait les méthodes du Centre international OMS de référence pour les méningocoques à Marseille, modifiées compte tenu des conditions climatiques, très difficiles à Bamako. Pour la culture, on a utilisé le milieu de Mueller-Hinton (Difco) coulé dans des boîtes de Pétri et dans des éprouvettes inclinées. Pour faciliter l'isolement des méningocoques à partir des prélèvements rhinopharyngés, on a utilisé le mélange inhibiteur VCN Mérioux (vancomycine, colimycine, nystatine) et le milieu de Thairy-Martin. De cette façon, l'isolement du germe sur le milieu de Thairy-Martin se trouve considérablement facilité.

Les colonies suspectes étaient isolées et soumises aux opérations suivantes: on préparait des frottis microscopiques, on réalisait une réaction à l'oxydase et on pratiquait les épreuves biochimiques.

*Etude de l'acidification des milieux sucrés.* Nous l'avons faite en boîte de Pétri renfermant le milieu de Mueller-Hinton, coloré par le bleu de bromothymol et additionné de 1% de glucose, maltose, lévulose et mannitol. Une colonie était mise en suspension dans 1 ml d'eau distillée stérile. Une goutte de cette suspension était étalée sur environ 1 cm<sup>2</sup> d'une boîte bien sèche.

*Identification antigénique.* Nous avons effectué l'agglutination sur lame selon la technique habituelle.

Les sérums méningococciques anti-A et anti-B provenaient du Centre international OMS de référé-

rence pour les méningocoques à Marseille. Les sérums anti-X et anti-Y ont été fournis par le Dr Slaterus, de l'Université d'Amsterdam.

Les sérums étaient dilués d'une façon convenable pour permettre l'agglutination sur la lame.

Tous les examens de laboratoire étaient réalisés sans exception par deux travailleurs, c'est-à-dire sous le contrôle de quatre yeux.

*Sensibilité aux sulfamides et aux antibiotiques.* La sensibilité aux sulfamides a été étudiée par la méthode de dilution et la sensibilité aux antibiotiques par la méthode du disque et par la méthode de dilution. Les sensibilités aux sulfamides étaient mesurées quantitativement à Marseille avec la sulfadiazine, la sulfaméthoxy-pyridazine, la sulfadoxine et à Prague avec le sulfisoxazol.

La sensibilité aux antibiotiques était mesurée à Marseille par la méthode du disque avec les antibiotiques suivants: streptomycine, novobiocine et rifampine et avec la pénicilline, l'ampicilline, le chloramphénicol, la tétracycline, l'érythromycine, qui étaient étudiés à Prague par la méthode de dilution, et avec l'oxacilline.

#### RÉSULTATS ET DISCUSSION

A) Les enquêtes dans les écoles et dans les institutions pour enfants ont été effectuées dans différents quartiers de Bamako et aussi dans la ville de Koulikoro, à 60 km environ de Bamako.

Les groupes les plus souvent touchés étaient ceux des enfants de 5-9 ans et ceux de 10-14 ans, parmi lesquels on a isolé le plus grand nombre de souches méningococciques du sérotype A, mais aussi celles des sérotypes B, C, X et Y et au surplus le plus grand nombre de souches non typées.

B) On a effectué trois séries d'examen dans des dispensaires à Bamako et une série à Koulikoro.

A partir de 229 examens, on a isolé le plus souvent le sérotype X à savoir six fois (32%), le type A deux fois et le type B une fois.

C) En liaison épidémiologique avec des cas de méningite cérébro-spinale, on a effectué des examens bactériologiques dans 12 familles de malades et dans cinq groupes écoliers, qui avaient été fréquentés par des malades.

Les dépistages épidémiologiques chez 420 sujets démontrent que le type A était isolé le plus souvent, à savoir au total 17 fois (43,5%), les types B et X trois fois et le type Y quatre fois.

Tableau 1. Sérotypes de méningocoques isolés chez des porteurs, par groupe d'âge

Groupe d'âge (années)	Sexe	Nombre de sujets examinés	Total	Sérotypes de méningocoques										Total
				A	B	C	X	Y	R1	R2	R3	R4		
0-1	H	29	60							1			1	4
	F	31			1				1	1			3	
1-4	H	90	173	1			3		2		1	4	11	20
	F	83			1		2		1	1		4	9	
5-9	H	644	1 191	19	3			1	5	3	1	8	40	67
	F	547		5	2		4		6	3	1	6	27	
10-14	H	443	881	10	3	1		1	2	8	3	2	30	52
	F	438		5	3	1	1		2	5		5	22	
15-19	H	81	136	1			2	2			1		6	8
	F	55		1					1				2	
20-29	H	34	68		1			1			1		3	4
	F	34					1						1	
30-39	H	21	38							1			1	2
	F	17								1			1	
40-49	H	5	15											
	F	10												
50+	H	3	7											1
	F	4						1					1	
Non spécifié	H	8	12											1
	F	4		1									1	
Total	H	1 358		31	7	1	5	5	10	12	7	14	92	
	F	1 223	2 581	43	14	2	13	6	22	22	8	29	159	
				12	7	1	8	1	12	10	1	15	67	

L'incidence la plus forte a été observée dans les groupes d'âge 5-9 ans et 10-14 ans.

Le tableau 1 montre les résultats de tous nos examens, par groupes d'âge. Au total, on a examiné 2581 sujets et on a isolé 159 souches de *Neisseria meningitidis*. La fréquence des sérotypes était :

Sérotype A : 43 souches (27%)  
 Sérotype B : 14 souches (8,8%)  
 Sérotype X : 13 souches (8,2%)  
 Sérotype Y : 6 souches (3,9%)  
 Sérotype C : 2 souches (1,3%)

Parce que nous n'avions pas eu à Bamako assez de sérums anti-A, B, X, Y à notre disposition et pas du tout de sérums anti-C, anti-D et anti-Z, nous avons

introduit pour les diplocoques Gram-négatifs et oxydase-positifs, qui fermentaient le glucose et le maltose, les groupes suivants :

R 1 = les agglutinations avec les sérums méningococciques anti-A, anti-B, anti-X et anti-Y étaient négatives;

R 2 = les agglutinations avec les sérums méningococciques anti-A et anti-B étaient négatives, celles avec les sérums anti-X et anti-Y n'étant pas faites;

R 3 = les agglutinations avec les sérums anti-A et anti-B étaient positives, mais les souches n'agglutinaient pas spontanément;

R 4 = les agglutinations n'étaient pas faites parce qu'il n'y avait plus de sérums disponibles.

Tableau 2. Nombre et pourcentage de cultures positives

Groupe d'âge (années)	Nombre de sujets examinés	Cultures positives	
		Nombre	%
0-1	60	4	6,6
1-4	173	20	11,5
5-9	1 191	67	5,6
10-14	881	52	5,9
15-19	136	8	5,8
20-29	68	4	5,8
30-39	38	2	5,2
40-49	15	—	—
50+	7	1	(14,0)
Non spécifique	12	1	(8,0)
Total	2 581	159	6,1

Dans les écoles étudiées, il y avait 9% de souches isolées dans le groupe d'âge de 1-4 ans et au total 5,2%.

Dans les dispensaires, il y avait 12,6% de souches isolées dans le groupe d'âge de 1-4 ans et au total 8,3%.

Lors des dépistages épidémiologiques, le pourcentage des souches isolées était le plus élevé dans le groupe d'âge de 5-9 ans (19,6%) et au total de 9,3%.

Le tableau 2 montre les résultats de tous nos examens et le pourcentage des souches isolées par groupes d'âge, qui variait de 5,2% à 6,6%, sauf dans le groupe d'âge de 1-4 ans, où il était de l'ordre de 11,5%. Le pourcentage le plus élevé se trouve dans les examens de dépistage (9,3% de souches isolées) et le plus bas dans les écoles étudiées (5,2%).

Parallèlement avec les sondages, on a effectué des examens bactériologiques de liquide céphalo-rachidien (LCR) pour l'hôpital des maladies infectieuses « Lazarette des Roches » à Bamako.

Le tableau 3 présente les résultats microscopiques et bactériologiques obtenus sur 370 échantillons de LCR selon l'aspect du matériel étudié. Parmi 68 échantillons de LCR purulent, on a démontré microscopiquement la présence du diplocoque Gram-négatif dans 34 cas (50,0%), le méningocoque étant cultivé 17 fois.

L'examen microscopique du LCR trouble obtenu sur 233 cas examinés a montré la présence du diplocoque Gram-négatif dans 80 cas (34,2%), la culture étant positive dans 55 cas (68,7%).

Au contraire, dans 50 cas de LCR clair, on a trouvé cinq fois le diplocoque Gram-négatif et la culture était positive deux fois.

Dans 18 cas de LCR hémattique, on a trouvé microscopiquement trois fois le diplocoque Gram-négatif et la culture était positive deux fois.

Parmi le total de 122 échantillons de LCR, où l'on a constaté microscopiquement la présence du diplocoque Gram-négatif, la culture a été couronnée de

Tableau 3. Résultats des examens de LCR prélevés à l'Hôpital « Lazarette des Roches », Bamako, 1970

Aspect du LCR	Nombre de cas	Examen direct du LCR après coloration de Gram						Cultures du LCR positives			
		A		B		C		A		B	
		Présence de diplocoques Gram-négatifs	Absence de germes	Présence de diplocoques Gram-positifs en flamme de bougie	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre
Clair	50	5	10,0	44	88,0	1	2,0	2	40,0	0	0
Purulent	68	34	50,0	27	39,8	7	10,2	17	50,0	0	0
Trouble	233	80	34,2	128	54,8	25	11,0	55	68,7	11	8,5
Hémattique	18	3	16,7	14	77,7	1	5,6	2		0	
Jaune	1					1					
Total	370	122	33,0	213	57,5	35	9,5	76	62,0	11	5,2

Tableau 4. Sensibilité aux sulfamides des différents sérotypes

N° de la souche	Sérotipe	Sensibilité aux sulfamides			
		Sulfadiazine	Sulfamé- thoxy-pyridazine	Sulfadoxine	Sulfisoxazole
Malades					
279	A	S <sup>a</sup>	S	S	NP <sup>b</sup>
342	A	S	S	S	S 16 µg/ml
265	A	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	64 µg/ml
464	A	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	32 µg/ml
Porteurs de germes					
1 653	A	50 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	32 µg/ml
3 104	C	S	S	S	S
3 187	X	S	S	S	S
3 231	X	S	S	S	S
3 529	X	S	S	S	64 µg/ml
3 544	X	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	128 µg/ml
1 972	X	200 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml	S
3 917	X	100 µg/ml	50 µg/ml	10 µg/ml	16 µg/ml
1 839	X	S	S	S	S
3 962	X	S	S	S	S
3 718	X	NP	NP	NP	32 µg/ml
4 043	Y	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	64 µg/ml
4 092	Y	50 µg/ml	50 µg/ml	200 µg/ml	64 µg/ml
1 835	Y	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	8 µg/ml

<sup>a</sup> S = sensible (concentration inhibitrice minimale = 0,125-8 µg/ml).

<sup>b</sup> NP = épreuve non pratiquée.

succès dans 76 cas (62,0%). Par contre, sur 213 échantillons de LCR microscopiquement négatifs, la culture du LCR n'a été positive que dans 11 cas (5,2%).

Dans 35 cas seulement (9,5%), on a trouvé microscopiquement les diplocoques Gram-positifs en flamme de bougie. Le LCR était trouble 25 fois (71,4%), sept fois purulent et clair, une fois hémattique et jaune.

N'ayant pas de possibilité de conserver des souches isolées de méningocoques, nous avons acquis de Prague les milieux de transport d'après Vandekerkove à la fin du mois d'avril.

Une partie des souches isolées a été envoyée sur ce milieu à Prague et on a vérifié la qualité des milieux, qui ont fait leurs preuves.

En cas de reculture positive, on a pratiqué la

lyophilisation et 18 souches (5 du sérotipe A, 1 du sérotipe C, 9 du sérotipe X et 3 du sérotipe Y) ont été envoyées à Marseille au Centre international OMS de référence pour les méningocoques et en même temps au Dr Slaterus, à l'Université d'Amsterdam, pour confirmer le sérotypage. On a confirmé les déterminations antigéniques que nous avons faites.

Sauf quatre souches du sérotipe A provenant de malades, toutes les autres souches provenaient de porteurs de germes.

Les résultats des épreuves de sensibilité aux sulfamides sont présentés dans le tableau 4.

On voit que deux souches du sérotipe A provenant de malades étaient résistantes à tous les sulfamides utilisés. Deux souches étaient sensibles.

Chez les porteurs de germes, une souche du sérotipe A était résistante aux sulfamides. Sur neuf

souches du sérotype X, trois ont été trouvées résistantes à Marseille et quatre à Prague.

Les trois souches du sérotype Y étaient résistantes à tous les sulfamides.

Sensibilité aux antibiotiques: toutes les souches se sont montrées sensibles, sauf trois souches X et une souche Y résistant à la streptomycine, et une souche X et une souche Y résistant à la novobiocine. Avec l'oxacilline, une souche A et une souche X se sont montrées résistantes.

#### CONCLUSIONS

Les sondages bactériologiques faits au cours des mois de janvier à mai 1970, c'est-à-dire dans une période non épidémique, en République du Mali, ont montré la diversité des sérotypes de *Neisseria meningitidis* circulant parmi les porteurs de germes.

On a isolé les sérotypes A, B, C, et, pour la première fois en Afrique, les sérotypes X et Y. Des souches des sérotypes X et Y ont été aussi isolées du LCR de malades en Europe et en Amérique (1, 2).

Toutes les souches isolées sur des malades atteints de méningite cérébro-spinale appartenaient au sérotype A.

Deux souches sur quatre du sérotype A isolées sur des malades étaient résistantes à la sulfadiazine, à la sulfaméthoxyypyridazine, à la sulfadoxine et au sulfisoxazol, mais toutes les souches étaient sensibles aux antibiotiques.

Chez les porteurs de germes, on a trouvé des souches des sérotypes A, X et Y résistantes aux sulfamides, et résistantes également à la streptomycine, à la novobiocine et à l'oxacilline.

Les futures études, au cours du programme de surveillance des infections à méningocoques en Afrique, doivent avoir pour objet l'étude de la circulation des sérotypes de *Neisseria meningitidis*, surtout dans la période non épidémique. Les résultats obtenus seront la base du travail ultérieur des équipes.

L'étude de la résistance aux sulfamides et aux antibiotiques des sérotypes isolés et éventuellement l'étude de l'évolution de cette résistance donneront des indications pour l'application des vaccins anti-méningococques.

Les vaccins mono- ou polyvalents se révèlent l'unique mesure préventive contre cette infection dans l'avenir immédiat.

#### REMERCIEMENTS

Cette étude n'aurait pas été possible sans l'aide active de beaucoup de collaborateurs qui ont fait des travaux administratifs sur le terrain et au laboratoire.

Le D<sup>r</sup> K. W. Slaterus, de l'Université d'Amsterdam, et

le D<sup>r</sup> M. Vandekerkove, du Centre international OMS de référence pour les méningocoques de Marseille, nous ont fourni les sérums qui ont permis cette étude. Nous les en remercions vivement.

#### SUMMARY

##### STUDY OF *NEISSERIA MENINGITIDIS* ISOLATED IN THE REPUBLIC OF MALI IN 1970

During the surveillance programme for meningococcal infections, carried out in the Republic of Mali under the auspices of WHO, bacteriological surveys were conducted. Between January and May 1970, 2 581 persons were examined to find out whether they were carriers of *N. meningitidis*, to identify the serological types of meningococcus circulating in the population, and to discover the degree of resistance to sulfonamides and

antibiotics. Among the strains isolated in carriers, serotype A was identified in 27% of cases, serotype B in 8.8%, and serotype C in 1.3%. For the first time in Africa, serotypes X and Y were isolated—the former accounting for 8.2% and the latter for 3.9% of all strains isolated. In patients suffering from cerebrospinal meningitis, only serotype A was isolated. There was considerable resistance to sulfonamides in the strains isolated.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. SLATERUS, K. W. *Antonie van Leeuwenhoek*, **29**: 265 (1963).
2. HOLLIS, W. P. J. ET AL. *J. Bacteriol.*, **95**: 1 (1968).