

BURKINA FASO
UNITE-PROGRES-JUSTICE

MINISTERE DES ENSEIGNEMENTS SECONDAIRE,
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-DIOULASSO (UPB)

INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL (IDR)



MEMOIRE

Présenté par : **OUEDRAOGO Sidzanbnoma Olivier**

Maître ès Sciences Biochimie-Microbiologie Appliquée

Pour l'obtention du :
Diplôme d'Etudes Approfondies en
Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques
Sur le thème :

**Mise en place et optimisation des méthodes microbiologiques de mesure de la
résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux antituberculeux**

Soutenu le 21 Juillet 2010 devant le Jury:

Président: Pr Adrien Marie Gaston BELEM

Membre: Dr Juliette TRANCHOT/DIALLO

Directeur de mémoire: Dr Potiandi Serge DIAGBOUGA

Année universitaire 2007-2008

N° d'ordre :

Dédicace

A la mémoire de mon père feu OUEDRAOGO D. Etienne et à ma mère YAOLIRE Marie
Jeanne

Vos prières et vos encouragements m'ont soutenu depuis mon enfance. Recevez toute ma reconnaissance et que Dieu vous bénisse.

A ma chère et tendre épouse DJOSSOU Afiavi Théophilie

Ta compréhension et ton amour m'ont donné la force de m'inscrire à ce DEA. Ce travail est aussi le tien. Je t'embrasse.

A mes frères et sœurs

Vos soutiens m'ont permis de progresser.

A mon cousin Mr OUEDRAOGO K. Albert et son épouse

Vous qui n'avez ménagé aucun effort pour m'accueillir et me soutenir, ce travail est également le votre. Puisse l'éternel vous bénir.

Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé dans le cadre des activités de recherche de notre DEA, menées au Centre Muraz (Burkina Faso). Ce travail a été l'œuvre de plusieurs personnes dont les contributions ont été importantes et nous voudrions remercier :

Dr Potiandi Serge DIAGBOUGA : Ex Directeur Général du Centre Muraz, responsable de l'Unité Immunologie-Mycobactériologie et directeur de ce mémoire. Vous avez malgré vos multiples occupations accepté de m'accueillir et de me guider avec rigueur. Vous n'avez ménagé aucun effort pour un suivi rigoureux de ce travail. Je vous suis infiniment reconnaissant pour les moyens matériels et techniques mis à ma disposition pour ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude. Mille mercis.

Pr Georges Anicet OUEDRAOGO, Pr Jean Bosco OUEDRAOGO : Merci chers enseignants pour vos efforts multiples dans la formation de la jeunesse Burkinabé et particulièrement pour la promotion de ce DEA. Trouvez ici l'expression de notre profonde et sincère reconnaissance.

Dr Adama OUIMINGA : Co-responsable de l'Unité Immunologie-Mycobactériologie pour votre contribution à la réalisation de ce travail.

Dr Dézémon ZINGUE, Dr Sylvie ZIDA, Mr Moumini NOUCTARA, Mme Antoinette KABORE, tout le personnel de la Mycobactériologie pour l'accueil.

Merci **SANOU Adama**, pour m'avoir toujours donné le courage de poursuivre ce DEA.

A **tous mes amis** qui m'ont soutenu. Je vous dit merci

I.	INTRODUCTION.....	1
	I.1 Généralités sur les méthodes d'étude de la résistance de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....	3
	I.1.1 Les méthodes conventionnelles d'étude de la résistance.....	3
	I.1.2 Les méthodes d'étude moléculaire	3
	I.2 Problématique du sujet.....	4
II.	SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
	II.1 Données épidémiologiques.....	7
	II.1.1 Mode de contamination.....	7
	II.1.1.1 Transmission par voie aérienne.....	7
	II.1.1.2 Autres modes de transmission.....	7
	II.1.2 Situation de la tuberculose dans le monde.....	8
	II.1.3 Situation de la tuberculose au Burkina Faso.....	8
	II.1.4 Impact du VIH sur la tuberculose.....	9
	II.1.5 Impact de la co-infection TB/VIH sur le système de santé.....	10
	II.2 L'agent pathogène de la tuberculose.....	11
	II.2.1 Classification.....	11
	II.2.2 Caractères généraux.....	11
	II.2.3 Caractères cultureux.....	12
	II.2.4 Caractères biochimiques.....	12
	II.2.5 Structure antigénique et conservation.....	12
	II.3 L'infection par le BK.....	13
	II.4 Physiopathologie de la tuberculose.....	14

II.5 Diagnostic de la tuberculose pulmonaire.....	14
II.5.1 Diagnostic clinique.....	14
II.5.2 Diagnostic microbiologique.....	15
II.5.2.1 Prélèvement des crachats.....	15
II.5.2.2 Microscopie optique.....	16
II.5.2.3 Microscopie à fluorescence.....	16
II.5.2.4 Culture.....	16
II.5.3 Diagnostic radiographique.....	17
II.5.4 Intra Dermo Réaction à la tuberculine (IDR).....	17
II.5.5 Fibroscopie bronchique.....	17
II.6 Diagnostic des tuberculoses extra-pulmonaires.....	17
II.7 Mesures de prévention et mode de traitement de la tuberculose.....	18
II.7.1 Mesures de prévention.....	18
II.7.2 Mode de traitement.....	18
II.7.3 Les régimes thérapeutiques.....	19
II.7.4 Les médicaments antituberculeux.....	19
II.7.4.1 Les médicaments antituberculeux de première ligne....	19
II.7.4.2 Les médicaments antituberculeux de seconde ligne.....	20
III. LES OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	21
III.1 Objectif général	21
III.2 Objectifs spécifiques.....	21

IV. MATERIEL ET METHODES.....	22
IV.1 La microscopie optique.....	22
IV.1.1 Coloration du frottis.....	22
IV.1.2 Lecture des frottis.....	23
IV.2 Préparation des milieux de culture.....	25
IV.2.1 Le premier jour (J1).....	27
IV.2.1.1 Mise en solution du milieu de base de Löwenstein Jensen.....	27
IV.2.1.2 Préparation et stérilisation du matériel nécessaire pour les manipulations de J2.....	27
IV.2.1.3 Traitement des œufs.....	28
IV.2.2 Le deuxième jour (J2).....	28
IV.2.2.1 Traitement des œufs (suite).....	28
IV.2.2.2 Constitution et distribution du milieu de L.J.....	28
IV.2.2.3 Préparation du milieu de L.J. enrichi avec du pyruvate de sodium.....	29
IV.2.2.4 Préparation des milieux de culture additionnés d'antibiotiques.....	29
IV.2.3 Contrôle des milieux.....	32
IV.2.3.1 Contrôle macroscopique.....	32
IV.2.3.2 Contrôle de stérilité.....	32
IV.2.3.3 Contrôle de l'activité des antibiotiques et de la technique.....	32
IV.3 La culture selon la méthode à la soude sans neutralisation de Petroff....	33

IV.4 L'identification : tests biochimiques.....	37
IV.4.1 Test à la Niacine.....	38
IV.4.2 Test au Nitrate.....	40
IV.4.3 Recherche de la production de la catalase à 22°C et 68°C.....	41
IV.4.4 Croissance sur TCH.....	42
IV.5 Le test de sensibilité : méthode des proportions.....	44
IV.5.1 Préparation de la suspension bacillaire.....	45
IV.5.2 Etalonnage.....	45
IV.5.3 Préparation des dilutions.....	46
IV.5.4 Ensemencement des milieux.....	46
IV.5.5 Incubation des cultures.....	47
V. RESULTATS.....	48
V.1 Résultats de la microscopie.....	48
V.2 Résultats de la culture.....	48
V.3 Résultats de l'identification.....	48
V.4 Résultats des tests de sensibilité aux antituberculeux.....	49
VI. DISCUSION.....	49
VII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	50

Résumé

Objectif : Contribuer à mettre en place et optimiser les méthodes conventionnelles de mesure de la résistance de *M. tuberculosis* aux antituberculeux au laboratoire de mycobactériologie du Centre Muraz.

Schéma : Effectuer la microscopie, préparer les milieux de cultures, mettre en culture, identifier et réaliser les tests de sensibilité avec le meilleur rendement possible.

Résultats : Nous avons obtenu des résultats techniquement satisfaisants.

En effet nous avons à la fin de notre étude obtenu des taux de contaminations inférieurs à 10% et des antibiogrammes interprétables.

Conclusion : La durée des méthodes conventionnelles de mycobactériologie est un obstacle à la prise en charge rapide et efficace de certaines formes de tuberculoses. D'où la nécessité de développer des tests moléculaires rapides de diagnostic des formes de tuberculoses résistantes.

Mots clés : Tuberculose, étude de la résistance aux antituberculeux, *M. tuberculosis*, Centre Muraz.

I. INTRODUCTION

La tuberculose (TB) est une maladie contagieuse endémo-épidémique à transmission essentiellement interhumaine. Elle est causée dans l'immense majorité des cas par *Mycobacterium tuberculosis* communément appelé Bacille de Koch ou BK.

La tuberculose a été isolée des autres maladies pulmonaires par Laennec en 1819. En 1839, le médecin allemand Schönlein a réuni en une description unifiée ses manifestations cliniques disparates, et lui a donné son nom définitif.

En 1865, le médecin Jean-Antoine Villemin après avoir prouvé par la méthode expérimentale la transmission de la tuberculose a pu affirmer que cette maladie, de nature jusqu'alors inconnue, était due à un microbe invisible avec les moyens techniques de l'époque. Il a conclu qu'on pouvait donc s'en protéger par des mesures visant à éviter la contagion.

Enfin, c'est le médecin allemand, Robert Koch, qui découvre le bacille en 1882, d'où son nom bacille de Koch. A ce moment, la tuberculose était en Europe la cause d'un décès sur sept.

De nos jours, la tuberculose constitue, un problème majeur de santé publique. En 2007, Il y aurait eu au niveau mondial 9,27 millions de nouveaux cas de tuberculose avec un taux d'incidence global estimé à 139 nouveaux cas pour 100.000 habitants [1]. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'il y a eu 1,7 millions de décès en 2007 par suite de cette maladie [2]. En 2008, 3972 nouveaux cas de tuberculose toutes formes confondues dont 2737 cas de Tuberculose Pulmonaire à Microscopie positive (TPM+), ont été diagnostiqués au Burkina Faso.

La stratégie DOTS (*Directly Observed Treatment Short-course*) lancée par l'OMS dans les années 1994-1995, reste l'approche présentant le meilleur rapport coût/efficacité pour dépister, traiter et guérir les cas et pour prévenir l'apparition et la propagation d'une pharmacorésistance. Cependant, la pharmacorésistance du BK est connue depuis la découverte des antituberculeux. On assiste à l'émergence de BK multirésistants aux antituberculeux.

Le Centre Muraz a pendant longtemps abrité l'unique laboratoire qui pratique les techniques microbiologiques de mesure de la pharmacorésistance du BK aux antituberculeux au Burkina

Faso. Cependant, pendant un certain temps ces méthodes d'étude de la résistance ne se faisaient plus en routine. Ces dernières années, du fait des engagements pris par le Centre Muraz d'accompagner et de collaborer avec le PNT d'une part, et d'autre part de développer un certain nombre de projets de recherche, il s'est engagé de remettre en place ces techniques de microbiologie et de les optimiser dans le but de les utiliser dans ses protocoles de recherche. A côté de ces méthodes conventionnelles de mycobactériologie, le Centre Muraz s'est également engagé à implanter des techniques modernes de biologie moléculaire en vue de mesurer plus rapidement la résistance aux antituberculeux.

Un de ces protocoles de recherche porte sur l'évaluation de la résistance initiale et acquise du complexe *tuberculosis* aux médicaments antituberculeux utilisés au Burkina Faso. Ce programme est réalisé avec la collaboration du Programme National de Lutte contre la Tuberculose et de l'unité des pathogènes ré émergents de l'institut Saint Raphael de Milan en Italie et avec le soutien du Fond Mondial.

Un deuxième programme de recherche porte sur l'impact de la co-infection VIH/*Mycobacterium tuberculosis* sur la dynamique de transmission de la tuberculose au Burkina. Ce projet est réalisé avec la collaboration du CHU Arnaud de Villeneuve et de l'IRD à Montpellier. Ce projet bénéficie du soutien de l'Agence Nationale de Recherche sur le Sida (projet ANRS 12204).

Pour notre mémoire de DEA nous nous sommes investi à contribuer à mettre en place et à optimiser au laboratoire de mycobactériologie du Centre Muraz, les techniques de mise en culture, d'identification et des tests de sensibilité aux antituberculeux de *Mycobacterium tuberculosis*. De plus, nous nous sommes initiés aux techniques de biologie moléculaires qui permettent à partir de l'extraction de l'ADN de lames de bacilloscopie, de poser le diagnostic du complexe tuberculosis et le typage moléculaire par PCR-RFLP sur les souches pures.

I.1 Généralités sur les méthodes d'étude de la résistance de *Mycobacterium tuberculosis*

I.1.1 Les méthodes conventionnelles d'étude de la résistance

Les méthodes conventionnelles d'étude de la résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux antituberculeux reposent sur l'isolement, l'identification et les tests de sensibilité aux antituberculeux.

L'isolement se fait généralement selon la méthode de Petroff sur milieux de Loewenstein-Jensen (LJ) ou de Coletsos (qui est du milieu de LJ additionné de pyruvate de sodium pour favoriser la croissance des mycobactéries à croissance difficile). Il existe d'autres milieux de culture comme les milieux de Dubos ou de Youmans. Dans la pratique le milieu de Loewenstein-Jensen est le plus utilisé.

Les colonies de mycobactéries qui y poussent sont identifiées par des tests biochimiques : test à la niacine, recherche de nitrate réductase, recherche de catalase à 22°C et à 68°C et la croissance sur TCH (hydrazide de l'acide thiophène-2 carboxylique).

Une fois la souche identifiée, on utilise la méthode des proportions pour établir son profil de sensibilité aux antituberculeux.

I.1.2 Les méthodes d'étude moléculaire

L'OMS et le partenariat Stop TB ont appelé au développement de techniques plus rapides de diagnostic pour détecter les tuberculoses multi résistantes (MDR) afin d'éviter le retard dans le traitement et ainsi juguler la propagation de toute forme de résistance aux antituberculeux.

En effet, l'apparition de la tuberculose multi résistante a stimulé la recherche sur les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance aux antituberculeux. Ceci a conduit à l'élucidation des mécanismes responsables de la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide chez *Mycobacterium tuberculosis*.

Les études ont démontré que plus de 95% des souches de *Mycobacterium tuberculosis* résistantes à la rifampicine ont une mutation dans une région de 81 bp du gène *rpoB* qui code pour la sous unité β de l'ARN polymérase [3]. A l'opposé, les mutations à l'origine de la résistance à l'isoniazide sont situées sur plusieurs régions du génome [4].

La résistance à la rifampicine est un événement rare, qui fait de lui un excellent marqueur pour la détection des tuberculoses multirésistantes puisque environ 90 % des souches résistantes à la rifampicine sont également résistantes à l'isoniazide (Van Der Zanden, communication personnelle). L'inverse n'est pas vrai, la prévalence de la résistance à l'isoniazide est généralement plus élevée que celle de la rifampicine.

Les outils diagnostiques des TB-MDR reposent sur la biologie moléculaire, techniques encore trop inaccessibles à grande échelle pour les pays en développement (PED). Il est un intérêt majeur de développer ces méthodes rapides pour une prise en charge efficace des patients (réduire les délais de disponibilité des résultats).

I.2 Problématique du sujet

La tuberculose a toujours été un problème majeur de santé publique au Burkina Faso. Avec une incidence attendue de 71 NC TPM+/10⁵ habitants [5], le Burkina Faso est classé parmi les pays à forte prévalence tuberculeuse.

Les régimes de traitement des cas de tuberculose ont beaucoup changé. En effet, avant 1985, le régime n'était pas standardisé, il était conduit en fonction de la disponibilité en médicaments. Entre 1987 et 1989, un régime de traitement de courte durée de 8 mois avait été appliqué (2SHEZ/6EH). L'irrégularité des médicaments avait conduit à l'administration de la thiacétazone et de l'éthionamide.

Entre 1989 et 1994, un régime de traitement de 6 mois a été appliqué pour le traitement des nouveaux cas (2RHZE(ou S)/4RH). Durant les 2 premiers mois, les médicaments étaient administrés sous supervision directe mais durant les 4 derniers mois, l'administration était ambulatoire.

Depuis 1995, le Burkina Faso a mis en place un Programme National de lutte contre la Tuberculose (PNT) qui s'inspire de la stratégie DOTS (Directly Observed Treatment of Short course) ou stratégie de traitement courte durée sous observation directe recommandée par l'OMS [6]. Pour la prise en charge de la tuberculose, des régimes standards de courte durée ont été appliqués [7]. Pour les nouveaux cas, le régime de traitement de première ligne chez l'adulte était de 8 mois de 1995 à 2007, soit 2(RHZE)/6(EH) avec une prise supervisée pendant les 2 premiers mois. Il est de 6 mois depuis 2008, soit 2(RHZE)/4(RH) avec une prise supervisée sur toute la durée du traitement. Pour les malades adultes en retraitement avec le régime de deuxième ligne (échecs, reprises de traitement, rechutes) le régime a été le suivant de 1995 à 2008 : 2S(RHZE)/1(RHZE)/5(RH)₃E₃. A partir de l'année 2009, cette catégorie de malades est sous le régime modifié suivant : 2S(RHZE)/1(RHZE)/5(RHE).

Par ailleurs, l'approvisionnement en médicaments antituberculeux de qualité requise est régulier.

Au Burkina Faso, deux études ont été déjà réalisées ; Cependant elles ont porté sur des échantillons restreints. La première étude a été menée par le Centre Muraz, sur des crachats de malades hospitalisés au Centre Régional de Lutte Antituberculeuse (CRLAT) de Bobo-Dioulasso entre 1992 et 1994. Elle a pu évaluer la performance du régime de traitement de 6 mois qui était en vigueur entre 1989 et 1994. Cette étude a montré la résistance primaire pour les souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* suivantes : isoniazide 7,6% ; ethambutol 1% ; rifampicine 2,5% ; streptomycine 12,4% [8].

La seconde étude [9], plus récente a été réalisée en 2000, sur un nombre limité de sites (Ouagadougou, Bobo-Dioulasso, Dori et Gorom-Gorom). Les antibiotiques testés étaient ceux utilisés par le PNT (isoniazide, streptomycine, rifampicine, ethambutol). La distribution de cas de résistance dans les 4 régions étudiées était la suivante : 14,7% à Ouagadougou, 29% à Bobo-Dioulasso, 18% à Dori et 16% à Gorom-Gorom. Ces résultats mettent en évidence l'existence de souches de *M.tuberculosis* résistantes aux antituberculeux utilisés en première ligne par le PNT dans diverses régions du pays montrant l'importance d'entreprendre une enquête nationale de résistance aux antituberculeux au Burkina Faso.

Pour avoir de bons résultats un gros travail technique doit être fait. En effet en mycobactériologie, pour avoir des résultats de qualité, on doit maîtriser les étapes de la microscopie, de la préparation des milieux de culture, de la mise en culture des prélèvements,

de l'identification et de la mesure de la sensibilité aux antituberculeux des souches de bacilles tuberculeux et avoir un laboratoire de confinement acceptable. Quelque soit la technique de culture des mycobactéries, les contaminations sont inévitables et peuvent être de 4,1% sur les milieux solides de LJ et de 5,5% sur systèmes automatisés [20].

Pour bien mener l'étude de résistance au plan national, le Centre Muraz s'est intéressé à mettre en place et à optimiser les techniques conventionnelles de culture, d'identification et de mesure de la sensibilité de *M.tuberculosis* aux antituberculeux.

II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1 Données épidémiologiques

II.1.1 Mode de contamination

II.1.1.1 Transmission par voie aérienne

La transmission de la tuberculose est essentiellement interhumaine. Lorsque le malade tousse, parle, rit ou éternue, il produit de fines gouttelettes infectantes (contenant des bacilles tuberculeux) appelées gouttelettes de Pflügge qui sèchent rapidement. Ces gouttelettes se fixent sur des particules de poussière et les plus fines restent en suspension dans l'air pendant plusieurs heures. Un sujet sain s'infecte en inhalant ces particules. Une fois inhalées les particules de moins de 10 micromètres de diamètre peuvent atteindre les alvéoles du poumon, tandis que les plus grosses se déposent dans les voies aériennes supérieures d'où elles sont emportées par le courant mucociliaire pour être habituellement dégluties. Lorsque les BK pénètrent dans les poumons et atteignent les ganglions par la voie lymphatique, ils s'y multiplient et déclenchent une réponse immunitaire à l'origine de la formation des tubercules, et d'une caséification (nécrose tissulaire riche en bactéries) [6, 10, 11].

Un malade cracheur infecte 30% des sujets qui rentrent en contact avec lui. Parmi les sujets infectés, 5% développeront une tuberculose maladie précoce. Chez les 95% infectés qui ne font pas la maladie, 90% continueront d'inhiber le bacille, et 5% feront une tuberculose post-primaire après une période de latence [12].

II.1.1.2 Autres modes de transmission

La transmission digestive est très rare, et due le plus souvent à une ingestion d'aliments infectés d'origine animale.

La transmission transcutanée est très rare voire quasi inexistante ; Elle se fait par des objets souillés à partir de lésions tuberculeuses suintantes (otite tuberculeuse, tuberculose ganglio-

cutanée ou abcès froid fistulisé) [6]. La transmission par voie sexuelle des tuberculoses urogénitales existe mais est d'une très faible importance épidémiologique.

En conclusion, la tuberculose se transmet à d'autres personnes très souvent à partir d'un malade souffrant de tuberculose pulmonaire.

II.1.2 Situation de la tuberculose dans le monde

L'OMS estime à 9,27 millions de nouveaux cas de tuberculose dans le monde en 2007, dont 4,1 millions sont des cas pulmonaires contagieux. Parmi ces cas observés, 95% surviennent dans les pays en développement et 5% dans les pays industrialisés. Un tiers (33%) de la population mondiale est infectée par le BK soit 1,9 milliards de personnes [13].

L'incidence de la tuberculose se situe autour de 220 cas pour 100 000 habitants en Afrique, 190 pour 100 000 en Asie, 120 pour 100 000 en Amérique Latine contre 30 pour 100 000 en moyenne dans les pays industrialisés.

Selon les estimations de l'OMS, il y a eu 1,7 millions de décès par tuberculose en 2006, 98% de ces décès surviennent dans les pays en développement [13].

En 2007, on estimait à 500 000 le nombre de cas de tuberculose à bacilles multirésistants (tuberculose MR), 85% de ces cas proviennent de 27 pays (dont 15 dans la Région européenne). Les pays qui occupent les cinq premiers rangs pour le nombre total de cas de tuberculose MR sont l'Inde (131 000), la Chine (112 000), la Fédération de Russie (43 000), l'Afrique du Sud (16 000) et le Bangladesh (15 000). A la fin de 2008, 55 pays et territoires avaient signalé au moins un cas de tuberculose ultra résistante (tuberculose UR) [15].

II.1.3 Situation de la tuberculose au Burkina Faso

La tuberculose reste encore un problème de santé prioritaire au Burkina Faso. Selon l'OMS [13], l'incidence estimée est de 108 cas de TPM+ (Tuberculose Pulmonaire à Microscopie positive) pour 100 000 habitants, et de 248 cas de tuberculoses toutes formes pour 100 000

habitants ; Ce qui rapporté à la population du Burkina Faso en 2007 (13 730 258 habitants) représenterait respectivement 14 829 cas de TPM+ et 34 051 cas de tuberculose toutes formes confondues.

En 2007, 2 614 nouveaux cas de TPM+ et 3 682 nouveaux cas toutes formes confondues ont été diagnostiqués [14]. L'application du DOTS par le PNT au cours de l'année 2006 a permis d'obtenir un taux de succès au traitement de 72,8%.

II.1.4 Impact du VIH sur la tuberculose

L'infection à VIH provoque une destruction profonde de l'immunité cellulaire exposant ainsi les sujets infectés à des affections graves souvent mortelles, dont les délais d'apparition sont plus ou moins longs.

Le VIH a une affinité pour les lymphocytes CD4, ce qui entraîne une diminution du nombre de lymphocytes CD4 lors de l'infection par le VIH, et la défense contre les BK se fait essentiellement grâce aux lymphocytes CD4 en coopération avec les macrophages. On comprend aisément que lorsque le nombre de lymphocytes CD4 baisse, les sujets développent facilement une tuberculose s'ils sont exposés au BK.

Il est connu que le VIH peut :

- favoriser l'apparition de la TB évolutive ;
- favoriser la réactivation d'une infection tuberculeuse latente ;
- accroître le taux de récurrence de la TB ;
- augmenter le nombre de malades tuberculeux ;
- augmenter le nombre de cas de TB chez les VIH+
- favoriser la propagation de la tuberculose au sein de la communauté ;
- modifier le profil clinique de la tuberculose ;
- augmenter le nombre de décès chez les patients tuberculeux.

Près de 1/3 de ces séropositifs dans le monde sont infectés par le BK, et 68% de co-infectés vivent en Afrique subsaharienne contre 22% en Asie du sud-est [14].

En outre la tuberculose est une cause très importante de morbidité et la première cause de mortalité chez les sujets séropositifs. En effet un tiers environ des décès par SIDA est attribuable à la tuberculose. Elle contribue à abaisser l'immunité du sujet infecté par le VIH, ce qui entraîne une évolution vers le SIDA, donc vers le décès [14].

II.1.5 Impact de la co-infection TB/VIH sur le système de santé

L'augmentation des cas de TB entraîne une demande plus grande en ressources, médicaments, consommables et réactifs de laboratoire. La charge de travail augmente pour les prestataires de soins.

Néanmoins, la prévalence de l'infection à VIH ne modifie pas la stratégie de lutte antituberculeuse centrée sur :

- le couple dépistage/traitement des cas de tuberculose ;
- la vaccination au BCG dans le cadre du Programme Elargi de Vaccination (PEV), si l'enfant est asymptomatique ;
- la chimioprophylaxie par l'isoniazide comme méthode individuelle et indiquée chez l'enfant <5 ans ou chez le PvVIH (personne vivant avec le VIH) en contact étroit avec un TPM+, après avoir exclu une tuberculose maladie et selon indication du médecin ;
- l'amélioration des conditions socio-économiques ;
- l'éducation pour la santé [14].

II.2 L'agent pathogène de la tuberculose

II.2.1 Classification

Les mycobactéries sont des germes stricts de l'espèce humaine et animale, ce sont des bacilles aérobies stricts qui appartiennent au règne des *bacteria*, à l'embranchement des *actinobacteria*, à l'ordre des *actinomycetales*, au sous ordre des *corynebacterineae*, à la famille des *mycobacteriaceae*, et au genre *Mycobacterium* [16].

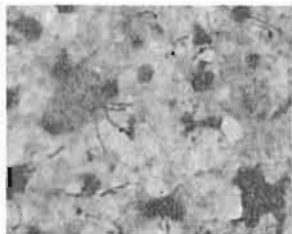
Il existe plus de 100 espèces réparties en trois (03) groupes :

Le complexe *tuberculosis* qui comprend *M. tuberculosis*, *M. bovis* et *M. africanum* ;
Mycobacterium lepreae ;

Et les Mycobactéries atypiques : *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. ulcerans*, *M. fortuitum*, *M. malmoens*

II.2.2 Caractères généraux

Les bacilles sont de forme coccoïde, ou longue, exceptionnellement ramifiées. Leur paroi présente une structure particulière, riche en cires (acides mycoliques) qui leur permet de retenir les colorants malgré l'action combinée d'acide dilué et d'alcool. Cette paroi leur confère une grande résistance aux antiseptiques, à certains antibiotiques, aux macrophages.



A l'observation au microscope, les bacilles sont rouge sur fond bleu, immobiles, grêles, parfois légèrement incurvés ou rectilignes, à extrémité arrondi 1-4 μm de longueur pour 0,3 μm de largeur. Cette particularité de la paroi est utilisée pour les mettre en évidence lors d'examen microscopique par la coloration de Ziehl-Neelsen.

Photo: Bacilles tuberculeux coloration de Ziehl

Microscope Optique. Objectif x 100

II.2.3 Caractères cultureux

La plus part des mycobactéries sont cultivables sur des milieux spéciaux (Loewenstein-Jensen, Coletsos, Dubos, Youmans...). Le temps de la pousse, et l'allure des colonies dépendent du milieu utilisé, et de l'espèce en cause. Pour distinguer le type de la mycobactérie, il faut pratiquer différents tests biochimiques ou recourir à la biologie moléculaire.

Les mycobactéries sont des bactéries aérobies à multiplication lente, dont le temps de multiplication est de 20 heures dans les conditions optimales. Elles résistent à certains agents chimiques tels que les alcalis (soude..), les acides (sulfuriques..), les détergents (lauryl sulfate de sodium...). C'est grâce à cette propriété que l'on peut effectuer la mise en culture des produits contaminés par les bactéries commensales, car ces dernières sont beaucoup plus sensibles à ces substances. C'est sur ce principe que reposent les méthodes de décontamination fluidification nécessaires à la mise en culture des prélèvements contaminés.

II.2.4 Caractères biochimiques

Les mycobactéries sont des bacilles Gram positif, ayant des caractères tinctoriaux qui permettent aisément de les identifier. Colorés en rouge par la fuschine, elles ne sont pas décolorées par l'acide-alcool, d'où leur nom de Bacilles Acido-Alcool Résistants (BAAR). Elles possèdent également certaines enzymes qui permettent leur identification classique au laboratoire. Ce sont la catalase, la nitrate-réductase capable de catalyser la réduction du nitrate en nitrite, et celles nécessaires à la conversion de la niacine en Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD).

II.2.5 Structure antigénique et conservation

Mycobacterium tuberculosis est la mycobactérie la plus rencontrée chez l'homme, chez qui elle provoque la tuberculose. Elle possède des caractères anatomiques communs aux autres mycobactéries, tels qu'une paroi riche en lipides, et d'autres propriétés citées plus haut. Mais en dehors de ces propriétés communes, elle a des propriétés qui lui sont propres telle que, la sensibilité à certains antibiotiques (isoniazide, éthambutol..) qui agissent en perturbant le

métabolisme lipidique ou l'agencement complexe de la paroi, une exigence de sa culture qui nécessite plusieurs facteurs de croissance, un temps de division élevé (environs 20 heures) qui explique la lenteur de croissance (3 semaines sur les milieux solides, et 10 à 15 jours sur les milieux liquides), la durée du traitement, et surtout le délai important qui sépare la contamination de l'apparition des signes cliniques.

Le BK est très sensible à la chaleur, à la lumière du soleil et à certains produits chimiques (eau de javel, alcool à 90°C). Il peut par contre être conservé entre +4 et +8°C, car il résiste au froid et à la dessiccation. La paroi lipidique, et la capsule polyosidique facilitent la multiplication intracellulaire de *M. tuberculosis* [14, 16, 17].

II.3 L'infection par le BK

La tuberculose pulmonaire est la forme de tuberculose la plus fréquente et la plus contagieuse. Elle se manifeste sous forme de :

Primo-infection latente, primo-infection patente ;

Forme médiastinale, forme miliaire ;

Forme cavitaire commune, pleurésie ;

Toux grasse, fièvre vespérale, sueur nocturne.

Les TEP (Tuberculoses Extra Pulmonaires) sont extrêmement rares, et moins contagieuses. Le pouvoir pathogène du BK provient de sa capacité de se multiplier. La lyse du BK libère des constituants antigéniques qui suscitent une réaction immunitaire, induisant un état d'hypersensibilité caséuse.

II.4 Physiopathologie de la tuberculose

Dans plus de 90% des cas, la pénétration du BK dans le poumon n'entraîne aucune manifestation clinique. Les BK se disséminent aux autres organes par le courant sanguin, le système lymphatique ou par extension directe. On dit que le sujet fait une « Primo Infection Tuberculeuse » (PIT) latente.

Dans moins de 10% des cas, cette PIT donne des signes cliniques et/ou radiographiques. On parle alors de PIT patente.

Dans les deux cas, les BK peuvent rester « endormis » longtemps si la primo-infection n'est pas traitée, voire indéfiniment dans diverses localisations de l'organisme. Puis dans un deuxième temps, pouvant s'étaler de quelques semaines à plusieurs années, un sujet pourra développer la maladie tuberculeuse, à localisation plus fréquemment pulmonaire mais avec possibilité de toucher n'importe quel organe. Cela intervient notamment lorsque survient une rupture d'équilibre entre le système de défense immunitaire du sujet hôte et le BK.

La survenue de la tuberculose maladie peut aussi être secondaire à une réinfection exogène récente et massive [14].

II.5 Diagnostic de la tuberculose pulmonaire

II.5.1 Diagnostic clinique

Il repose sur un faisceau d'arguments cliniques et radiologiques évocateurs de tuberculose chez les patients. Le dépistage de la tuberculose est réalisé chez les patients ayant des symptômes évocateurs et qui se présentent d'eux-mêmes dans les formations sanitaires. Cela n'est rendu possible que grâce à une attitude active du personnel de santé qui peut se résumer en deux composantes essentielles : La reconnaissance du symptôme dominant et l'application de l'ordinogramme devant ces patients (conduite à tenir devant une toux chronique) ;

L'information des communautés sur les symptômes respiratoires évocateurs notamment la toux persistante de plus de deux (2) semaines, avec une expectoration mucopurulente, parfois striée de sang, voire une hémoptysie, associés à un amaigrissement, une asthénie, une

aménorrhée non gravidique, une fièvre surtout vespérale avec des sueurs nocturnes et des douleurs thoraciques.

Quant au dépistage semi actif, il se résume le plus souvent en l'examen des sujets (enfants et adultes jeunes) qui ont été en contact avec un tuberculeux pulmonaire à microscopie positive.

La recherche semi active de la tuberculose est effectuée par l'agent de santé qui s'occupe des PvVIH selon les recommandations nationales (à travers des questions spécifiques lors de la visite), de même que les malades suspects en milieu carcéral.

II.5.2 Diagnostic microbiologique

II.5.2.1 Prélèvement des crachats

On exige 3 prélèvements de crachats pour le dépistage et 2 prélèvements pour les contrôles (aux 2^{ème}, 3^{ème}, 5^{ème} mois et à la fin traitement).

Au premier jour de l'entretien avec le malade, le jour de la consultation, un échantillon de crachat est recueilli en veillant à expliquer au malade que ses crachats doivent être ramenés des bronches par un effort de toux vigoureux succédant à une inspiration profonde. A l'issue de ce premier recueil, un crachoir est remis au patient pour recueillir les crachats du lendemain matin dès son réveil qu'il apportera au laboratoire ;

Au deuxième jour, il remet les crachats du matin au laboratoire et recueille sur place le troisième échantillon.

Le recueil du premier échantillon est supervisé par l'agent qui a consulté le malade et le troisième par le technicien de laboratoire afin de garantir une bonne qualité de l'expectoration (volume de 2 à 5 ml contenant une parcelle purulente). Le recueil du deuxième échantillon, celui du matin, n'est pas supervisé par un agent de santé.

La conservation des crachats avant l'examen de bacilloscopie est possible pendant trois jours à l'air ambiant et sept jours au réfrigérateur (+4°C à 8°C). Pour la culture, il est recommandé de conserver les échantillons au frais (+4°C à 8°C) et de l'envoyer au laboratoire de mycobactériologie le plus tôt possible.

En cas d'incapacité d'expectorer (enfant de moins de 7 ans, malades grabataire...), on peut recourir à un tubage gastrique trois jours de suite pour recueillir les sécrétions bronchiques

dégluties au cours de la nuit. Il se fait au réveil avant le lever du lit à l'aide d'une sonde nasogastrique.

II.5.2.2 Microscopie optique

Après confection, fixation et coloration des frottis par la méthode de Ziehl-Neelsen à chaud, on procède à la lecture des lames au microscope optique. Les BAAR apparaissent en bâtonnets rouges sur fond bleu clair.

II.5.2.3 Microscopie à fluorescence

Elle permet d'explorer cinq (05) fois plus de lames que la microscopie classique à immersion, dans le même temps et avec une sensibilité égale ou supérieure. Il faut lire 100 champs microscopiques, soit une longueur de frottis avant de déclarer une lame négative. La lecture en chambre noire ou sombre (lumière éteinte) est recommandée. Le suivi de la microscopie à fluorescence impose de relever hebdomadairement le nombre d'heures de fonctionnement de la lampe. Son coût est très élevé, et son entretien délicat. Les BAAR fluorescents émettent une lumière jaune et apparaissent comme de petits traits brillants sur fond sombre.

Que ça soit la microscopie optique ou à fluorescence, deux résultats de frottis positifs imposent de commencer le traitement antituberculeux. Un seul résultat de frottis positif chez la PvVIH est considéré comme positif et impose de démarrer le traitement antituberculeux [14].

II.5.2.4 Culture

La culture ne peut pas être utilisée comme méthode de dépistage de masse, mais sa place est primordiale dans la prise en charge adéquate des cas chroniques de tuberculose. Elle est aussi importante au niveau du programme national pour l'étude de l'écologie des mycobactéries, leur sensibilité aux antituberculeux et le diagnostic des tuberculoses pauci bacillaires. Cette activité est généralement réservée aux laboratoires de référence.

II.5.3 Diagnostic radiographique

Il n'est pas spécifique de la tuberculose, car d'autres affections de l'appareil respiratoire peuvent ressembler à la tuberculose sur le cliché radiologique et la tuberculose pulmonaire peut se présenter sous forme d'anomalies radiologiques variées.

Cependant, la radiographie pulmonaire concourt au diagnostic des TPM- dont la proportion devient de plus en plus importante en raison de l'infection par le VIH.

II.5.4 Intra Dermo Réaction à la tuberculine (IDR)

Généralement chez les enfants de moins de 5 ans. L'existence d'une réaction positive à la tuberculine ne signifie pas la présence d'une tuberculose évolutive mais seulement que l'organisme testé a déjà été en contact avec le BK (ou le BCG) et sait le reconnaître.

II.5.5 Fibroscopie bronchique

Elle permet de mettre en évidence des lésions endobronchiques évocatrices de tuberculose et de réaliser des prélèvements à visée diagnostique (aspiration bronchique, lavage broncho-alvéolaire et biopsie bronchique).

II.6 Diagnostic des tuberculoses extra-pulmonaires

On entend par tuberculose extra pulmonaire toute autre localisation de la maladie en dehors du parenchyme pulmonaire. La TEP est plus courante chez les patients VIH positifs. C'est le cas de la tuberculose des séreuses (plèvre, péricarde, péritoine...), de la tuberculose ganglionnaire, ostéoarticulaire, cutanée, etc. Elles sont en général non contagieuses. Dans le cas de TEP, il faut systématiquement rechercher une TB pulmonaire associée à travers l'examen des crachats.

Le diagnostic de ces tuberculoses relève des spécialités concernées et repose sur des arguments cliniques, biologiques, radiologiques, histologiques et parfois bactériologiques. Un diagnostic certain de ces localisations est souvent difficile à obtenir [14].

II.7 Mesures de prévention et mode de traitement de la tuberculose

II.7.1 Mesures de prévention

Le principal moyen de prévention demeure la vaccination au Bacille de Calmette et Guérin (BCG) qui est un vaccin fait de bacilles vivants atténués. La couverture par le BCG a peu d'impact sur la transmission de la tuberculose (effet indirect), et donc sur le risque annuel d'infection.

En dehors du vaccin au BCG, il existe aussi d'autres moyens de prévention tels que l'amélioration du niveau de vie, le dépistage et le traitement des malades contagieux, la chimio prévention qui s'adresse aux sujets exposés mais non encore infectés, et la chimio prophylaxie qui s'adresse aux sujets déjà infectés mais non encore malades [14].

II.7.2 Mode de traitement

Devant un tableau clinique évocateur de tuberculose, le médecin praticien entreprendra des examens cliniques, radiologiques, bactériologiques et/ou anatomo-pathologiques pour un diagnostic de certitude qui permettra la mise sous traitement antituberculeux. Le traitement antituberculeux a pour but de guérir les patients, rompre la chaîne de transmission des BK, éviter les complications et les rechutes. Le traitement n'est pas toujours efficace, à cause des difficultés causées par la co-infection VIH-TB, et surtout les différentes formes de tuberculose résistante. Pour cela avant de commencer le traitement, il est nécessaire d'effectuer un test VIH.

Durant le traitement, une carte de traitement est remise au malade pour son suivi thérapeutique, dans cette même visée une fiche clinique est créée au niveau de la structure sanitaire traitante [14].

II.7.3 Les régimes thérapeutiques

Le schéma de traitement est identique quelque soit la forme de TB. Au cours des régimes thérapeutiques, on a un traitement de 1^{ère} ligne qui se traduit par le schéma : 2 (RHZE) / 4 (RH), et s'étend sur une période de 6 mois divisée en 2 phases, et un traitement de 2^e ligne ou retraitement avec le schéma : 2 S (RHZE) / 1(RHZE) / 5 (RHE), appliqué sur une période de huit (08) mois. La stratégie adoptée est la DOTS.

II.7.4 Les médicaments antituberculeux

II.7.4.1 Les médicaments antituberculeux de première ligne

Ces médicaments sont au nombre de cinq (05) dont ; la Rifampicine, l'Isoniazide, la Streptomycine, l'Ethambutol, la Pyrazinamide. Ils sont utilisés soit sous forme simple ou sous forme combinée à dose fixe [7].

Médicament	Code	Forme	Posologie habituelle minimum et maximale (mg/kg)
Isoniazide	H	Comprimé	5 (4-6)
Rifampicine	R	Comprimé	10 (8-12)
Streptomycine	S	Injectable	15 (12-18)
Ethambutol	E	Comprimé	20 (15-20)
Pyrazinamide	Z	Comprimé	30 (20-30)

Ces médicaments sont utilisés sous deux présentations :

- Simples :
 - S 1 g ampoule injectable ;
 - E 400 mg comprimé (adulte) ;
 - Z 400 mg comprimé.

- Combinaisons à doses fixes :
 - RHZE 150/75/400/275 mg comprimé ;
 - RH 150/75 mg comprimé ;
 - RH 60/30 mg comprimé dispersible ;
 - RHZ 60/30/150 mg (pédiatrique) ;
 - RHE 150/75/275 mg comprimé.

L'avantage des médicaments combinés est d'éviter la monothérapie qui génère des résistances, de plus cela simplifie l'administration des médicaments au malade et la gestion des stocks.

II.7.4.2 Les médicaments antituberculeux de seconde ligne

Les médicaments dits de seconde ligne sont les aminoglycosides (kanamycine et amikacine), la cyclosérine, la térizidone, l'éthionamide, la prothionamide, la capréomycine, l'acide para-aminosalicylique, les fluoroquinolones (ofloxacin, lévofloxacin, gatifloxacin et noxifloxacin) [14].

III. LES OBJECTIFS DE L'ETUDE

III.1 Objectif général

Contribuer à remettre en place et optimiser les méthodes mycobactériologiques conventionnelles de mesure de la résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux antituberculeux au laboratoire de mycobactériologie du Centre Muraz.

III.2 Objectifs spécifiques

- Contribuer à la préparation des milieux de culture de *M.tuberculosis*.
- Contribuer à l'isolement et à l'identification des souches de *M.tuberculosis*.
- Contribuer à diminuer le taux de contamination des cultures.
- Contribuer à la réalisation des tests de sensibilité aux antituberculeux.

IV. MATERIEL ET METHODES

La mise en place et l'optimisation des méthodes microbiologiques de mesure de la résistance de *M. tuberculosis* aux antituberculeux va consister à établir des procédures standards opérationnelles (PSO ou SOP) et à les appliquer à la lettre. Ces procédures incluent des contrôles de qualité interne et externe afin d'avoir des résultats fiables et des taux de contaminations acceptables. Les techniques de microscopie selon la méthode de Ziehl Neelsen à chaud, de préparation des milieux de culture de Loewenstein Jensen, de mise en culture des prélèvements selon la méthode de Petroff, de l'identification biochimique des mycobactéries et de mesure de la sensibilité aux antituberculeux selon la méthode des proportions ont été mises en place et ou optimisées. Ci-dessous détaillées le matériel et les procédures des différentes techniques utilisées dans cette étude.

IV.1 La microscopie optique

IV.1.1 Coloration du frottis

Matériels

- Pincettes métalliques
- Entonnoirs en plastiques
- Une pissette contenant de l'eau de robinet
- Trois pissettes contenant chacune un réactif de Ziehl-Neelsen
 - Fuchsine phéniquée de Ziehl
 - Solution de bleu de méthylène
 - Acide-alcool
- Papier filtre
- Minuterie
- Porte-lames (râteliers)
- Evier avec 2 barres métalliques
- Coton cardé ou lampe à alcool
- Eponge
- Eau de javel
- Ajax en poudre

Mode opératoire

• Coloration par la fuchsine

- Placer la lame fixée sur la barre métallique au dessus de l'évier, le frottis tourné vers le haut ;
- Recouvrir le frottis de la solution de la fuchsine phéniquée filtrée;
- Chauffer la lame par le dessous au moyen d'une flamme (coton cardé imbibé d'alcool), jusqu'à l'émission de fines vapeurs. Ne jamais aller jusqu'à ébullition ;
- Laisser la lame recouverte d'une solution chaude ou fumante de fuchsine pendant 5 mn ;
- Rejeter le colorant et rincer le frottis à l'eau du robinet puis laisser la lame recouverte d'eau jusqu'à l'étape suivante ;

• Décoloration par la solution d'alcool-acide

- Rejeter l'eau qui couvre la lame ;
- Faire couler doucement la solution d'acide-alcool à l'aide de la pissette ;
- Arrêter la décoloration dès que la solution décolorante devient incolore ;
- Rincer le frottis à l'eau du robinet puis laisser la lame recouverte d'eau jusqu'à l'étape suivante ;

• Contre coloration par la solution de bleu de méthylène

- Rejeter l'eau qui couvre la lame ;
- Recouvrir le frottis de la solution de bleu de méthylène ;
- Attendre une minute ;
- Rejeter le bleu de méthylène et rincer à l'eau de robinet ;
- Sécher le frottis à l'air ambiant (sur un râtelier) ;

IV.1.2 Lecture des frottis

Matériel nécessaire

- microscope binoculaire
- Huile à immersion
- Compresses stériles

- Lame-frottis colorés
- Cahier de paillasse
- Bic bleu et rouge (pour les résultats négatifs et positifs respectivement)
- Papier essuie tout

Mode opératoire

- Essuyer les parties optiques (objectifs, oculaires, condenseur) avec une compresse propre ;
- Allumer le microscope ;
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis ;
- Placer la lame sur la platine, le condensateur étant élevé le plus possible ;
- Faire la mise au point à l'objectif 100 et lire systématiquement champ par champ en allant de la périphérie vers le centre du frottis, en commençant par son coin supérieur gauche (lecture en créneau) ;
- Compter tous les BAAR sur 20, 100 ou 300 champs microscopiques selon la richesse du frottis ;
- Noter le nombre sur le cahier de paillasse à côté du numéro d'enregistrement de l'échantillon de crachats.

Résultats de l'examen et interprétation

Trois cas de figure peuvent se présenter :

- Le frottis est très riche et présente plusieurs bacilles par champ : lire une vingtaine de champs et faire la moyenne de bacilles par champ ;
- Le frottis est riche mais ne présente pas plus d'un bacille par champ, lire une longueur de frottis (100 champs). Noter ce nombre sur le cahier de paillasse. Exemple : 50 BAAR/100 champs ;
- Le nombre de bacilles dans 100 champs est inférieur à 10, lire alors trois longueurs de frottis (300 champs) au total et mentionner ce nombre sur le cahier de paillasse ; Exemples : 30 BAAR/ 300 champs ; 05 BAAR/300 champs ; 00 BAAR/300 champs ;

Les données chiffrées obtenues sont exprimées en croix en se référant au tableau de correspondance ci-dessous.

Nombre de BAAR comptés	Résultats	Interprétation
0 BAAR / 300 champs	NEG	Frottis négatif
1 - 9 BAAR / 300 champs	1 – 9 (noter le chiffre exact)	Frottis faiblement positif
10 - 100 BAAR / 300 champs	+	Frottis positif
10 - 100 BAAR / 100 champs	++	Frottis riche
> 1 BAAR / champ	+++	Frottis très riche

- Reporter les résultats sur le bulletin du malade dans la partie réservée au laboratoire, sur le registre de la tuberculose du laboratoire et sur la feuille de paillasse ;
- Remettre les bulletins des malades ayant terminés leur série d'examen au secrétariat ;
- Dégraisser les lames lues sur le papier essuie tout ;
- Les ranger dans une boîte à lames suivant leurs numéros d'enregistrement pour le contrôle externe de qualité par le Programme National de lutte contre la Tuberculose.

IV.2 Préparation des milieux de culture

La préparation des milieux de culture de Löewenstein-Jensen se fait généralement en deux jours.

Exemple : pour un volume de 1600 ml, soit 600 ml de milieu de base et 1000 ml d'œufs battus (20 à 24 œufs).

Matériel nécessaire

- Milieu de base de Löewenstein Jensen
- Solution de glycérol
- Ballons de 3l

- Eau distillée
- Billes de verre de 7 mm de diamètre
- Pipettes de 10 ml
- Eprouvettes de 500 ml et de 100 ml
- Coton cardé
- Papier aluminium
- Balance de précision
- Spatule
- Plaque chauffante
- 3 Casseroles
- Autoclave
- Réfrigérateur
- Un cristalliseur (pour casser les œufs),
- Un bécher de 400 ml (pour mettre les œufs un à un),
- Une éprouvette de 1000 ml,
- Un entonnoir et le dispositif de distribution (voir plus loin),
- Un ou plusieurs erlenmeyers
- Compresses stériles
- Des œufs
- Alcool à 90°
- Paniers en acier
- Marqueurs et étiquettes

- Un coagulateur
- Hotte
- Papiers joseph
- Tubes en verre de 22 mm de diamètre
- le dispositif de distribution
- un mixeur bol Waring
- eau de Javel
- pyruvate de sodium

IV.2.1 Le premier jour (J1)

IV.2.1.1 Mise en solution du milieu de base de Löewenstein Jensen

- Dans un ballon de 3l, mettre environ 50 billes de verre de 7 mm de diamètre ;
- Mettre 500 ml d'eau distillée froide puis 12 ml de glycérol (DIFCO réf. : 5028217) ;
- Bien agiter ;
- Peser 37,2 g de milieu de base de Löewenstein-Jensen ;
- Mettre ces 37,2 g de milieu de base dans les 500 ml d'eau distillée stérile froide ;
- Laisser dissoudre en mélangeant doucement et rincer l'encolure du ballon avec l'eau distillée restante (100 ml) ;
- Placer le ballon contenant le mélange dans un bain-marie bouillant, et mélanger régulièrement jusqu'à ce que le mélange ne reste plus sur les parois du ballon ;
- Stériliser à 120°C pendant 15 minutes à l'autoclave ;
- Laisser refroidir, puis garder au réfrigérateur entre +4 et +8°C.

IV.2.1.2 Préparation et stérilisation du matériel nécessaire pour les manipulations de J2

- Stériliser à l'autoclave (120°C pendant 20 mn) : un cristalliseur, un bécher de 400 ml, une éprouvette de 1000 ml, un entonnoir, un ou plusieurs erlenmeyers, les tubes en verre de 22 mm de diamètre, un couteau ;
- Mettre l'embout du mixeur à l'alcool pendant une nuit entière.

IV.2.1.3 Traitement des œufs :

- Tremper les œufs dans l'eau pendant 30 minutes ;
- Laver avec une compresse stérile ;
- Puis tremper les œufs dans l'alcool à 90°C pendant une nuit entière (dans un grand cristalliseur dont le fond est tapissé de gaze) ;

IV.2.2 Le deuxième jour (J2)

IV.2.2.1 Traitement des œufs (suite)

- Se laver les mains au savon ;
- Se munir de gaze stérile (pour essuyer les œufs sortant de l'alcool) ;
- Sortir les œufs de l'alcool et les égoutter sur une gaze stérile ;
- Les casser un à un (en les cognant sur le bord du cristalliseur) ;
- Les mettre dans l'éprouvette jusqu'à atteindre un volume de 1000 ml ;

IV.2.2.2 Constitution et distribution du milieu de L.J.

- Verser les œufs dans le ballon contenant le milieu de base.
- Bien mixer à l'aide d'un mixeur : on obtient le milieu de Löwenstein-Jensen (L-J) ;
- Verser le milieu de L.J. dans un erlenmeyer ;
- Le distribuer, à l'aide d'un entonnoir muni d'un dispositif spécial (tuyaux de caoutchouc de diamètre divers, pipette pasteur et mince de MOHR) dans les tubes à essai avec bouchon à vis à raison de 7 ml par tube ;
- Passer les tubes au coagulateur en position inclinée pendant 45 mn à 85°C ;
- Les sortir et les déposer sur la paille en les protégeant de la lumière ;
- Les conserver au réfrigérateur à + 4 °C ;

- Laver les différents récipients immédiatement après usage avec un détergent non corrosif.

NB : Les tubes de milieu L.J. ne doivent jamais être exposés à la lumière, ce qui entraînerait une modification de la couleur du milieu.

IV.2.2.3 Préparation du milieu de L.J. enrichi avec du pyruvate de sodium

Ex : préparation de 100 tubes de milieu de Löwenstein-Jensen enrichi avec 0,2 % de Pyruvate de sodium :

- Dans un erlenmeyer (1000 ml), mettre stérilement 600 ml de milieu de Löwenstein-Jensen (avec œufs mais avant coagulation).
- Ajouter stérilement 6 ml de pyruvate de sodium à 20 % (ampoule de 5 ml - Institut Pasteur réf. 62535 – à conserver à 4°C) ;
- Bien agiter et repartir en tube à raison de 7 ml par tube (voir plus haut) ;

IV.2.2.4 Préparation des milieux de culture additionnés d'antibiotiques.

Matériels à additionner au matériel de préparation des milieux de culture de L-J simple

- La streptomycine
- La rifampicine
- L'isoniazide
- L'éthambutol
- T.C.H : hydrazide de l'acide thiophène 2 carboxylique
- Ballons de 100 ml
- Pipetteur pipette boy

- Bain marie
- Eau distillée stérile
- Flacons stériles de 2 l
- éthylène glycol ou DMSO
- étuve

Préparation de un litre de milieu de L.J. additionné d'isoniazide à 0.2mg/L

- Peser 10 mg d'isoniazide en poudre et les dissoudre dans 10 ml d'eau distillée stérile pour obtenir une solution de 1000 mg/L : Solution A ;
- Prendre 5 ml de la solution A et diluer dans 45 ml d'eau distillée stérile pour obtenir la Solution B à 100 mg/L ;
- Prendre 5 ml de la Solution B et diluer dans 45 ml d'eau distillée stérile pour obtenir la Solution C à 10 mg/L ;
- Prendre 20 ml de la Solution C, les ajouter stérilement à 1 litre de milieu de L.J. avant coagulation. Bien homogénéiser avant distribution dans les tubes à raison de 7 ml par tube ;
- Coaguler en position inclinée à 85°C pendant 45 minutes ;
- Les tubes de milieux sont étiquetés et conservés à + 4° C ;

Préparation de 1 litre de milieu L- J additionné de rifampicine à 40 mg/L

- Préparer 5 ml d'éthylène glycol dans un ballon stérile de 50 ml ;
- Peser avec précision 40 mg de rifampicine en poudre pure ;
- Verser les 40 mg de poudre de rifampicine dans l'éthylène glycol ;
- Placer le tout à l'étuve pendant 24 h pour permettre la dissolution de la rifampicine dans l'éthylène glycol (agiter de temps en autre) ;
- Ajouter ensuite 20 ml d'eau distillée stérile et agiter ;
- Verser le tout dans 1 litre de milieu de L.J. répartir dans des tubes à vis à raison de 7 ml/ tube ;
- Coaguler en position inclinée à 85°C pendant 45 minutes ;
- Les tubes de milieux sont étiquetés et conservés à + 4° C ;

N.B. : Au bout de 24 heures d'étuve, si la poudre de rifampicine n'a pas été entièrement dissoute dans l'éthylène glycol, agiter encore quelques secondes et remettre à l'étuve quelques heures jusqu'à dissolution complète avant d'ajouter les 20 ml d'eau distillée.

Préparation de 1 litre de milieu L- J additionné streptomycine à 4mg/L

- Peser 10 mg de sulfate de dihydro-streptomycine en poudre et les dissoudre dans 10 ml d'eau distillée stérile ;
- On obtient une solution à titrer à 1000 mg/L (solution A) ;
- Prendre 4 ml de la solution A dans 36 ml d'eau distillée stérile. On obtient une solution B titrée à 100 mg/L ;
- Ajouter les 40 ml de la solution B dans un litre de milieu L.J. Répartir dans des tubes à vis stériles à raison de 7 ml/ tube ;
- Coaguler en position inclinée à 85°C pendant 45 minutes ;
- Les tubes de milieux sont étiquetés et conservés à +4°C ;

Préparation pour un litre de milieu L-J additionné d'éthambutol à 2 µg/L

- Peser 10 mg de chlorhydrate d'éthambutol en poudre et les dissoudre dans 10 ml d'eau distillée stérile pour obtenir une solution de concentration égale à 1000 µg/ml (solution A).
- Prendre 5 ml de la solution A dans 45 ml d'eau distillée stérile pour obtenir la solution B de concentration 100 µg/ml ;
- Prendre 20 ml de la solution B pour 1 litre de milieu L.J ;
- Répartir dans des tubes à vis stériles à raison de 7 ml de milieu par tube ;
- Coaguler en position inclinée à 85°C pendant 45 minutes ;
- Les tubes de milieux sont étiquetés et conservés à + 4°C.

Préparation pour un litre de milieu Löwenstein-Jensen additionné de TCH à 5 mg/L

- Peser 25 mg de TCH ;
- Ajouter 20 ml d'eau distillée stérile ;
- Mettre au bain marie à 45°C pendant 30 minutes ;
- Jusqu'à parfaite dissolution ;
- La solution obtenue est à 1250 mg/L ;
- Ajouter 4 ml de cette solution à 1000 ml de Löwenstein-Jensen ;

- La concentration finale est à 5 mg/L ;
- Répartir dans des tubes à vis stériles à raison de 7 ml de milieu par tube ;
- Coaguler en position inclinée à 85°C pendant 45 minutes ;
- Les tubes de milieux sont étiquetés et conservés à + 4°C.

IV.2.3 Contrôle des milieux

Un contrôle des milieux est fait chaque fois qu'un lot est fabriqué.

IV.2.3.1 Contrôle macroscopique

A vérifier après la coagulation

- Milieu mou : impropre
- Milieu de couleur bleu : pH acide
- Milieu de couleur jaune : pH basique

IV.2.3.2 Contrôle de stérilité

Procédure technique

- Mettre une série de tubes à l'étuve à 37° C pendant 3 jours ;
- Regarder les tubes au 3^e jour pour déceler les éventuelles contaminations.

Interprétation des résultats

- Absence de pousses avec milieux intacts = milieux stériles ;
- Présence de pousses ou milieux liquéfiés = milieux contaminés.

IV.2.3.3 Contrôle de l'activité des antibiotiques et de la technique

Un contrôle des milieux est fait chaque fois qu'un nouveau lot est fabriqué. Les nouveaux lots sont testés sur une souche sensible de référence H 37 RV, une souche sauvage résistante aux antibiotiques majeurs : INH, SM, Rif, EMB. On peut ainsi déceler les erreurs de concentration d'antibiotique dans le milieu et en tenir compte pour l'interprétation. Les souches ayant été testées sur milieu défectueux sont retestées avec le lot de fabrication suivant.

Matériel nécessaire

- 1 souche sensible de référence, H 37 RV
- 1 souche sauvage connue comme étant résistante aux drogues majeures
- 4 ballons de verre de 50 ml contenant une vingtaine de billes de verre stériles
- 24 tubes de 22 mm
- Pipettes graduées de 1 ou 2 ml
- Pipettes graduées de 10 ou 20 ml
- Pipettes pasteurs
- 1 spatule
- Eau distillée stérile

Procédure technique :

Identique à un antibiogramme classique (méthode des proportions de Canetti, France).

Interprétation des résultats :

- Souche H37RV déterminée sensible à tous les antibiotiques et la souche résistante déterminée comme telle = bon dosage de la concentration d'antibiotique et technique bien réalisée ;
- Souche H37RV déterminée résistante et/ou la souche résistante déterminée comme sensible à n'importe quel antibiotique = mauvais dosage de la concentration d'antibiotique et/ou technique mal réalisée.

IV.3 La culture selon la méthode à la soude sans neutralisation de Petroff

Matériels et réactifs

- Tubes à centrifuger en plastique à vis de 50 ml
- Marqueurs
- Centrifugeuse
- Balance Roberval

- Agitateur de Kahn
- Etuve
- Clayettes
- Hotte à flux laminaire
- Gants en latex
- Papiers joseph
- Milieux de culture de Loewenstein-Jensen
- Milieux de culture de Loewenstein-Jensen avec 0,2% de pyruvate de sodium
- Echantillons de crachats
- Vortex
- Blouse blanche
- Eau distillée stérile
- Pipettes pasteurs stériles
- Bocal en verre contenant de l'eau de Javel
- Lames porte objet neuves
- Crayon diamant
- Râteliers
- Portoirs pour tubes de 22 mm de diamètre
- Autoclave
- Portoirs pour tubes à centrifuger coniques
- Sachet autoclavable
- Papier essuie tout

- Solution décontaminante de soude à 4%
 - Hydroxyde de sodium pur en pastilles4 g
 - Eau distillée stérile.....100 ml

Mode opératoire

- Identifier les échantillons de crachats sur le corps des tubes coniques de 50 ml à l'aide d'un marqueur indélébile ;
- Mettre un volume donné de crachats (ex : 2 cc) dans le tube à centrifuger de 50 ml en plastique à vis ;
- Y ajouter de la soude à 4% (le volume de soude est fonction de la viscosité du crachat) ;
- Fermer hermétiquement le tube contenant le crachat plus la solution de soude ;
- Agiter vigoureusement au vortex jusqu'à parfait mélange ;
- Porter à l'étuve à 37°C ou agiter sur agitateur de Kahn pendant 15 à 20 minutes ;
- Ajouter une quantité suffisante d'eau distillée stérile au mélange crachat-soude ;
- Fermer hermétiquement le tube et agiter vigoureusement au vortex jusqu'à parfait mélange ;
- Centrifuger à 3000 trs/mn pendant 20 minutes;
- Verser le surnageant à la fin de la centrifugation dans un bocal contenant de l'eau de javel ;
- Ajouter une quantité suffisante d'eau distillée stérile au culot de centrifugation ;
- Fermer hermétiquement le tube, et agiter sur vortex jusqu'à parfait mélange;
- Centrifuger à 3000 trs /mm pendant 20 mns.

- Verser le surnageant à la fin de la centrifugation dans un bocal contenant de l'eau de javel ;
- Ajouter une quantité suffisante d'eau distillée stérile au culot de centrifugation ;
- Fermer hermétiquement le tube, et agiter sur vortex jusqu'à parfait mélange;
- Centrifuger à 3000 trs/mm pendant 20 minutes ;
- Verser le surnageant à la fin de la centrifugation dans un bocal contenant de l'eau de javel, en laissant une petite quantité de surnageant sur le culot ;
- Remettre le culot en suspension à l'aide d'une pipette de transfert stérile;
- Ensemencer deux à quatre tubes de milieu à raison de 2 à 4 gouttes par tube pour chaque échantillon ;
- Faire un frottis sur la lame correspondante avec deux gouttes, pour chaque échantillon ;
- Placer les tubes sur une clayette et les incuber à l'étuve à moitié fermés.

NB : une grande attention doit être faite pour ne pas dépasser les 20 minutes de contact entre la soude et les prélèvements, car un temps trop long entraîne un taux bas de culture positive.

Les procédés de décontamination sont choisis afin que le taux de contamination soit compris entre 2 et 5 %.

Taux < 2 % = procédé trop agressif ;

Taux > 5 % = procédé trop doux.

Lecture des cultures

- Examiner les tubes au 3^{ème} jour d'incubation ;
- Fermer les tubes si le produit à sécher sur le milieu ;
- Noter également les cas de contamination éventuelles ;

- Examiner ensuite les tubes au 14^{ème}, 21^{ème}, 28^{ème} et au 42^{ème} jour ;
- Noter l'aspect et le nombre de colonies en cas de culture positive ;
- Noter que la culture est négative avec la date de lecture, si au 60^{ème} jour on n'observe aucune pousse ;
- Laisser les tubes à l'étuve pour 30 jours supplémentaires pour permettre la croissance de certaines mycobactéries à croissance difficile.

Expressions des résultats

Les résultats sont exprimés quantitativement suivant le tableau de lecture des cultures ci-dessous.

Nombres de colonies	Résultats
1 à 20 colonies	Noter le nombre
20 à 50 colonies	+
> 50 colonies bien séparées	++
Nombreuses colonies semi-confluentes	+++
Très nombreuses colonies confluentes	++++

IV.4 L'identification : tests biochimiques

Matériels nécessaires

- Hotte à flux laminaire
- Tubes à hémolyse
- Coton cardée
- Portoir pour tubes à hémolyse
- Eau distillée stérile
- Papier buvard

- Sachet poubelle autoclavable
- Etuve
- Clayettes pour tube contenant les colonies de mycobactéries
- Portoir contenant les tubes à tester
- Papier Joseph
- Gants en latex
- Blouse blanche
- Crachoir contenant de l'eau de javel
- Anse jetables jaunes
- Pipettes stériles et/ou pipettes Pasteur stériles
- Bain-marie
- Flacon stérile
- Epruvette à pied
- Autoclave
- Cahier de pailleasse et marqueurs
- Tubes à hémolyse
- Registre pour identification
- Marqueurs et bics
- Minuterie

IV.4.1 Test à la Niacine

Le test standard mis au point par Konno utilisant du bromure de cyanogène, malgré ses performances a été abandonné à cause de la toxicité du bromure de cyanogène.

Les réactifs utilisés de nos jours sont des bandelettes.

Principe : Toutes les mycobactéries produisent de la niacine ribonucléotide. Cependant, virtuellement toutes les souches de *Mycobacterium tuberculosis* de *Mycobacterium simiae* et certaines souches de *Mycobacterium chelonae* ne possèdent pas les enzymes nécessaires à la conversion de la niacine en nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). La niacine alors s'accumule dans les milieux de culture et peut être extraite par de l'eau distillée stérile.

L'extrait est placé dans un tube à hémolyse dans lequel on introduit la bandelette de recherche de la niacine.

Réactifs :

- Bandelettes de niacine
- Eau distillée stérile

Technique :

- Verser sur la surface de milieu contenant une culture abondante 1,5 ml d'eau distillée stérile ;
- Poignarder la pente avec le bout d'une pipette pasteur stérile afin de permettre à l'eau de pénétrer la pente ;
- Incliner le tube pour que l'eau couvre la pente du milieu et le laisser pendant 20 à 30 minutes dans cette position ;
- Tourner le tube (la face vers le bas) et prélever 0,6 ml de liquide et les placer dans un tube à hémolyse ;
- Déposer une bandelette dans le tube contenant le liquide, la pointe de la flèche de la bandelette tournée vers le haut ;
- Fermer le tube contenant la bandelette avec du coton stérile ;
- agiter doucement immédiatement et après 5 et 10 minutes ;
- Après 15 à 20 minutes et pas plus de 30 minutes, faire la lecture du test.

Résultats :

- Le développement d'une coloration jaune indique un test positif.
- Si la solution reste incolore, la réaction est négative.

Tubes témoins

- Témoin positif : coloration jaune avec une culture de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Témoin négatif : eau qui reste incolore.

NB : Si une culture ressemble à *Mycobacterium tuberculosis* et le test de la niacine est négatif, l'incuber de nouveau pour 2 à 4 semaines et reprendre le test.

IV.4.2 Test au Nitrate

Principe : Les mycobactéries qui produisent de la nitro-réductase sont capables de catalyser la réduction du nitrate en nitrite. Le nitrate produit en présence d'acide donne de l'acide nitreux qui au contact de l'alpha-naphtylamine forme un composé rouge.

Réactifs

- Solution de nitrate de sodium à 0.085 % stérilisée à l'autoclave (120°C, 15 mn)
- Réactifs de Griess-Ilosvay (Réactif I, Réactif II)

Procédure :

- Dans un tube à hémolyse contenant 2 gouttes d'eau distillée stérile, introduire 10 µg (une spatule pleine) de culture jeune et abondante de mycobactéries ;
- Ajouter 2 ml de la solution de nitrate de sodium ;
- Fermer le tube et incuber à l'étuve à 37°C pendant 2 heures ;
- Ajouter 2 à 3 gouttes de réactif I puis 2 à 3 gouttes du réactif II ;

Lecture :

- Examiner les tubes immédiatement ;
- Noter l'apparition ou non de coloration.

Résultats :

- Réaction positive : La coloration rose franc à rouge est le résultat de la réduction des nitrates en nitrites par la nitrate réductase.
- Une coloration rose pale est à considérer comme négative.

- Si pas de coloration, ajouter une pincée de poudre de zinc : le zinc réduit les nitrates encore présent en nitrites, une coloration rose apparait ; la réaction est négative (bactéries sans nitrate réductase).
- Si au contraire, la teinte du milieu reste inchangée, le stade nitrite a été dépassé (bactéries ayant une nitrate réductase très active), la réaction est alors considérée comme positive.

Tubes témoins

- Témoin positif : coloration rose franc à rouge avec une culture de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Témoin négatif : eau distillée qui reste incolore.

IV.4.3 Recherche de la production de la catalase à 22°C et 68°C

Principe : La catalase décompose le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) en eau et en oxygène qui apparait sous forme de bulles.

Certaines formes de catalases sont inactivées par le chauffage à 68°C pendant 20 minutes, une réaction qui caractérise certaines espèces de mycobactéries.

Réactifs :

- Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)
- eau distillée stérile

Procédure

- Prendre deux tubes à hémolyse et inscrire sur les parois des tubes le numéro de la souche à identifier ;
- Marquer sur le 1^{er} tube 22 pour la catalase à 22°C et 68 sur le second pour la catalase à 68°C ;
- Mettre dans chaque tube 2 gouttes d'eau distillée stérile ;

- Introduire 10 µg (une spatule pleine) de culture jeune et abondante de mycobactéries dans chaque tube ;
- Fermer les tubes avec du coton stérile ;
- Porter le tube 68 au bain marie à 68°C pendant 20 minutes et laisser le tube 22 sur la paillasse pour la même durée ;
- Laisser refroidir le tube 68.
- Ajouter 1 ml du réactif dans chaque tube.

Lecture et interprétation des résultats

Lecture

- Examiner les tubes après 15 minutes de contact ;
- Noter le dégagement gazeux.

Interprétation des résultats

- Hauteur de mousse de 1 à 5 mm ou plus = réaction positive ;
- Simple couronne de mousse = réaction douteuse (+ /-) ;
- Pas de mousse = réaction négative (-).

NB : Les tests de la Catalase et au Nitrate (28^{ième} jour) se font à des jours différents de celui de la Niacine (42^{ième} jour).

IV.4.4 Croissance sur TCH

Ensemencer lors de l'antibiogramme (méthode des proportions de Canetti, France) avec les différentes dilutions, des tubes contenant du TCH à la concentration de 2 mg/l et des tubes sans antibiotiques (tubes témoins).

Lecture et interprétation des résultats

Lecture

- Compter le nombre de colonies après 28 jours sur les tubes contenant le TCH et sur les tubes témoins ;
- Déduire la proportion de mutants résistants au TCH.

Interprétation des résultats

- La souche est sensible au TCH si la proportion de mutants résistants est inférieure à 1 % ;
- La souche est résistante au TCH si la proportion de mutants résistants est supérieure ou égale à 1 % ;
- Si la souche est sensible il ne s'agit pas de *Mycobacterium Tuberculosis* ;
- Si la souche est résistante il s'agit de *Mycobacterium Tuberculosis*.

Contrôle de qualité

- Pour chaque lot de milieu de L.J. contenant du TCH, réaliser un test avec une souche de *Mycobacterium tuberculosis* ;
- Réaliser aussi un test de sensibilité avec une souche de *Mycobacterium bovis* ;

Interprétation des résultats

- Le milieu est de bonne qualité si la souche de *Mycobacterium tuberculosis* pousse et celle de *Mycobacterium bovis* ne pousse pas.

- Si les résultats du contrôle de qualité ne sont pas satisfaisants, tous les tests réalisés avec le même lot de milieu ne sont pas interprétables, éliminer le lot de milieu.

Répéter le test avec un nouveau lot de milieu de L.J. contenant du TCH pour chacune des souches préalablement testées.

Tableau récapitulatif des tests biochimiques : clés d'identification

	Niacine	Nitrate	Catalase 22°C	Catalase 68°C	TCH
<i>M.tuberculosis</i>	+++	+	+	-	+
<i>M.africanum</i>	+/-	+/-	+	-	+/-
<i>M.bovis</i>	-	-	+	-	-
M.non tuberculeuses	-	+/-	+++	+++	+

IV.5 Le test de sensibilité : méthode des proportions

Principe : le test a pour but d'évaluer la proportion de bacilles résistants qui existe dans une population de bacilles tuberculeux. Pour y parvenir, il doit indiquer le nombre total de bacilles viables et le nombre de bacilles résistants présents dans un inoculum donné.

Cette méthode consiste à ensemer des dilutions bacillaires choisies de telle façon qu'elles contiennent un nombre de bacilles suffisamment élevé pour être représentatif de la souche étudiée, et qu'elles permettent d'obtenir avec l'une ou l'autre dilution des colonies en nombre comptable.

Matériels nécessaires

- tubes de culture contenant des colonies de mycobactéries
- hotte à flux laminaire
- spatule de platine

- coton
- gants en latex
- blouse blanche
- papier Joseph
- autoclave
- billes de verre de 5 mm de diamètre
- ballons de 50 ou de 100 ml, ou tubes en verre de 22 mm de diamètre
- eau distillée stérile
- pipettes de 1, 2, 5 et 10 ml
- pipetteur pipette boy
- clayettes
- étuve
- étiquettes et marqueurs
- cahier de paillasse et registre d'antibiogramme
- Etalon Mac Farlan ou BCG
- réfrigérateur
- agitateur type vortex
- milieux de culture simple et imprégnés d'antibiotiques
- agenda pour la notation des dates de lecture des cultures

IV.5.1 Préparation de la suspension bacillaire

- Prélever avec une spatule de platine des parcelles d'un grand nombre de colonies ;
- Les mettre dans un tube à essai stérile contenant 20 à 30 billes de verre (de 5 mm de diamètre) ;
- Fermer le tube, puis agiter sur vortex pendant 20 à 30 secondes pour désagréger les colonies ;
- Ajouter 1 ml d'eau distillée stérile ;
- Fermer le tube, puis agiter sur vortex 10 à 15 secondes ;
- Ajouter 5 ml d'eau distillée stérile ;
- Fermer le tube, puis agiter sur vortex jusqu'à parfait mélange.

IV.5.2 Etalonnage

- Ajuster l'opacité de la suspension en ajoutant de l'eau distillée stérile, à l'opacité d'une suspension bacillaire contenant 1 mg de bacilles par ml.
- On obtient donc une suspension bacillaire contenant environ 1 mg de bacilles par ml appelée solution mère.

NB : L'étalon est une suspension de BCG. Il est conservé à + 4°C, mais doit être placé à la température du laboratoire 15 minutes avant emploi.

IV.5.3 Préparation des dilutions

- Dilution à 10^{-1} : ajouter 0,5 ml de la suspension mère à 4,5 ml d'eau distillée stérile.
 - Fermer le tube puis agiter au vortex jusqu'à parfait mélange ;
 - Dilution 10^{-3} : ajouter 0,1 ml de la suspension 10^{-1} à 9,9 ml d'eau distillée stérile.
 - Fermer le tube puis agiter au vortex jusqu'à parfait mélange ;
 - Dilution 10^{-5} : ajouter 0,1 ml de la suspension 10^{-3} à 9,9 ml d'eau distillée stérile.
 - Fermer le tube puis agiter au vortex jusqu'à parfait mélange ;
- NB : Il faut changer de pipette à chaque dilution, et il faut toujours mélanger une solution avant de prendre le volume à diluer.

IV.5.4 Ensemencement des milieux

- Ensemencer 0,2 ml de la suspension 10^{-1} sur 2 tubes témoins et 1 tube de chaque antibiotique ;
- Ensemencer 0,2 ml de la suspension 10^{-3} sur 2 tubes témoins et 1 tube de chaque antibiotique ;
- Ensemencer 0,2 ml de la suspension 10^{-5} sur 2 tubes témoins ;
- Ensemencer 0,2 ml de la suspension mère sur 2 tubes témoins ;
- Inonder la pente des différents milieux de culture ensemencés avec les inocula respectifs et fermés les tubes à moitié.

Les antibiotiques à tester comprennent :

- Isoniazide à 0,2 µg/ml

- Streptomycine à 4 µg/ml
- Rifampicine à 40 µg/ml
- Ethambutol à 2 µg/ml

Pour les besoins de l'identification des mycobactéries, on teste également la sensibilité des souches au TCH (hydrazide de l'acide thiophène 2 carboxylique) à la concentration de 2 mg/l.

IV.5.5 Incubation des cultures

- Après ensemencement, mettre les tubes à 37°C en position inclinée.
- Revisser les capuchons des tubes après 3 à 4 jours.

Lecture

- Examiner les tubes après 4 (28^e jour) et 6 semaines (42^e jour) d'incubation ;
- Compter le nombre de colonies apparues dans les tubes témoins et les tubes contenant les différents antibiotiques ;

Interprétation des tests de sensibilité

- Dédurre la proportion de bacilles résistants existant dans la population totale (rapport du nombre de bacilles résistants à chacun des antibiotiques R au nombre total de bacilles poussant sur les tubes témoins).

$$\% \text{ de R} = \text{Nombre de R} \times 100 / \text{population totale (S + R)}$$

- Comparer cette proportion avec la proportion critique adoptée pour chaque antibiotique.

NB : La proportion critique de mutants résistants représente la proportion bacillaire existant dans la population totale au delà de laquelle la souche étudiée peut être considérée comme résistante à l'antibiotique concerné.

La proportion critique est de **1%** pour les antibiotiques suivants : Isoniazide à 0,2 µg/ml, Streptomycine à 4 µg/ml, Rifampicine à 40 µg/ml, Ethambutol à 2 µg/ml.

V. RESULTATS

V.1 Résultats de la microscopie

Du 1^{er} janvier au 31 décembre 2009 nous avons reçu au laboratoire de Mycobactériologie du Centre Muraz 765 patients. Sur les 765 patients il y a 259 TPM+.

V.2 Résultats de la culture

Sur les 259 TPM+, 185 ont été mis en culture sur LJ et sur LJ+Pyruvate. Des 185 cultures effectuées, 56 ont été contaminées ou avaient des crachats insuffisants. Nous avons donc environs 30% de contamination ou de crachats insuffisants. Cent vingt neuf échantillons ont donné de bonnes pousses pour l'identification et l'étude de la sensibilité aux antituberculeux. Cependant nous n'avons identifié que 94 souches et réalisé 23 antibiogrammes.

V.3 Résultats de l'identification

Nous nous sommes limités à la recherche de nitrate réductase et de la catalase. Ces deux (02) tests nous permis de séparer les 94 souches en deux groupes: le Complexe *tuberculosis* d'une part et les mycobactéries atypiques d'autre part. On a les résultats suivants :

Complexe tuberculosis (<i>M.tuberculosis</i> , <i>M.bovis</i> , <i>M.africanum</i>)	Mycobactéries atypiques
90 (95. 7%)	04 (4. 3%)

V.4 Résultats des tests de sensibilité aux antituberculeux

Les antibiogrammes ont été réalisés en parallèle avec l'identification. Sur les 23 souches testées, une était une mycobactérie atypique, et les autres des mycobactéries du complexe tuberculosis.

La souche atypique était résistante à tous les antituberculeux testés.

Une souche du complexe tuberculosis était multirésistante c'est-à-dire résistante à la Rifampicine et à l'Isoniazide.

Des 21 souches restantes, une seule était mono résistante et plus particulièrement résistante à la Streptomycine. Les autres étaient sensibles à tous les 04 antituberculeux testés (Isoniazide, Streptomycine, Rifampicine et Ethambutol).

VI. DISCUSSION

La présente étude n'a pas pu porter sur l'ensemble des TPM+ car l'objectif de cette étude n'était pas d'avoir des taux de prévalence de la résistance aux antituberculeux mais plutôt de contribuer à mettre en place et à optimiser les méthodes classiques de mycobactériologie.

En effet, au début des mises en culture, les contaminations dépassaient largement les 50%. Mais elles ont été ramenées à des taux n'excédant pas 10% à la fin de l'étude, pour avoir un taux global d'environ 30%.

Pour en arriver, il a fallu augmenter la quantité de soude la décontamination et allonger le temps d'agitation.

En outre, le fait d'avoir une souche de mycobactéries atypiques et une souche MDR nous interpelle à double titre.

Primo, que les mycobactéries atypiques multirésistantes circulent dans nos communautés et constituent une vraie menace pour la santé des populations.

Secondo, que la stratégie DOTS a ses limites parce que les patients sont mis sous traitement sur la base de la bacilloscopie ou de la clinique. Ces patients étant porteurs de souches atypiques ou MDR ne pourront pas être guéris par les antituberculeux de première ligne. Cela constitue donc un gaspillage de ressources et un traumatisme pour le malade. D'où l'importance de développer des tests moléculaires rapides qui permettent de faire non seulement une discrimination entre mycobactéries du complexe tuberculosis et mycobactéries atypiques, mais aussi le diagnostic des tuberculoses dues aux bacilles résistants.

VII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La mise en place des méthodes classiques de mycobactériologie nécessite un travail méticuleux respectant les règles d'asepsie à toutes les étapes, depuis la préparation du matériel, des milieux de culture à la réalisation des tests de sensibilité en passant par l'identification.

Des contrôles doivent être faits sur toute la ligne afin de s'assurer de la qualité du travail.

La durée des méthodes classiques de mycobactériologie est un obstacle à une prise en charge rapide et efficace de certaines formes de tuberculoses. D'où la nécessité de développer des tests moléculaires rapides de diagnostic de ces formes de tuberculoses résistantes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1-Organisation Mondiale de la Santé. Tuberculose. Aide-mémoire N°104 ; Mai 2010. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/fr/>

2- Guide technique de prise en charge des cas de tuberculose pharmacorésistante au Burkina Faso, édition 2009.

3- Cavusoglu, C., Hilmioglu, S., Guneri, S., Bilgic, A. Characterization of rpoB Mutations in Rifampin-Resistant Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis from Turkey by DNA Sequencing and Line Probe Assay. J. Clin. Microbiol.2002 ; 40: 4435-4438

4-Zhang, Y. and Telenti, A. Genetics of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. In Molecular Genetics of Mycobacteria (Hatfull, G. F. & Jacobs, W. R., Eds) 2000; Chapter 15, pp. 235–54. ASM Press, Washington, DC, USA.

5- World Health Organization. Global tuberculosis control-epidemiology, strategy, financing. WHO Report 2009; WHO/HTM/TB/2009.411. Available at:

http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/en/index.html

6-DOTS: Un guide pour comprendre la stratégie DOTS contre la tuberculose recommandée par l'OMS. Genève, Organisation mondiale de la Santé (OMS/CDS/CPC/TB/ 99.270).

7- Ministère de la Santé, Programme national tuberculose, Guide technique de lutte contre la tuberculose, Burkina Faso : édition 2005.

8-Ledru S, Cauchoix B, Yaméogo M, Zoubga A, Lamandé-Chiron J, Portaels F, ChironJP. Impact of short-course therapy on tuberculosis drug resistance in South-West Burkina Faso. Tuber Lung Dis. 1996; 77(5):429-36.

9- G. Torrea, S. Diagbouga, R. Toé et al. Etude de la résistance aux antituberculeux au Burkina Faso. 1999. Résultats non publiés.

10- KASE ADONISE FLORE. Etude bibliographique de la tuberculose au Mali de 1982 à 2003. Thèse médecine Bamako 2004.

11-Huchon G. Tuberculoses et Mycobactérioses non tuberculeuses. Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), Pneumologie, 6-019-A-33, Maladies infectieuses, 8-038-C-10, 1997, 20 p.

12-Iseman MD. A clinician's guide to tuberculosis. Baltimore: Lippincott, Williams & Wilkins, 1999.

13-World Health Organization. Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. WHO Report 2008 WHO/HTM/TB/2008.393. Available at: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/download_centre/en/index.html

14- Guide technique de lutte antituberculeuse, Burkina Faso. Ed 2005.

15- Rapport global TB 2009.

16- CARBONNELLE B., DAILLOUX M., MAUGEIN J., PERNOT C. 2003. Cahier de formation biologie médicale. N° 29 : Mycobactéries mycobactérioses. Bioforma, 158 p.

17- GENTILINI M. Médecine Tropicale – tuberculose, 5e édition Ed. Flammarion, Paris, 1993.

18- Mani, C., Selvakumar, N., Narayanan, S. & Narayanan, P. R. Mutations in the rpoB gene of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from India. J Clin Microbiol 2001; 39, 2987–2990

19- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol. 1993; 31(2):175-8.

20- Chien H.P, Yu M.C, Wu M.H, Lin T.P, Luh K.T. Comparaison of BACTEC MGIT 960 with Löwnstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. International journal of tuberculosis and lung disease 2000, vol.4, n°9, pp. 866-870