

MINISTERE DES ENSEIGNEMENTS
SECONDAIRE ET SUPERIEUR

SECRETARIAT GENERAL

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO

**INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL
(IDR)**



MINISTERE DE LA SANTE

SECRETARIAT GENERAL

CENTRE MURAZ



Année académique 2011-2012

Mémoire N°...

**ETUDE DES RESISTANCES PRIMAIRE ET SECONDAIRE
DU COMPLEXE TUBERCULOSIS AUX ANTI-TUBERCULEUX DANS LA REGION
DES HAUTS-BASSINS**

MEMOIRE

Présenté et soutenu publiquement le 23 Juin 2014

**Pour l'obtention du diplôme de Master de Biologie Appliquée et de
Modélisation des Systèmes Biologiques**

Par

LOMPO Boampoundi Yipan Amélie

(Titulaire d'une Maîtrise en Biochimie option Microbiologie)

Jury

Président: Pr Adrien Marie Gaston BELEM

Membre: Dr Zékiba TARNAGDA, Maître de Recherche IRSS

Directeur de mémoire: Pr Georges A OUEDRAOGO, IDR Université Polytechnique de Bobo

Maître de stage: Dr Dezemon ZINGUE

LISTE DES SIGLES ET ABBREVIATIONS

AC : Anciens cas

BAAR : Bacille Acido-Alcool Résistant

BK: Bacille de Koch

CDT: Centre de Diagnostic et de Traitement de la Tuberculose

CHUSS : Centre Hospitalier Universitaire Souro Sanou

CRLAT : Centre Régional de Lutte Anti Tuberculose

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

LJ : Lowenstein-Jensen

MAC : Mycobactérie du Complexe *Avium intracellulare*

MDR : Multi Drug Resistant

mL : Millilitre

MNT : Mycobactéries Non Tuberculeuses

NC : Nouveaux Cas

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PNT : Programme National Tuberculose

SIDA : Syndrome d'Immuno Déficience Acquise

TPM+ : Tuberculose Pulmonaire à Microscopie Positive

TSM : Test de Sensibilité aux Médicaments

UV : Ultrat Violet

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Etat des connaissances sur la pharmacorésistance

Tableau II : Expression des résultats de lecture des frottis (microscopie ordinaire)

Tableau III : Résistance du complexe *tuberculosis* aux antituberculeux chez les patients nouveaux cas et chez les patients déjà traités (résistance primaire et secondaire).

Tableau IV : Résistance du complexe *tuberculosis* selon le type et le nombre d'antibiotique.

Tableau V : Répartition des patients en fonction du profil et du statut sérologique

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Bacille de Koch vu au microscope électronique [Demangeat C, 2013]

Figure 2 : Distribution des fréquences de la tuberculose multi résistante chez les patients nouveaux cas [Zignol M, 2011]

Figure 3 : Fréquence de la tuberculose multi résistante chez les patients ayant un antécédent de traitement [Zignol M, 2011]

Figure 4 : Localisation des sites de l'étude dans la région des Hauts Bassins

Figure 5 : Aspect de *Mycobacterium tuberculosis* après coloration [IPNC, 2012]

Figure 6 : préparation des dilutions

Figure 7 : Flow chart de l'étude sur la résistance du BK aux antituberculeux

Figure 8: Fréquence de la TB-MR selon le profil des patients

Figure 9 : Fréquence des VIH+ et VIH-

DEDICACES

Je dédie ce travail à mon Dieu tout puissant, à mon époux, à ma famille, à ma belle famille et à tous mes amis.

REMERCIEMENTS

Nous adressons nos remerciements :

A mon Directeur de mémoire Pr Georges Anicet OUEDRAOGO pour son soutien et sa disponibilité

Au président et aux membres du jury

A mon encadreur Dr Dezemon ZINGUE pour sa disponibilité et ses conseils

Au Dr Hervé Hien pour avoir accepté malgré son emploi de temps chargé de consacrer un temps précieux pour juger ce travail

A l'équipe tuberculose du Centre Muraz : Antoinette KABORE, Moumini NOUCTARA, Oumarou OUEDRAOGO, Mamoudou OUEDRAOGO, Adama SANOU, Zakaria GANAME, Sanata SESSOUMA pour leur disponibilité, leurs encouragements et leur soutien tout au long de mon séjour au sein de l'équipe

Au Dr Sylvie BATIONO, Dr Wielfried BAZIE et Souleymane SAKANDE pour leur disponibilité et l'aide apportée à la bio-statistique

A Joël ZOUNGRANA et Bazoma BAYILI pour leur aide dans la mise en forme de ce document

A toute la promotion du MASTER Biologie Appliquée et Modélisation du Système Biologique 2011-2012

A toutes les personnes qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail

Aux patients tuberculeux qui ont bien voulu se prêter à cette étude

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
INTRODUCTION ET ENONCE DU PROBLEME	4
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	
I. HISTORIQUE	7
II. TUBERCULOSE PHARMACORESISTANTE	8
II.1.Définitions de quelques termes	8
II.2.Epidémiologie	8
II.3.Diagnostic	10
II.3.1.Groupes cibles pour dépister la résistance aux antituberculeux.....	10
II.3.2.Tests de sensibilité aux médicaments	11
II.3.3.Les tests rapides	12
II.4.Traitement de la tuberculose pharmacorésistante	12
II.4.1.Schéma thérapeutique	13
II.4.2.Durée du traitement.....	13
III.GENERALITES SUR LES MYCOBACTERIES	14
III.1.Classification	14
III.1.1.Taxonomie	14
III.1.2.Classification	14
III.2.Caractéristiques.....	15
III.2.1.Caractères cultureux	15
III.2.2.Résistance aux agents physiques et chimiques.....	16
III.2.2.1.Agents physiques	16
III.2.2.2.Agents chimiques.....	16
III.2.3.Caractères biochimiques	16
III.2.3.1. Production d'acide nicotinique ou niacine.....	16
III.2.3.2. Réduction des nitrates en nitrites	17
III.2.3.3. Activité catalasique.....	17
III.2.3.4. Hydrolyse du tween 80	17
III.2.4. Physiopathologie.....	17
III.2.4.1. Complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
III.2.4.2. Mycobactéries atypiques.....	18

III.2.4.3. Mycobactéries des lèpres humaines et animales.....	19
IV.ETAT DE CONNAISSANCES SUR LA PHARMACORESISTANCE.....	20

DEUXIEME PARTIE : NOTRE ETUDE

I.OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	24
I.1.Objectif principal.....	24
I.2.Objectifs spécifiques	24
II.MATERIELS ET METHODES	26
II.1.Cadre d'étude	26
II.2.Type d'étude	27
II.3.Population d'étude et critères d'inclusion et de non inclusion	27
II.3.1.Critères d'inclusion	27
II.3.2.Critères de non inclusion.....	28
II.4.Echantillonnage	28
II.5.Technique et outils de collecte des données	28
II.5.1.Variables de l'étude.....	28
II.5.2.Technique de collecte des données	28
II.5.3.Outils de collecte	28
II.5.4.Matériels de laboratoire.....	28
II.6.Mode de collecte et acheminement des prélèvements	29
II.7.Analyse des échantillons et description des procédures	30
II.7.1.Examen microscopique direct	30
II.7.1.1.Etapes de la coloration Ziehl Neelsen	30
II.7.1.2.Expression des résultats de lecture des frottis.....	31
II.7.2.Traitement et mise en culture	31
II.7.3.Tests biochimiques d'identification	33
II.7.3.1.Test de réduction du nitrate.....	33
II.7.3.2.Recherche de la catalase à 22 ⁰ C et à 68 ⁰ C	34
II.7.4.Tests de sensibilité aux antibiotiques ou antibiogramme.....	35
II.7.5.Détermination de la sérologie VIH	37
II.8.Analyse statistique	39
II.8.1.Description de l'échantillon	39
II.8.2.Indicateurs mesurés	39

II.8.3. Autres analyses.....	39
II.9. Considération éthique et réglementaire.....	39
III. RESULTATS	41
III.1. Description de l'échantillon.....	41
III.2. Fréquence des résistances primaire et secondaire	42
III.3. Fréquence des résistances selon le type et le nombre d'antibiotique (mono résistance, poly résistance et tuberculose multi résistante)	42
III.4. Répartition des multi résistances (MR) en fonction de la sérologie.....	44
III.5. Comparaison des patients VIH selon le statut primaire et secondaire.....	45
IV. DISCUSSION.....	47
IV.1. Principaux résultats	47
IV.2. Limite de l'étude.....	47
IV.3. Description de l'échantillon	47
IV.4. Fréquence des résistances primaire et secondaire	48
IV.5. Fréquence des multi résistances (MR) primaire et secondaire.....	48
IV.6. Répartition des multi résistances en fonction de la sérologie.....	49
CONCLUSION.....	52
SUGGESTIONS	52
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	54

RESUME

L'étude avait pour but de déterminer la fréquence des résistances des souches du complexe *tuberculosis* aux antituberculeux chez les cas de tuberculose (TB) pulmonaire nouveaux ou antérieurement traités dans la région des Hauts-Bassins (Burkina Faso).

Il s'agissait d'une étude transversale descriptive qui s'est déroulée de janvier à décembre 2012. Les 195 souches de *M. tuberculosis* isolées chez des patients (187 nouveaux cas et 8 antérieurement traités) à microscopies positives ont été soumises au test de sensibilité aux antituberculeux selon la méthode des proportions. La sérologie VIH a été réalisée chez 177 nouveaux cas et 7 anciens cas.

Chez les nouveaux cas, 24,1% des souches testées étaient résistantes, 5,9% multirésistantes (TB-MR). La fréquence de résistance aux antituberculeux testés était plus élevée chez les cas ayant un antécédent de traitement (37,5%). La sérologie VIH était positive chez 9,2% des 184 patients consentants. Il n'existait pas de lien statistiquement significatif entre le statut VIH et la multi résistance aux médicaments chez les nouveaux cas ($P= 0,65$) et chez les anciens cas ($P= 0,42$).

La fréquence de résistance aux médicaments antituberculeux est élevée au Burkina Faso. Le diagnostic précoce des malades contagieux et l'administration d'un traitement adéquat sont indispensables. .

Mots clés : complexe *tuberculosis*, résistance, antituberculeux, VIH, Burkina Faso

ABSTRACT

The study aim was to determine *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance among newly diagnosed and previously treated cases in Hauts-Bassins region (Burkina Faso).

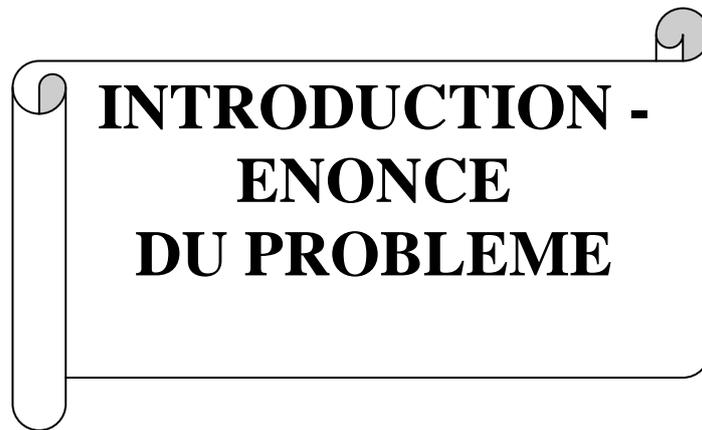
This descriptive study was done from January to December 2012. A total of 195 *M. tuberculosis* complex strains were isolated from 187 new and 8 previously treated patients. Susceptibility to drugs was determined using the proportion method. Human immunodeficiency virus (HIV) status was determined in 184 patients, 177 new and 7 previously treated cases, with informed consent.

Among new cases, 24.1% of strains were resistant to any drug, and 5.9% were multidrug-resistant (MDR). Resistance rate was very high in previously treated patients (37.5%). Of 184 patients tested, 9.2% were HIV-positive. There was no statistically significant association

between HIV status and MDR-TB in new ($P = 0.65$) and previously treated patients ($P = 0.42$).

The frequency of drug resistance is high in Burkina Faso. Early detection of infectious patients and administration of appropriate therapy are essential

Key words: complex *tuberculosis*, resistance, anti TB-drug, HIV, Burkina Faso



**INTRODUCTION -
ENONCE
DU PROBLEME**

INTRODUCTION ET ENONCE DU PROBLEME

La tuberculose est une maladie infectieuse, contagieuse causée dans l'immense majorité des cas par *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacille de Koch (BK) touchant environ 2 milliards de personnes selon le PNT [PNT, 2011]. L'ampleur du problème est accrue du fait de l'épidémie de l'infection par le VIH et de l'émergence de souches de *Mycobacterium tuberculosis* résistantes aux antituberculeux [Ouédraogo *et al.*, 2010]. En effet, la résistance aux antituberculeux, et en particulier la multi résistance est un vrai problème de santé publique [Raviglione *et al.*, 2000]. Ces nouvelles formes de la maladie résistantes aux traitements inquiètent la communauté scientifique et font craindre une épidémie insensible aux médicaments disponibles [RIIP, 2013]. Elles sont provoquées par une mutation génétique qui rend un médicament inefficace contre un bacille mutant. La résistance aux antituberculeux est responsable de 500 000 nouveaux cas par an [RIIP, 2013] dans le monde. Sa prise en charge s'avère être difficile car le traitement est complexe, très long et coûteux, avec moins de chance de guérison notamment pour les cas de tuberculose multi résistante (TB-MR) [Shao *et al.*, 2011]. En 2012, on estimait à 450 000 les nouveaux cas de TB-MR dans le monde dont 170 000 en sont morts [WHO, 2013]. Les résistances primaire et secondaire sont des indicateurs de performances des programmes de lutte contre la tuberculose. La situation est particulièrement grave en Afrique subsaharienne, où la forte prévalence du sida a favorisé la croissance exponentielle des cas de tuberculose et parmi lesquels figure une proportion inquiétante de multi résistants voire d'"ultrarésistants" [Vincent, 2012]. Actuellement, moins de 5% des cas de TB MR sont diagnostiqués du fait du manque de capacité de laboratoires suffisants pour cultiver *M.tuberculosis* et procéder à des tests de sensibilité aux médicaments (TSM), du manque d'infrastructure de laboratoire sûre et adéquate et du manque de personnel formé [OMS, 2009]. L'Afrique subsaharienne représente 14% de la charge globale pour les nouveaux cas de TB- MR [Migliori *et al.*, 2010]. La prescription incorrecte des schémas thérapeutiques, une adhésion thérapeutique déficiente, une distribution inadaptée des médicaments, un suivi insuffisant des malades, des médicaments de mauvaise qualité, une incapacité à assurer que les malades suivent les schémas thérapeutiques prescrits [OMS, 1997 ; Slim-Saïdi, 2009] sont entre autre les facteurs qui ont conduit à l'exacerbation de ce phénomène de résistance.

Au Burkina Faso l'ampleur du problème de la résistance du BK aux antituberculeux est insuffisamment documentée. Des 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 de Bobo-Dioulasso entre 1992 et 1994. Cette étude a montré la résistance primaire pour les souches du complexe *M. tuberculosis* suivantes : isoniazide 7,6 % ; ethambutol 1 % ; rifampicine 2,5 % ; streptomycine 12,4 % [Ledru *et al.*, 1996]. La seconde étude [Torrea *et al.*, 1999], a été réalisée en 2000, sur un nombre limité de malades tuberculeux (34 à Ouagadougou, 24 à Bobo-Dioulasso, 11 à Dori et 25 à Gorom-Gorom). Les antibiotiques testés étaient ceux utilisés par le PNT (isoniazide, streptomycine, rifampicine, ethambutol). Sur 75 souches dont les antibiogrammes étaient interprétables pour les 4 antibiotiques, 57 étaient sensibles à tous les antituberculeux et 18 présentaient des résistances à un ou plusieurs antibiotiques (3 souches). La distribution de cas avec des souches résistantes dans les 4 régions étudiées était la suivante : 5 / 34 (14,7%) à Ouagadougou, 7/24 (29%) à Bobo-Dioulasso, 2/11 (18%) à Dori, 4/25 (16%) à Gorom-Gorom. La troisième étude plus récente a été réalisée en 2005-2006. Cette étude montrée un taux de résistance primaire à au moins un médicament de 12.4% et 3,4% de TB-MR, la résistance secondaire était de 66,7% dont 50,5% de TB-MR [Sangaré *et al.*, 2010].

Des données récentes ne sont pas disponibles au BF sur les résistances chez les patients naïfs (nouveaux cas) et prétraités. Une surveillance des résistances peut guider les décideurs à définir des protocoles standardisés de chimiothérapie, [Sangaré *et al.*, 2010]. Notre étude a donc pour but d'évaluer les résistances des souches du complexe *tuberculosis* aux antituberculeux afin d'améliorer la prise en charge des patients.



**PREMIERE PARTIE :
GENERALITES**

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

I. Historique

Les bacilles de la tuberculose existaient il y a trois millions d'années. La souche originelle serait apparue en Afrique de l'Est, considérée comme le berceau de l'humanité. Dès l'Antiquité gréco-latine, plusieurs auteurs ont décrit une maladie amaigrissante au long cours, dénommée suivant les uns « phtisie » (pour dépérissement), suivant les autres « tabès ». Ainsi Hippocrate (V^e-IV^e siècle av. J.-C.) fait-il mention d'infections broncho-pulmonaires et pleurales à évolution très lente, parmi lesquelles les consommations d'origine thoracique occupent une place très importante. Il décrit aussi les autres formes de tuberculose, comme la forme osseuse et la forme ganglionnaire. Par la suite, Galien (II^e siècle apr. J.-C.) et Caelius Aurelianus (V^e siècle) distinguent également plusieurs des aspects cliniques de la maladie. En 1818, Laennec invente le stéthoscope qui va grandement faciliter le diagnostic de la tuberculose [OMS, 2013]. Aristote a soupçonné sa nature contagieuse, mais elle ne fut mise en évidence par A. Villemin qu'en 1865. En 1882 R. Koch isole le bacille tuberculeux humain : *Mycobacterium tuberculosis*. Maintenant il existe 70 espèces de *Mycobacterium*. De 1908 à 1920 A. Calmette et C. Guérin ont mis au point le BCG à partir d'une souche vivante atténuée de bacille tuberculeux bovin et il eut une vaccination à partir de 1921. En 1947 Waksman découvre le premier antibiotique actif sur le BK : la streptomycine qui permet, un an plus tard, la première guérison par antibiotique d'un malade gravement atteint de tuberculose. C'est en 1998 que le génome complet de *Mycobacterium tuberculosis* a été séquencé [Neidhardt, 2007; OMS, 2013].

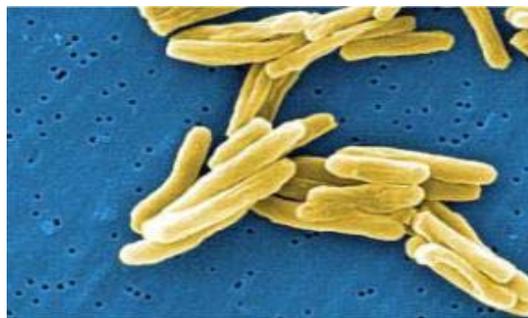


Figure 1 : Bacille de Koch vu au microscope électronique [Demangeat C, 2013]

II. Tuberculose pharmacorésistante

II.1. Définitions de quelques termes

Résistance primaire : La résistance primaire s'observe chez les malades n'ayant jamais été traités par des médicaments antituberculeux ou malades nouveaux cas [PNT, 2009].

Résistance secondaire ou acquise : La résistance secondaire ou acquise s'observe chez les malades ayant été traités auparavant par des médicaments antituberculeux ou malades anciens cas [PNT, 2009].

Mono résistance : Cas de tuberculose affectant des malades dont des isolats infectieux de *M. tuberculosis* présentent in vitro une résistance confirmée à un antituberculeux de première ligne [PNT, 2009].

Poly résistance : Cas de tuberculose affectant des malades dont des isolats infectieux de *M. tuberculosis* présentent in vitro une résistance confirmée à plus d'un antituberculeux de première ligne autres que l'isoniazide et la rifampicine en même temps [PNT, 2009].

Tuberculoses à bacilles multirésistants (TB-MR) : Les bacilles multi résistants sont des bacilles qui résistent au moins à l'isoniazide et à la rifampicine, les deux principaux médicaments antituberculeux majeurs [PNT, 2009].

II.2. Epidémiologie

La résistance aux médicaments antituberculeux est un phénomène qui prend de l'ampleur partout dans le monde. En 1947, dès les premiers mois qui ont suivi l'introduction de la Streptomycine dans le traitement de la tuberculose, la majorité des patients atteints de la tuberculose pulmonaire excavée, traités par la Streptomycine seule, ont vu leurs bacilles devenir résistants à cet antibiotique [Bendadda, 2003]. Aussi, le même phénomène s'est reproduit avec les antibiotiques découverts ultérieurement, chaque fois qu'ils ont été prescrits seuls pour le traitement de la tuberculose pulmonaire excavée [Bendadda, 2003]. Dans la plus part des pays, on a constaté l'existence de souches qui résistent à au moins un antituberculeux utilisé seul. La résistance aux antituberculeux constitue une menace majeure pour les programmes de lutte contre la tuberculose suite à l'émergence dans plusieurs pays de souches multi résistantes [Umubyeyi *et al.*, 2007]. Si à TB-MR, s'ajoutent de nouvelles résistances aux médicaments de seconde intention (On parle de tuberculose ultra-résistante lorsqu'une

résistance apparaît à une fluoroquinolone et à au moins un des trois antituberculeux injectables de deuxième intention.), la tuberculose est alors qualifiée d'ultra-résistante (UR) [Langlet, 2007]. Une étude de l'OMS a révélé que sur 17 690 cas de tuberculose relevés dans 49 pays entre 2000 et 2004, 20 % étaient des TB-MR parmi lesquelles 10 % étaient ultra-résistantes [Langlet, 2007]. On a recensé environ 450 000 cas de TB-MR dans le monde en 2012 chez des patients signalés comme atteints de tuberculose pulmonaire [WHO, 2013]. Près de la moitié de ces cas se sont produits en Inde, en Chine et en Fédération de Russie. On estime que près de 9,6% des cas de TB-MR étaient des cas de TB-UR [OMS, 2013]. La TB- MR peut toucher des patients infectés par le VIH, ainsi que des patients non infectés, ou ne présentant aucune autre cause de déficit immunitaire [Bendadda, 2003].

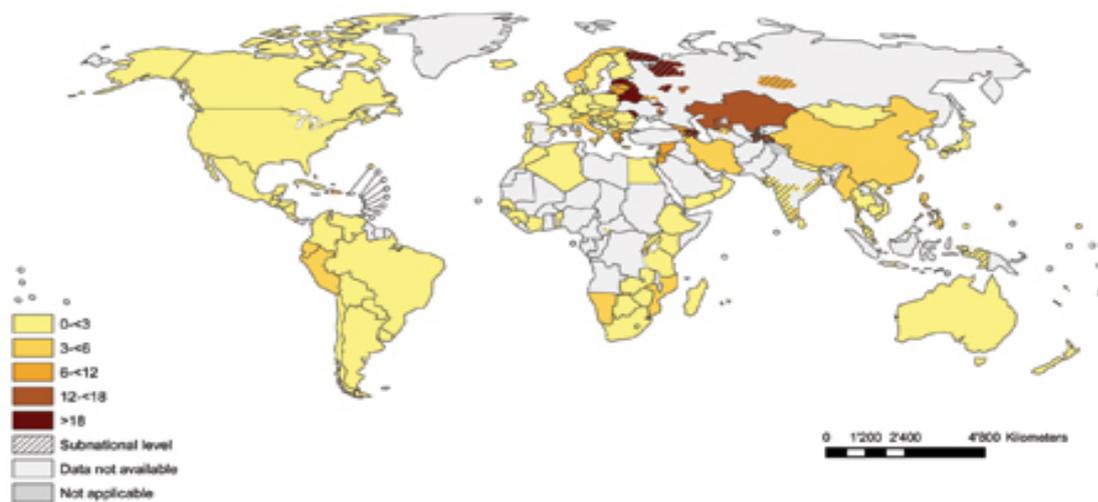


Figure 2 : Distribution des fréquences de la tuberculose multi résistante chez les patients nouveaux cas [Zignol M, 2011]

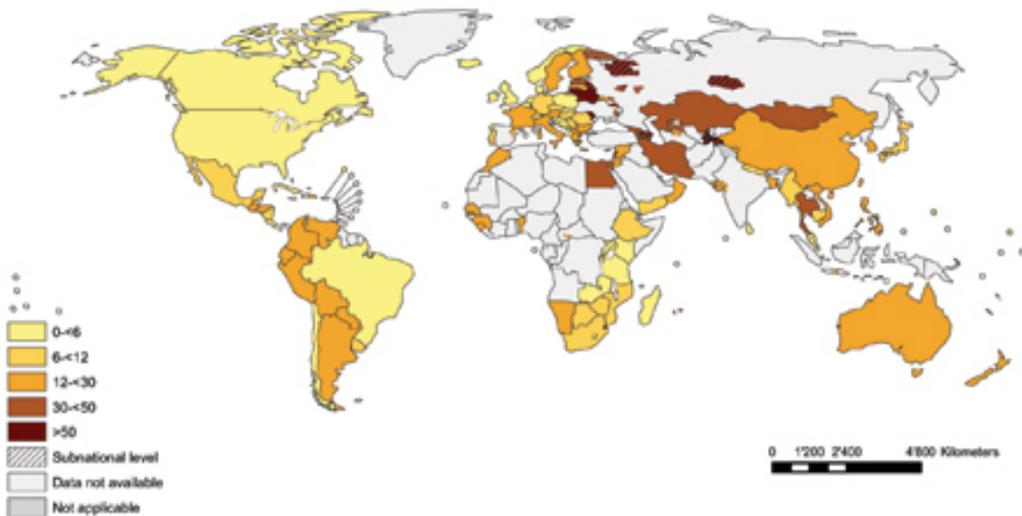


Figure 3 : Fréquence de la tuberculose multi résistante chez les patients ayant un antécédent de traitement [Zignol M, 2011]

II.3.Diagnostic

La stratégie classique de dépistage de la tuberculose (TB) est passive. Les symptômes respiratoires majeurs sont la toux persistante de plus de deux (2) semaines, avec une expectoration mucopurulente, parfois striée de sang. D'autres signes tels que une hémoptysie, un amaigrissement, une asthénie, une aménorrhée non gravidique chez la femme en âge de procréer, une fièvre surtout vespérale, des sueurs nocturnes et des douleurs thoraciques peuvent être associés. Lorsqu'un patient présente ces signes il faut privilégier l'examen microscopique de l'expectoration en demandant cet examen sur au moins deux échantillons différents. Il existe d'autres méthodes de diagnostic tel que la culture, la radiographie et la PCR.

De nombreux pays, notamment en Afrique, ne disposent pas de capacités de laboratoire suffisantes pour cultiver *Mycobacterium tuberculosis* et procéder à des tests de sensibilité aux médicaments pour le diagnostic de la TB résistante.

II.3.1. Groupes cibles pour dépister la résistance aux antituberculeux

Les groupes de la population qui sont à risque de présenter une tuberculose résistante aux antituberculeux doivent bénéficier d'une culture et d'un test de pharmacosensibilité pour les médicaments de première ligne au moins. On peut citer les groupes suivants :

- Echec d'un cas de traité par un schéma de 2^{ème} ligne

- Rechute après un traitement de 2^{ème} ligne bien conduit
- Reprise après un traitement de 2^{ème} ligne
- Echec d'un traitement de 1^{ère} ligne
- Cas où les frottis restent positifs au 2^{ème} et 3^{ème} mois du traitement de 1^{ère} ligne
- Sujet en contact étroit avec des cas de TB-MR
- Sujet en provenance d'une zone de forte prévalence de la TB-MR
- Sujets ayant des pathologies associées à une malabsorption ou à diarrhée provoquant un transit rapide.

II.3.2. Tests de sensibilité aux médicaments (TSM)

Ces TSM ou antibiogramme sont utilisés pour déterminer la susceptibilité d'une souche bacillaire d'un malade aux différents antituberculeux. De façon naturelle, il apparaît dans une souche sauvage, qui est le plus souvent sensible, des bacilles résistants à un antituberculeux par un phénomène de mutation chromosomique [PNT, 2009]. Ce sont des mutants résistants. Ce phénomène est spontané, rare et spécifique à un antituberculeux et est héréditaire, c'est-à-dire que cette mutation est transmise à tous les bacilles issus de la multiplication du mutant résistant. Pour ce faire, plusieurs méthodes ont été élaborées pour déterminer la résistance d'une souche bacillaire. Ce sont entre autre :

- La méthode de proportions sur milieu de Löwenstein-Jensen (L.J)

C'est la méthode de référence décrite par Canetti, Rist et Grosset en 1963 qui consiste à déterminer pour la souche à étudier, la proportion de mutants résistants à un antibiotique donné [Biomnis, 2012].

On l'obtient en dénombrant sur des milieux solides contenant la concentration critique d'antibiotiques, les colonies qui se sont développées. On compare ce nombre à celui des germes viables contenus dans le même inoculum et dénombrés sur milieux sans antibiotiques. Cette méthode a été adaptée aux milieux liquides.

- La méthode de proportion en milieu liquide ou méthodes radiométriques

Il s'agit d'apprécier la proportion des mutants résistants en utilisant le système Batec 460 TB, en mesurant la quantité de CO₂ marqué par le carbone 14 produite dans des flacons de milieu 12B additionné d'antibiotique et dans des flacons sans antibiotique (témoins) qui ont étéensemencés avec 100 fois moins de bactéries que les flacons avec antibiotique. Si la production de CO₂ marqué dans les flacons avec antibiotique est au moins égale à celle de

CO₂ marqué dans les flacons témoins ensemencés avec 100 fois moins de bacilles, c'est qu'au moins 1% des bacilles sont résistants à l'antibiotique considéré.

- La méthode de concentration minimale inhibitrice (CMI)

Il s'agit de mettre un inoculum bactérien en contact avec des concentrations décroissantes d'antibiotiques afin de déterminer, après un temps de contact à 37°C, la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber 99% de l'inoculum.

II.3.3. Les tests rapides

Il s'agit principalement des méthodes génotypiques de détection des résistances aux antituberculeux. Ces méthodes de biologie moléculaire visent à détecter des mutations responsables de la résistance aux antituberculeux. Parmi ces méthodes on distingue la Réaction Polymérase en Chaîne (PCR) et la méthode de séquençage des gènes impliqués dans la résistance (rpoB, pncA, katG, embB,...). Ces tests ont une sensibilité de 92-98,8% et une spécificité de 95-100% pour le diagnostic de la TB-MR. Parmi ces tests rapides développés, deux ont démontré une efficacité prouvée :

- INNO-LiPA Rif.TB kit (Innogenetics, Zwijndrecht, Belgium)
- Genotype® MRTBplus assay (Hain Lifescience, GMBH, Germany)

Ces tests présentent un grand avantage car ils permettent de réduire le temps du diagnostic de la TB-MR à 8 heures maximum [PNT, 2009].

II.4. Traitement de la tuberculose pharmacorésistante

Le traitement des tuberculoses résistantes aux antibiotiques a pour but de guérir le malade, de rompre la chaîne de transmission des bacilles pharmaco résistantes, d'éviter les décès et d'éviter les rechutes. L'OMS classe les médicaments antituberculeux en 5 catégories :

- Groupe 1 comportant les agents antituberculeux oraux de première intention que sont : isoniazide (H), rifampicine (R), ethambutol (E), pyrazinamide (Z)
- Groupe 2 comportant les agents antituberculeux injectables que sont : streptomycine (S), kanamycine (Km), amikacine (Am), capréomycine (Cm)
- Groupe 3 comportant les Fluoroquinolones : Moxifloxacine (Mfx), Levofloxacine (Lfx), Ofloxacine (Ofx).
- Groupe 4 comportant les agents anti-tuberculeux oraux bactériostatiques de seconde intention : éthionamide (Eto), protionamide (Pto), cycloserine (Cs), acide paminosalicylique (PAS)

- Groupe 5 comportant les agents anti-tuberculeux dont l'efficacité n'est pas sûre : clofazimine(Cfz), linezolid (Lzd), amoxicilline-clavulanate (Amx/clv), clarithromycine (Clr), isoniazide à fortes doses (H)

II.4.1. Schéma thérapeutique

La conception de tout schéma thérapeutique obéit aux principes suivants :

- Détecter précocement la multi-résistance et instaurer rapidement un traitement
- Hospitaliser le patient en milieu spécialisé
- Baser les régimes sur l'historique des antituberculeux déjà reçus par le patient
- Utiliser au moins 4 nouveaux médicaments antérieurement non prescrits ou prescrits durant une courte période (moins d'un mois) et totaliser un minimum de 5 médicaments
- Commencer par utiliser les médicaments du groupe1 qui sont encore actifs avec obligatoirement un agent injectable (groupe2) et une fluoroquinolone (groupe 3) puis ajouter les drogues du groupe 4
- Contrôler le suivi du traitement par les infirmiers (DOTS plus)

Fractionner le traitement (surtout pour la combinaison éthionamide, cyclosérine et PAS) dans la journée pour améliorer la tolérance.

II.4.2. Durée du traitement

Le traitement comporte deux phases :

- La phase intensive comprenant l'agent injectable qui dure au moins 4 mois après la première conversion durable des frottis ou des cultures et qui doit être prolongée pendant au moins 6 mois.
- la phase d'entretien : seul l'agent injectable est arrêté ; la durée recommandée est de 18 mois au moins après la conversion des cultures. Un prolongement de 24 mois peut être indiqué dans les cas particuliers.

III. Généralités sur les Mycobactéries

III.1. Classification

III.1.1. Taxonomie

Les mycobactéries appartiennent à la famille des *Mycobacteriaceae*, ordre des *Actinomycetales*, classe des *Schizomycètes* [Bendadda, 2003]. Cette famille contient un seul genre: *Mycobacterium* [Bendadda, 2003]. Les propriétés essentielles des mycobactéries sont les suivantes:

- ✓ Bacilles immobiles non sporulés, aérobies strictes, rectilignes ou incurvés, de 0,2 à 0,6 µm de large sur 1 à 10 µm de long [Bendadda, 2003]
- ✓ Elles ne prennent pas la coloration de Gram. Elles se colorent difficilement à la fuchsine, mais elles sont capables de garder cette coloration malgré l'action combinée de l'acide et de l'alcool. Elles sont donc acido-alcool-résistantes
- ✓ Elles ont un temps de génération lent : une division toutes les 20h en moyenne, soit 60 fois moins que le Staphylocoque [Zida, 2012]
- ✓ Leur ADN est très riche en Guanine et en Cytosine : 62 à 70 mol% [Van Soolingen et al., 1994]

Le genre *Mycobacterium* compte actuellement plus de 100 espèces. L'espèce type est *Mycobacterium tuberculosis* dont la séquence entière du génome est maintenant complètement décryptée [Cole et al., 1998]

III.1.2. Classification

Le genre *Mycobacterium* renferme des espèces réputées pathogènes aussi bien pour l'homme que pour l'animal, ainsi que des espèces opportunistes et saprophytes généralement qualifiées d'atypiques, anonymes ou encore espèces non tuberculeuses [Zida, 2012]. Actuellement les espèces du genre *Mycobacterium* sont réparties en 3 groupes.

- Les espèces du Complexe *tuberculosis*
 - *M. tuberculosis*
 - *M. africanum*
 - *M. bovis subsp B.C.G.*
 - *M. bovis subsp bovis*
 - *M. bovis subsp caprae*
 - *M. microtti*

- *M. canettii*
- *M. pinnipedii*
- Les Mycobactéries Non Tuberculeuses responsable de pathologie chez l'homme
 - *Mycobacterium xenopi*
 - *Mycobacterium kansasii*,
 - *Mycobacterium avium complex*,
 - *Mycobacterium abscessus*
 - *Mycobacterium crofulaceum*
 - *Mycobacterium marinum*,
 - *Mycobacterium ulcerans*
 - *Mycobacterium avium*
- *Mycobacterium leprae* responsable de la lèpre

III.2. Caractéristiques

III.2.1. Caractères culturels

Les Mycobactéries se différencient fondamentalement par leurs caractères structuraux. Les bacilles tuberculeux ne cultivent que sur des milieux adaptés. Ils se caractérisent par une croissance lente, avec un temps de génération de 2 à 20 heures selon les espèces [Zida, 2012]. Lors de l'isolement, les bacilles tuberculeux se développent très lentement, en quelques semaines à quelques mois. Lors de leur repiquage, la culture est plus rapide : elle apparaît en une dizaine de jours. Des milieux particuliers, à savoir des milieux à base d'œufs, extrêmement riches et nécessaires au développement des mycobactéries sont utilisés.

En effet, leur nutrition carbonée est assurée par la glycérine pour le bacille tuberculeux humain, ou le glucose pour le bacille tuberculeux bovin. La nutrition azotée étant assurée par l'asparagine. La température optimale de croissance est de 35 à 37°C, mais certaines espèces comme *M. marinum* et *M. ulcerans* poussent mieux à 32°C [Zida, 2012]. Les températures maximales de culture étant de 30 et 41°C [Pilet *et al.*, 1979].

Les variations de pH supportées sont faibles, elles sont comprises entre 6 et 8. Le pH optimal est de 6,7 à 6,9 [Pilet *et al.*, 1979; Zida, 2012].

III.2.2. Résistance aux agents physiques et chimiques

La propriété d'acido-alcool-résistance ainsi que la résistance aux agents physiques et chimiques sont liées à la structure même de la paroi cellulaire des mycobactéries. En effet, elle forme une véritable enveloppe cireuse et protectrice du fait de sa richesse exceptionnelle en acides gras et lipides (23% pour 1-2% chez les autres germes).

III.2.2.1. Agents physiques

Les mycobactéries sont classées parmi les bactéries pathogènes non sporulées les plus thermorésistantes. Elles sont détruites à la chaleur humide en 30 minutes à 65°C, 10 minutes à 72°C ou 2 minutes à 100°C. Les bacilles tuberculeux sont sensibles à la lumière solaire, aux rayons Ultra-Violets (UV) et aux radiations ionisantes. Le sang, le sérum et autres protéines protègent les bacilles contre les rayons UV. Par contre, ils sont moyennement résistants au froid et à la dessiccation [Zida, 2012].

III.2.2.2. Agents chimiques

Les mycobactéries sont résistantes à la plupart des désinfectants usuels. Elles résistent aux antiseptiques hydrosolubles (mais sont sensibles aux produits liposolubles, comme alcool, éther). Elles résistent aux enzymes des phagocytes (les lysosomes ne contiennent que peu de lipases). Cependant, elles sont généralement sensibles aux désinfectants chlorés, iodés, formolés et crésolés. En effet, le bacille tuberculeux peut être détruit par le phénol à 2%, le crésol à 3% pendant 4 heures, alors qu'il est détruit par la teinture d'iode en 5 minutes [Zida, 2012].

III.2.3. Caractères biochimiques

Leur différenciation est essentiellement basée sur l'accumulation de niacine, l'activité réductrice du nitrate et l'activité catalasique.

III.2.3.1. Production d'acide nicotinique ou Niacine

La niacine joue un rôle vital dans la vie organique des mycobactéries [Barrera, 2007]. Bien que toutes les mycobactéries produisent de la niacine, la plus part d'entre elles emploie la majorité de ces métabolites dans la synthèse de coenzymes. Par contraste, *M. tuberculosis* produit et accumule une quantité importante de niacine [Barrera, 2007]. Les quantités de niacine produites varient donc d'une espèce à l'autre et, c'est cette propriété qui est mise à profit dans le Niacin-test pour l'identification de *M. tuberculosis*.

III.2.3.2. Réduction des nitrates en nitrites

On a spéculé que, dans l'hôte infecté, le microorganisme utiliserait le nitrate comme source d'azote et ou comme accepteur final d'électron en absence d'oxygène [Barrera, 2007]. Quelque soit la fonction physiologique assurée, la plupart des mycobactéries possèdent une nitrate réductase et ont la capacité de réduire les nitrates en nitrites [Zida, 2012].

III.2.3.3. Activité catalasique

Comme beaucoup d'aérobies, incluant différentes mycobactéries, le bacille tuberculeux dépend de certains enzymes pour détoxifier le radical d'oxygène létal, comme le peroxyde et l'eau oxygénée (H₂O₂) qui sont générés par le bacille lui-même durant la respiration [Barrera, 2007]. Toutes les mycobactéries produisent une catalase sauf les souches de *M. tuberculosis* et de *M. bovis* résistantes à plus de 10 µg / ml d'isoniazide (INH) [Zida, 2012]. C'est une enzyme soluble intracellulaire, qui est thermolabile pour les mycobactéries tuberculeuses et thermostable pour les mycobactéries atypiques [Zida, 2012].

III.2.3.4. Hydrolyse du tween 80

David et Dubor ont montré que les mycobactéries possèdent des estérases capables de libérer, par hydrolyse, de l'acide oléique à partir du dérivé polyoxyéthylénique du monoléate de sorbitan (Tween 80). L'étude de cette hydrolyse est particulièrement utile pour distinguer *M. scrofulaceum* (réaction négative) de *M. gordonae* et *M. flavescens* (réaction positive), et pour le diagnostic différentiel des mycobactéries non chromogènes [Zida, 2012].

III.2.4. Physiopathologie

III.2.4.1. Complexe *Mycobacterium tuberculosis*

Ne libérant au cours de sa multiplication aucune substance toxique, la virulence de *M. tuberculosis* est liée à sa capacité de survie et de multiplication à l'intérieur des macrophages de l'organisme hôte [Bendadda, 2003]. Dans plus de 90% des cas, la pénétration des bacilles tuberculeux ou bacille de Koch dans le poumon n'entraîne aucune manifestation clinique [PNT, 2011], car les défenses immunitaires de l'organisme arrivent à les contrôler et ils ne provoquent pas de maladie [Harries *et al.*, 2005]. Dans moins de 10% des cas, il y a apparition de signes cliniques. Cela intervient notamment, lorsque survient une rupture d'équilibre entre le système de défense immunitaire du sujet hôte du BK [PNT, 2011].

Mycobacterium tuberculosis est toujours pathogène et ne se comporte jamais en saprophyte. Il est responsable :

- ✓ D'infections pulmonaires le plus souvent car il touche le parenchyme des poumons [PNT, 2011]. Les bacilles ont la possibilité de se disséminer dans l'organisme à partir de la lésion primitive, notamment par voie lymphatique ou hématogène [Bendadda, 2003].
- ✓ D'infections extra-pulmonaires, plus rares, représentant 10 à 15% des cas. Les BK peuvent s'attaquer à différents organes tels les méninges, les reins, les articulations...

La tuberculose bovine est causée par *Mycobacterium bovis*, une mycobactérie hautement similaire à *Mycobacterium tuberculosis* [Barrera, 2007]. Il entraîne chez les bovins des lésions pulmonaires ganglionnaires et aussi mammaires, avec le passage du bacille dans le lait. L'homme s'infecte surtout par la consommation de viande et de produits laitiers crus [Barrera, 2007]. La porte d'entrée des bacilles est principalement digestive, ce qui pourrait expliquer la prédilection apparente de *M. bovis* à donner des localisations extrapulmonaires: adénites notamment.

Mycobacterium africanum est isolé principalement en Afrique et présente des caractères intermédiaires entre ceux de *M. tuberculosis* et *M. bovis*. C'est un parasite strict de l'homme en Afrique occidentale et centrale. Il est pathogène pour le cobaye mais non pour le lapin [Bendadda, 2003].

Mycobacterium microti est un membre du complexe *tuberculosis* et a été isolé pour la première fois en 1937 comme agent causale de la tuberculose pulmonaire chez les petits rongeurs [Barrera, 2007]. Il est considéré comme étant non pathogène pour l'homme [Bendadda, 2003].

III.2.4.2. Mycobactéries atypiques

Les mycobactérioses humaines ne se distinguent ni par la clinique ni par l'anatomopathologie des tuberculoses à *M. tuberculosis* ou à *M. bovis*. Dans la majorité des cas, elles s'installent chez des patients présentant un déficit localisé ou généralisé de l'immunité [Bendadda, 2003].

- ✓ Mycobactérioses pulmonaires: Elles frappent habituellement des sujets masculins, âgés de plus de 40 ans. Les germes en cause sont *M. aviumintracellulare*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, très rarement, *M. szulgai*; *M. malmoense*, *M. fortuitum* et *M. chelonae*.

- ✓ Mycobactérioses ganglionnaires: Elles affectent les enfants au dessous de 8 ans chez qui elles provoquent des adénites froides dont le tout premier agent est *M. scrofulaceum*. Les adénites à *M. avium-intracellulare* sont moins fréquentes et touchent des enfants plus âgés.
- ✓ Autres mycobactérioses: *M. fortuitum* et *M. chelonae* sont responsables d'abcès et de certaines infections ostéo-articulaires. Les infections cutanées sont dues dans les pays tempérés à *M. marinum*, et dans les pays tropicaux à *M. ulcerans*. La fréquence des infections généralisées, habituellement à *M. avium-intracellulare*, augmente régulièrement en même temps que se multiplient les cas de SIDA [Bendadda, 2003].

III.2.4.3. Mycobactéries des lèpres humaines et animales

M. leprae est l'agent étiologique de la lèpre qui se traduit chez l'homme par une affection cutané-nerveuse. Chez la souris, *M. lepraemurium* est responsable de la destruction progressive des extrémités nerveuses et de lésions cutanées importantes [Bendadda, 2003]

IV. Etat des connaissances sur la pharmacorésistance

Cette revue est issue d'une compilation des données sur la TB MR de 1997 à 2013.

Constat issu de la littérature :

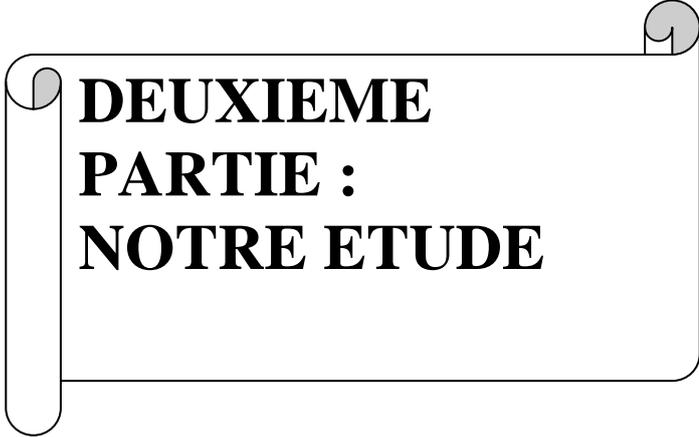
La pharmacorésistance est élevée en Afrique et ailleurs dans le monde. Au Burkina Faso des données récentes sont absentes.

Tableau I: Etat des connaissances sur la pharmacorésistance

N°	Auteurs Date	Objectifs	Méthodologie	Résultats	Principal message
1	Sangaré <i>et al.</i> , 2010	Evaluer la résistance des mycobactéries du complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i> aux antituberculeux chez les cas de tuberculose pulmonaire nouveaux et antérieurement traités	Taille population= 550 TPM+ Nbre prélèvement/pers= 3 Technique: méthode des proportions sur LJ	416 <i>M.tuberculosis</i> isolés Homme : 283 Femme : 133 323 NC et 93 AC NC: 12,4% de TB pharmaco résistante globale et 3,4% de MDR AC : 66,7% de pharmaco résistance globale et 50,5% de MDR	Taux de résistance aux médicaments élevés au BF
2	Umubyeyi <i>et al.</i> , 2007	Déterminer les prévalences de résistance primaire et acquise de <i>M. tuberculosis</i> aux antituberculeux majeurs	Taille population= 710 TPM+ Nbre prélèvement/pers= 1 Technique : méthode radiométrique BACTEC 460	644 <i>M.tuberculosis</i> isolés hommes 366 femmes 278 483 NC et 161 AC NC=13,7% de résistance globale et 7% de MDR AC=39,8% de résistance globale et 25,5% de MDR	taux de résistance de <i>M. tuberculosis</i> des patients à TB pulmonaire au Rwanda sont élevés
3	Ogaro <i>et al.</i> , 2012	Déterminer l'ampleur de la résistance aux antituberculeux de première ligne à Nairobi au Kenya	Taille population= 691 TPM+ Nbre prélèvement/pers= 2 Technique : MGIT960	568 <i>M.tuberculosis</i> isolés 369 NC et 199 AC NC= 15,4% de résistance globale et	Niveau élevé de résistance à Nairobi comparativement à d'autres études menées dans le pays.

				0,54% de MDR AC= 23,1% de résistance globale et 8,54% de MDR	
4	Affolabi <i>et al.</i> , 2007	Evaluer la situation de la résistance aux antituberculeux à Cotonou	Taille population=470 Technique : méthode des proportions sur LJ	244 NC et 226 AC NC= 1,6% de MDR si on considère tous les patients mais il est de 0,5% pour les patients résidants au Bénin AC= 11,1% de MDR	Cette étude montre l'importance d'une identification correcte des patients dans la surveillance épidémiologique où les résultats pourraient varier selon la ou les populations étudiées.
5	Otu <i>et al.</i> , 2013	Déterminer la prévalence et le type de résistance aux antituberculeux de première ligne parmi les nouveaux cas à Calabar au Nigéria	Taille population=120 TPM+ Prélèvement/pers=2 Technique : méthode des proportions sur LJ	100 M.tuberculosis isolés Hommes 53 femmes 47 42% de résistance globale et 4% de MDR	Taux élevés de résistance Nigéria
6	Kabedi <i>et al.</i> , 2007	Déterminer la prévalence de la résistance primaire de <i>M. tuberculosis</i> à Kinshasa, 20 ans après cette première évaluation.	Taille population=310 TPM+ NC Prélèvement/per=2 Technique ; méthode des proportions sur LJ	301 M.tuberculosis isolés 43,5% de résistance globale et 5,3% de MDR	Le taux de MDR-TB (5,3 %) trouvé dans cette étude constitue une menace certaine pour les efforts de contrôle de la tuberculose à Kinshasa.
7	Chanteau <i>et al.</i> , 1997	Déterminer la résistance primaire et acquise chez les tuberculeux pulmonaire dans quatre grandes villes.	Taille population=1296 TPM+ Technique : méthode des proportions sur LJ	538 M.tuberculosis isolés 401 NC et 137 AC NC= 20% de résistance globale et 0,25% de MDR AC=40% de résistance globale et 5% de MDR	Cette étude montre une image défavorable de résistance à Madagascar
8	Ratsirahonana <i>et al.</i> , 2002	Evaluation de l'évolution de la résistance	Taille population=909 TPM+	888 M.tuberculosis isolés	Diminution des taux de résistances à

		primaire et secondaire de M.tuberculosis	Prélèvement/pers=2 Technique : méthode des proportions sur LJ	789 NC et 99 AC NC=11,7% de résistance globale et 0,1% de MDR AC=11,6% de résistance globale et 4,2% de MDR	Antananarivo, entre 1994-1995 et 1999-2000. Efficacité du PNT
9	Merza <i>et al.</i> , 2011	Déterminer le taux de résistance aux antituberculeux de première ligne et identifier les facteurs de risques associés à la MDR en Iran	Taille population=1742 Technique ; méthode des proportions sur LJ	1139 NC et 603 AC Hommes 935 Femmes 807 NC=29,9% de résistance globale et 6,3% de MDR AC=69% de résistance globale et 31,7% de MDR	Tendance croissante de la résistance dans la communauté. Le fort taux de MDR chez les NC et chez les patients jeunes est l'indicateur d'une récente transmission.
10	Shao <i>et al.</i> , 2011	Evaluer la Multi résistance au Jiangsu et explorer les facteurs de risque potentiel	Taille population=1940 TP M+ Nbre prélèvement/pers Technique ; méthode des proportions sur LJ	1824 M.tuberculosis isolés Hommes : 1340 Femmes : 484 1180 NC et 644 AC NC=7,63% de MDR AC=33,07% de MDR Différence significative entre NC et AC	Résistance élevée au Jiangsu constitue un challenge pour le contrôle de la TB.



**DEUXIEME
PARTIE :
NOTRE ETUDE**

DEUXIEME PARTIE : NOTRE ETUDE

I. Objectifs de l'étude

I.1. Objectif principal

Evaluer la résistance du BK aux antituberculeux chez les cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive nouveaux cas ou antérieurement traités.

I.2. Objectifs spécifiques

- i. Déterminer la fréquence des résistances primaires et secondaires
- ii. Déterminer la fréquence des mono résistances primaire et secondaire
- iii. Déterminer la fréquence des multi résistances primaire et secondaire
- iv. Déterminer la fréquence des poly résistances primaire et secondaire
- v. Déterminer la relation entre le statut VIH et les multi résistances aux antituberculeux



**MATERIEL ET
METHODES**

II. Matériels et méthodes

II.1. Cadre d'étude

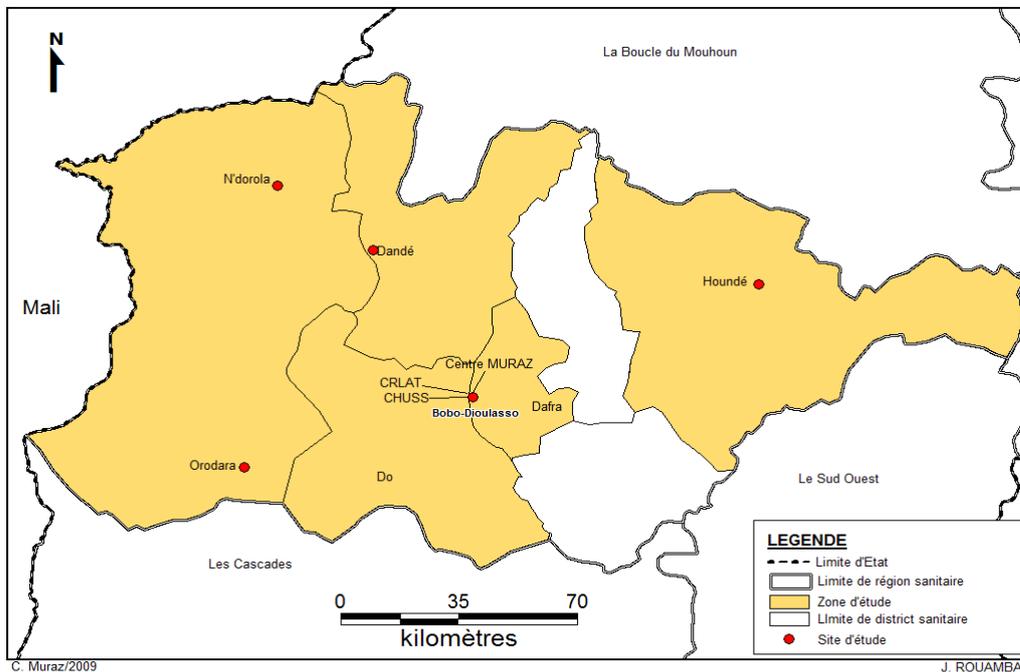


Figure 4 : Localisation des sites de l'étude dans la région des Hauts Bassins

L'étude a été effectuée dans la région des Hauts Bassins au Burkina Faso. Le cadre opérationnel de cette étude était constitué par les 08 sites constitués par les Centres de Dépistage et de Traitement de la tuberculose (CDT) des districts sanitaires de Dafra, Do, Orodara, N'Dorola, Houndé, Dandé, et les centres spécifiques tel que le Centre Régional de Lutte Antituberculeuse (CRLAT) de Bobo-Dioulasso, le Centre Hospitalier Universitaire Sourô Sanou (CHUSS) de Bobo-Dioulasso et le laboratoire des mycobactéries du Centre Muraz de Bobo-Dioulasso.

Cette étude s'est déroulée dans le cadre général de l'étude DYTRAVIHT intitulée «Impact de la co-infection VIH/*Mycobacterium tuberculosis* sur la dynamique de transmission de la tuberculose au Burkina Faso». Elle avait pour but de comprendre si l'association VIH/Tuberculose joue un rôle dans la structure des populations de *Mycobacterium tuberculosis* en favorisant la propagation de certaines familles plus ou moins virulentes ou ayant un potentiel de résistance plus ou moins élevé, d'étudier comment circulent les génotypes de *Mycobacterium tuberculosis* entre les sujets infectés ou non par le VIH-1 et de définir s'il existe des risques d'émergence dus à la co-infection VIH/ *Mycobacterium tuberculosis*.

II.2. Type d'étude

Il s'agissait d'une étude transversale descriptive qui s'est déroulée de Janvier à Décembre 2012.

II.3. Population d'étude et critères d'inclusion et de non inclusion

II.3.1. Population d'étude

➤ Pour les nouveaux cas:

Elle était constituée de nouveaux cas de tuberculose à microscopie positive (NC TPM+) c'est-à-dire les cas n'ayant jamais été traités aux médicaments antituberculeux ou qui l'ont été pendant moins d'un mois [PNT, 2011].

➤ Pour les cas déjà traités:

La population d'étude était constituée de cas TPM+ ayant eu un mois ou plus de traitement antituberculeux [PNT, 2011]. Il s'agit :

- des cas d'échecs : malades déjà sous traitement, dont l'examen bacilloscopique de contrôle des crachats du 5^e ou du 8^e mois de traitement était positif.
- des cas de rechutes : malades traités antérieurement pour tuberculose, déclarés guéris ou traitement terminé et qui présentent à nouveau une tuberculose évolutive pulmonaire ou extra-pulmonaire confirmée par l'examen microscopique directe des frottis ou par la culture.

II.3.2. Critères d'inclusion

Les patients seront sélectionnés suivant les critères suivants :

- ✓ Patients TPM+ d'âge supérieur ou égal à 15 ans
- ✓ TPM+ sans antécédent de traitement antituberculeux ou traitement de moins de un mois (pour les nouveaux cas)
- ✓ TPM+ déjà traités par les médicaments antituberculeux pendant au moins un mois (pour les cas déjà traités)
- ✓ une culture positive interprétable sur milieu de Lowenstein-Jensen ;
- ✓ un antibiogramme interprétable.
- ✓ Patient consentant à participer à l'étude

II.3.3. Critères de non inclusion

- ✓ TPM+ difficiles à classer en ‘jamais traités’ ou ‘déjà traités’
- ✓ Résultats de culture ou des tests de sensibilité non interprétables
- ✓ Patient non consentant

II.4. Echantillonnage

C’était une capture exhaustive de tous les cas de TB remplissant les critères d’inclusion.

II.5. Technique et outils de collecte des données

II.5.1. Variables de l’étude

- ✓ Microscopie positive
- ✓ Culture sur LJ
- ✓ Identification des souches isolées
- ✓ Sensibilité aux antibiotiques
- ✓ L’âge des patients
- ✓ Le sexe des patients
- ✓ Le statut sérologique VIH des patients

II.5.2. Technique de collecte des données

- ✓ Entretiens avec les patients
- ✓ Recueils des échantillons
- ✓ Revue documentaire des sites

II.5.3. Outils de collecte

- ✓ Pour les entretiens nous avons un questionnaire
- ✓ Pour le recueil des échantillons nous avons utilisé les registres de laboratoire
- ✓ Pour la revue documentaire nous avons utilisé le registre des CDT

II.5.4. Matériels de laboratoire

Il était composé de :

- *Pour la microscopie* : le microscope binoculaire de marque Olympus CX31®, les consommables et réactifs habituels du Ziehl-Neelsen fournis par le PNT (acide, alcool, fuschine, le bleu de méthylène, les filtres, les lames et le coton).
- *Pour la culture*: les milieux usuels suivants : Lowenstein-Jensen (LJ), LJ + pyruvate de sodium à 0,2%, LJ + Acide Thiophène Carboxylique (TCH),

Réactifs: soude à 4%, nitrates, nitrate de sodium, Griess A et Griess B, eau oxygénée, tween 80

- Pour la sérologie: tests rapides Determine®, Génie III®.

Equipement : Hotte à flux laminaire Esi Flufrance®, agitateur de Kahn, centrifugeuse Jouan®, réfrigérateur Xper®, étuve Jouan®.

- Pour les tests de sensibilité ou ATB :
 - ✓ LJ + isoniazide H,
 - ✓ LJ + Rifampicine R,
 - ✓ LJ + Ethambutol E,
 - ✓ LJ + Dihydrostreptomycine (DHS)

II.6. Mode de collecte et acheminement des prélèvements

Par malade inclus, 2 échantillons de crachats étaient recueillis, après un effort de toux selon les directives du guide technique du programme national de tuberculose (PNT). Le premier prélèvement est effectué sous la supervision d'un infirmier et le second prélèvement est fait le matin au réveil par le patient à domicile, dans des crachoirs. En attendant d'être acheminés, ces échantillons étaient systématiquement conservés au réfrigérateur entre +4 et +8°C pour minimiser la prolifération des germes banaux.

Un prélèvement de 5 ml de sang sur tube EDTA a été réalisé chez tous les patients inclus après l'obtention de leur consentement éclairé. Ces échantillons ont été ensuite acheminés au laboratoire des Mycobactéries du Centre Muraz par les techniciens de laboratoire des différents sites.

Les plasmas provenant du sang prélevés sur les tubes EDTA étaient aliquotés en 2 tubes de 1,5 ml dans un délai de 4 heures et conservés entre 2 et 8°C. L'acheminement des échantillons au Centre Muraz a été fait en respectant la chaîne de froid avec des glacières contenant de la glace.

Les prélèvements d'expectorations ont servi à la culture des mycobactéries et les cultures positives ont fait l'objet d'une identification biochimique et d'un TSM. Les prélèvements de sang ont servi à la réalisation de la sérologie VIH. Pour chaque nouveau lot de milieu de LJ et pour chaque médicament, des tests étaient réalisés sur la souche sauvage de référence H₃₇RV comme méthode de contrôle interne de qualité et sur une souche de référence résistante.

II.7. Analyse des échantillons et description des procédures

II.7.1. Examen microscopique direct

Les frottis sont préparés par étalage sur lames des différents échantillons. Ils sont ensuite colorés par la méthode de Ziehl-Neelsen. Les lames sont observées à l'immersion au microscope optique (x 100).



Figure 5 : Aspect de *Mycobacterium tuberculosis* après coloration [IPNC, 2012]

II.7.1.1. Etapes de la coloration de Ziehl-Neelsen

- Coloration par la fuchsine phéniquée de Ziehl
 - ✓ Placer la lame fixée sur la barre métallique au dessus du 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 du robinet
 - ✓ Sécher le frottis à l'air ambiant (sur un râtelier).

II.7.1.2. Expression des résultats de lecture des frottis [PNT, 2011]

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

Tableau II : Expression des résultats de lecture des frottis (microscopie ordinaire)

Nombre de BAAR comptés	Résultats	Interprétation
0 BAAR/ 100 champs	NEG	Frottis négatif
1-9 BAAR/ 100 champs	1-9 (noter le chiffre exact)	Rares BAAR
10-99 BAAR/ 100 champs	+	Frottis positif
1-10 BAAR/ champ, dans au moins 50 champs	++	Frottis riche
>10 BAAR/ champ, dans au moins 20 champs	+++	Frottis très riche

II.7.2. Traitement et mise en culture

L'isolement des mycobactéries à partir de produits pathologiques souillés nécessite la mise en œuvre de procédés de décontamination susceptibles de concilier une action énergique vis-à-vis de la flore banale et une agressivité très faible vis-à-vis des mycobactéries. La méthode utilisée pour la décontamination des échantillons d'expectorations était celle de Pétroff à la soude.

Mode opératoire

Après enregistrement des échantillons à manipuler, travailler sous une hotte de sécurité microbiologique en respectant les étapes suivantes :

- 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 (volume de 2 cc recommandé) dans le tube à centrifuger de 50 ml en plastique à vis ;
- Y ajouter la solution d'acide oxalique à 5% (généralement le mélange se fait à volume égal).
- Fermer hermétiquement le tube contenant le crachat plus la solution d'acide oxalique ;
- Agiter vigoureusement au vortex jusqu'à parfait mélange ;
- Ensuite, agiter sur agitateur de Kahn pendant 15 à 20 minutes puis ;
- Ajouter une quantité suffisante d'eau distillée stérile au mélange crachat-acide oxalique (le volume final sera d'environ 40-45 ml) ;
- Fermer hermétiquement le tube et agiter vigoureusement au vortex jusqu'à parfait mélange et passer à la centrifugeuse réfrigérée
- *Centrifuger à 3000 trs/mn pendant 20 minutes (1^{ère} centrifugation);*
- Verser avec attention 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 (2^{ème} centrifugation)*
- 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 (3^{ème} centrifugation) ;*
- 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 quatre tubes de milieu (2 tubes LJ ordinaire + 2 tubes LJ pyruvate) à raison de 2 à 4 gouttes par tube pour chaque échantillon ;

- Faire un frottis sur la lame correspondante avec deux gouttes pour chaque culot d'échantillon pour l'examen direct (recherche des BAAR dans les culots obtenus) ;
- Placer les tubes à moitié fermés en position inclinée sur une clayette et les incubés à l'étuve à une température de 37°C.

La lecture des cultures se fait de la façon suivante :

- 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 aux jours 3, 7, 14, 21, 28 et 42;
- 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.

II.7.3. Tests biochimiques d'identification

L'indentification finale des espèces du complexe *M. tuberculosis* est basée sur les tests biochimiques [Barrera, 2007].

II.7.3.1. Test de réduction du nitrate

La plupart des mycobactéries possèdent du nitrate réductase et ont la capacité de réduire les nitrates en nitrites. Ce test est particulièrement utilisé pour différencier *M. tuberculosis*, qui donne une réaction positive, de *M. bovis* qui donne une réaction négative [Barrera, 2007].

La procédure est la suivante:

- Dans un tube à hémolyse contenant 2 gouttes d'eau distillée stérile, introduire une spatule pleine de cultures jeunes et abondantes de mycobactéries ;
- Ajouter 2 ml de la solution de nitrate de sodium ;
- Fermer le tube et incubés à l'étuve à 37°C pendant 2 heures ;
- Ajouter 2 à 3 gouttes de réactif I (Griess A) puis 2 à 3 gouttes du réactif

II (Griess B);

Une réaction positive se traduit par une coloration rose franc à rouge et traduit la réduction des nitrates en nitrites par la nitrate réductase. Une coloration rose pale est à considérer comme négative.

II.7.3.2. Recherche de la catalase à 22°C et à 68°C

La catalase est une enzyme intracellulaire qui transforme le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. La catalase à 68°C est un test de tolérance à la chaleur mesurant l'activité de la catalase à haute température [Barrera, 2007].

La technique est la suivante :

- Prendre deux tubes à hémolyse et inscrire sur les parois des tubes le numéro de la souche à identifier ;
- Marquer sur le 1er 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 une spatule pleine de cultures jeunes et abondantes 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 sur la paillasse pour la même durée ;
- Laisser refroidir le tube 68.
- Ajouter 1 ml du réactif dans chaque tube.
- Examiner les tubes après 15 minutes de contact ;
- Noter le dégagement gazeux.

L'interprétation des résultats est la suivante :

Une réaction positive se traduit par une mousse d'une hauteur de 1 à 5 mm ou plus.

La réaction est douteuse si on a une simple couronne de mousse. Elle est négative en cas d'absence de mousse.

II.7.4. Test de sensibilité aux antibiotiques ou antibiogramme

➤ Préparation de la suspension bacillaire

- Identifier quatre tubes : 10^0 , 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5}
- Prélever avec une spatule de platine des parcelles d'un grand nombre de colonies
- Les mettre dans un tube stérile (tube 10^0) contenant 20 à 30 billes de verre
- Fermer le tube, puis agiter sur vortex pendant 20 à 30 secondes pour désagréger les colonies
- Ajouter 1ml d'eau distillée stérile
- Fermer le tube puis agiter sur vortex 10 à 15 secondes
- Ajouter 5ml d'eau distillée stérile
- Fermer le tube puis agiter sur vortex jusqu'à parfait mélange

➤ Etalonnage

- Ajuster l'opacité de la suspension à celle du standard en ajoutant si nécessaire de l'eau distillée stérile
- On obtient donc une suspension bacillaire appelée solution mère (tube 10^0)

➤ Préparation des dilutions

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

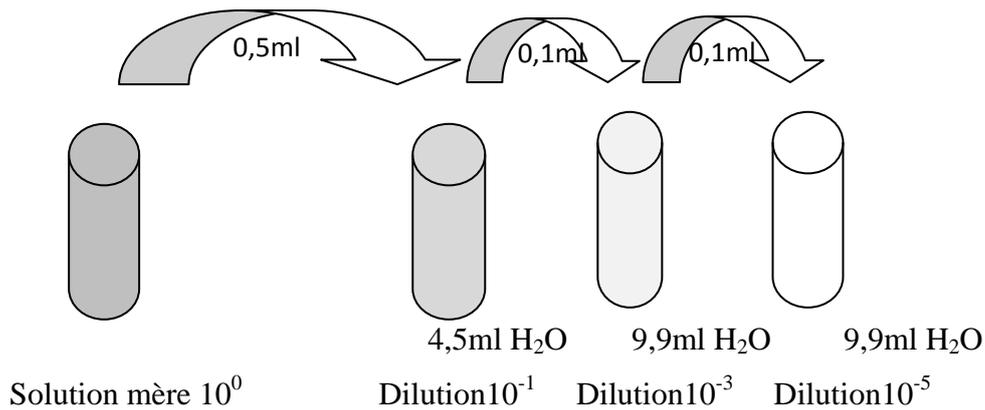


Figure 6 : préparation des dilutions

➤ **Ensemencement des milieux**

Répartir l'inoculum sur la pente de chaque milieu. Le bouchon des tubes doit être dévissé pour permettre l'évaporation du liquide.

- Ensemencer 0,2ml 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

Les antibiotiques à tester sont :

- ✓ Isoniazide à $0,2\mu\text{g} / \text{ml}$
- ✓ Streptomycine à $4\mu\text{g} / \text{ml}$
- ✓ Rifampicine à $40\mu\text{g} / \text{ml}$
- ✓ Ethambutol à $2\mu\text{g} / \text{ml}$

➤ **Incubation des cultures**

- Après ensemencement, incuber les tubes à 37°C en position inclinée à l'étuve
- Revisser les bouchons hermétiquement lorsque le liquide s'est évaporé après 3 à 6 jours

➤ **Lecture**

- Examiner les tubes après 4 semaines (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**

- Déduire la proportion de bacilles résistants existant dans la population totale

% de R = Nombre de R × 100 / population totale

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

La proportion critique est de 1% pour les antibiotiques suivants : isoniazide 0,2µg/ ml, streptomycine à 4µg/ ml, rifampicine à 40µg/ ml, éthambutol à 2µg/ ml.

II.7.5. Détermination de la sérologie VIH

La sérologie VIH des patients a été faite par les tests rapides Détermine® HIV et Génie III® HIV1 /HIV2 avec le plasma des patients.

Détermine® HIV est un test immuno-chromatographique pour la détection qualitative des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2. Le principe est basé sur la réaction antigène-anticorps.

Si les anticorps anti-VIH-1 et/ou anti-VIH-2 sont présents dans l'échantillon il se forme un complexe antigène-anticorps qui forme une ligne rouge dans cette fenêtre.

L'apparition d'une barre dans la fenêtre contrôle est obligatoire pour assurer la validité du test.

La technique est la suivante :

- Enlever la protection plastique des bandelettes ;
- porter les numéros des échantillons sur les bandelettes ;
- déposer 50 µL de plasma dans la zone de dépôt de l'échantillon ;
- attendre au moins 15 mn (maximum 60mn) et lire les résultats.
- Le résultat est positif si les barres rouges apparaissent dans la fenêtre contrôle annotée « control » et la fenêtre-patient annotée « patient » ;
- le résultat est négatif si la barre rouge apparaît uniquement au niveau de la fenêtre contrôle ;
- le résultat est non valide si la barre rouge n'apparaît pas dans la fenêtre contrôle de la bandelette.

Génie III® HIV1 /HIV2 est un test immunoenzymatique rapide pour la détection qualitative des anticorps dirigés contre le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 et 2 (VIH1 et VIH2) dans le sérum ou le plasma humain. Le test est fait sur des antigènes recombinants et des peptides pour la détection rapide et fiable des anticorps dirigés contre le VIH1 et le VIH2.

Ce test est discriminant et permet de faire la différence entre les anticorps dirigés contre le VIH1 et ceux dirigés contre le VIH2.

· **Capture des anticorps anti VIH**

- Distribuer 3 gouttes (150µl) de réactif 1 (diluant échantillon) dans un micro tube.
- Ajouter 50 µl d'échantillon ou de contrôle.
- Mélanger le contenu du tube par pipetages successifs.
- Transférer immédiatement la totalité du contenu du micro tube dans le puits échantillon A du support de réaction.
- Jeter l'embout de la pipette et le micro tube en tant que déchet à risque biologique.
- Attendre l'absorption complète de la solution (environ 3mn).

· **Liaison du Conjugué**

- Ajouter 3 gouttes de réactif 2 dans le puits de réaction B.
- Attendre l'absorption complète de la solution (environ 3mn).

· **Lavage**

- Remplir à ras bord le puits de la réaction B avec le réactif 3
- Attendre l'absorption complète de la solution (environ 1mn).

· **Révélation**

- Ajouter 2 gouttes de réactif 4 dans le puits de réaction B
- Attendre l'absorption complète de la solution (environ 3mn).

· **Réaction d'arrêt**

- Remplir à ras bord le puits de réaction B avec le réactif 5.
- Attendre l'absorption complète de la solution et lire le résultat.

· **Interprétation**

Positif VIH-1 : L'apparition du spot de VIH-1 à gauche avec le spot du contrôle interne indique la présence d'anticorps anti VIH-1.

Positif VIH-2 : L'apparition du spot de VIH-2 du milieu avec le spot du contrôle interne indique la présence d'anticorps anti VIH-2.

Positif VIH : L'apparition des trois spots indique la présence d'anticorps anti VIH-1 et VIH-2.

Résultat Négatif : L'apparition du spot de contrôle interne seul indique l'absence d'anticorps anti VIH.

II.8. Analyse statistique

II.8.1. Description des caractéristiques de l'échantillon

II.8.2. Indicateurs mesurés

Nous avons :

- 1) Estimé la fréquence des résistances primaires
- 2) Estimé la fréquence des résistances secondaires
- 3) Estimé la fréquence des résistances selon le nombre d'antibiotique (mono résistance, poly résistance, multi résistance)
- 4) Estimé la répartition des multi résistances en fonction du statut VIH
- 5) Comparer le statut sérologique et le statut primaire et secondaire

En ce qui concerne les tests de comparaison, nous avons utilisé le test de Chi 2 et le test de Fischer exact lorsque les conditions du test de Chi2 n'étaient pas satisfaites. Nous avons retenu le seuil de signification de 5 %.

II.8.3. Autres analyses

Les données de l'étude ont été saisies et analysées sur ordinateur à l'aide du logiciel EPI INFO version 3.5 et les graphiques ont été construits à partir du logiciel Excel.

II.9. Considérations éthiques et réglementaires

Cette étude a reçu des avis favorables de mise en œuvre auprès du Comité d'Ethique pour la Recherche en Santé du BF et le Comité d'Ethique Institutionnel du Centre MURAZ. Une notice d'information et un formulaire de consentement ont servi à recueillir le consentement des patients. Toutes les données ont été collectées et traitées au laboratoire et les analyses ont été effectuées dans le logiciel EPI Info en respectant l'anonymat des patients.



RESULTATS

III.RESULTATS

III.1. Description de l'échantillon

Au total 316 patients ont été interviewés. Les cultures étaient positives pour 230 (72,8%), négatives pour 15 (4,7%) et contaminées pour 71 (22,5%). Parmi les 230 cultures positives, l'étude bactériologique a montré 226 (98,3%) souches du complexe *tuberculosis* et 4 (1,7%) MNT. Sur les 226 souches du complexe *tuberculosis* soumis au TSM, 195 (86,3%) avaient des résultats interprétables contre 31 (13,7%) dont les résultats étaient ininterprétables.

Figure 7 : Flow chart de l'étude sur la résistance du BK aux antituberculeux

Au total 195 patients ont été inclus dans notre étude. L'âge moyen des 195 patients était de 38,2 ans avec des extrêmes de 15 ans et 84 ans. La tranche d'âge la plus représentative était celle de 25 à 34 ans, soit 34,4% des patients, 70,3% (137/195) étaient de sexe masculin. Nous avons trouvé 187 nouveaux cas et 8 cas déjà traités.

III.2. Fréquence des résistances primaire et secondaire

La fréquence de la résistance primaire était de 24,4% (45/187). La fréquence de résistance globale secondaire était de 37,5% (3/8). Le profil phénotypique de résistance primaire des 187 souches du complexe *M. tuberculosis* est présenté au Tableau III.

Tableau III : Résistance du complexe *tuberculosis* aux antituberculeux chez les patients nouveaux cas et chez les patients déjà traités (résistance primaire et secondaire).

	Nouveaux cas		Anciens cas	
	Nombre	(%)	Nombre	(%)
Total testé	187	(100%)	8	(100%)
Sensibilité à tous médicaments	142	(75,9%)	5	(62,5%)
Résistance à au moins un médicament	45	(24,1%)	3	(37,5%)

III.3. Fréquence des résistances primaire et secondaire selon le type et le nombre d'antibiotique (mono résistance, poly résistance et MR)

Des mono résistances primaires ont été observées pour l'Isoniazide (10,7%), la Streptomycine (2,7%) et l'Ethambutol (1,6%) ; aucune souche n'était résistante à la Rifampicine seule. Aucune mono résistance secondaire n'a été observée. La fréquence des multi résistances ou MR était de 5,9% dans le groupe des patients nouveaux cas (NC) et de 37,5% dans le groupe des patients anciens cas (AC) (P=0,01). On a noté une proportion de 3,2% de poly résistance au sein des NC. Aucune poly résistance n'a été observée chez les patients présentant un antécédent de tuberculose.

Tableau IV : Résistance du complexe *tuberculosis* selon le type et le nombre d'antibiotique.

	Nouveaux cas		Anciens cas	
	Nombres	%	Nombres	%
Mono résistance				
H	20	10,7%	00	00,0%
R	00	00,0%	00	00,0%
E	03	1,6%	00	00,0%
S	05	2,7%	00	00,0%
Total	28	15%	00	00,0%
Résistance à				
H+R (TB.MR)				
HR	00	00,0%	00	00,0%
HRE	07	03,7%	01	12,5%
HRS	04	02,1%	02	25%
HRES	00	00,0%	00	00,0%
Total	11	05,9%	03	37,5%
Autres résistances (Poly résistance)				
HE	00	00,0%	00	00,0%
HS	04	02,1%	00	00,0%
HES	01	00,5%	00	00,0%
RE	00	00,0%	00	00,0%
RS	00	00,0%	00	00,0%
RES	00	00,0%	00	00,0%
ES	01	00,5%	00	00,0%
Total	06	03,2%	00	00,0%

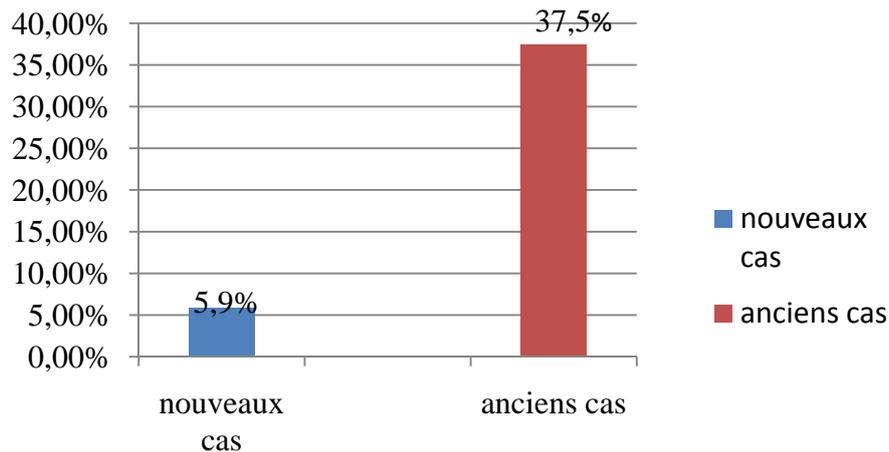


Figure 8: Fréquence de la TB-MR selon le profil des patients

III.4. Répartition des multi résistances (MR) en fonction de la sérologie

Sur les 195 patients, nous avons pu réaliser la sérologie VIH de 184 patients. Nous avons trouvé 9,2% (17 / 184) de patients VIH positif, 90,8% (167 / 184) de patients VIH négatif.

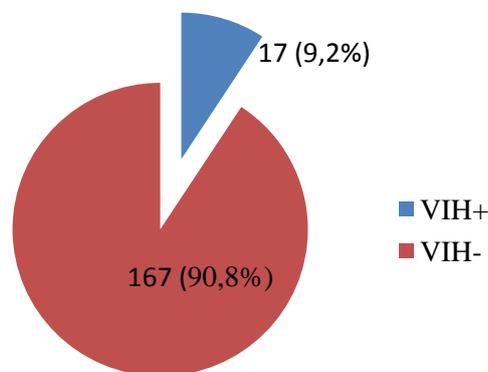


Figure 9 : Fréquence des VIH+ et VIH-

Parmi les nouveaux cas, la fréquence de MDR était de 6,25% chez les VIH+ versus 6,21% chez les VIH-négatifs ($P=0,65$). Nous avons trouvé que 14,3% (1/7) des 7 patients déjà traités étaient VIH-positifs. La fréquence de MDR était de 100% chez les VIH-positifs versus 33,3% VIH-négatifs ($P=0,42$).

III.5. Comparaison des patients VIH selon le statut primaire ou secondaire

Tableau V : Répartition des patients en fonction du profil et du statut sérologique

Sérologie VIH	Profil des patients			
	NC		AC	
	N	(%)	N	(%)
Positif	16	(9%)	1	(14,3%)
Négatif	161	(91%)	6	(85,7%)
Total	177	(100%)	7	(100%)

La prévalence du VIH était de 9% (16/177) dans le groupe des patients nouveaux cas et de 14,3% dans le groupe des patients ayant déjà été traités (P=0,5).

A decorative scroll-like border containing the word DISCUSSION.

DISCUSSION

III. DISCUSSION

IV.1. Principaux résultats

Nous avons trouvé sur 195 (187 NC et 8 AC) patients TPM+, une résistance primaire de 24,1% et 5,9% des souches testées étaient multi résistantes. La fréquence de résistance aux antituberculeux testés était plus élevée chez les cas ayant un antécédent de traitement (37,5%). La sérologie VIH était positive chez 9,2% des 184 patients consentants. Il n'existait pas de lien statistiquement significatif entre le statut VIH et la multi résistance aux médicaments chez les nouveaux cas ($P= 0,65$) et chez les anciens cas ($P= 0,42$).

IV.2. Limite de l'étude

La taille de notre échantillon constitue une des limites de notre étude. La méthode de recrutement successif des cas, la période d'étude courte pourraient expliquer l'effectif faible rencontré notamment chez les patients ayant un antécédent de TB. Aussi, le taux élevé de contamination (22,5%) a réduit considérablement la taille de la population. Tout ceci peut participer à élever la fréquence des résistances.

IV.3. Description de l'échantillon

La population était composée majoritairement d'adultes jeunes à prédominance masculine (70,3%), dont la proportion était supérieure à celle de tous les cas masculins nationaux avec des frottis positifs en 2005-2006 (68% ; $n= 416$) [Sangaré *et al.*, 2010]. La prédominance masculine rencontrée dans notre étude est superposable à celle d'autres études africaines [Ogaro *et al.*, 2012; Umubyeyi *et al.*, 2007]. Elle pourrait résulter de différences d'exposition entre les hommes et les femmes dans leur rôle sociétal, c'est-à-dire de différences en rapport avec leurs activités, les hommes occupant différents secteurs d'activité, ce qui facilite la transmission du bacille tuberculeux [Sangaré *et al.*, 2010].

Notre étude a montré que la tranche d'âge de 25 à 34 ans est la plus touchée par la tuberculose avec 34,4%. Cela peut s'expliquer par le fait que la population du Burkina Faso est à majorité jeune. Cette tendance a été notée par une étude réalisée au Burkina Faso en 2005 par Lougué / Sorgho LC *et al* dans leur étude sur les aspects radiologiques de la tuberculose pulmonaire positive de l'adulte [Lougué *et al.*, 2005].

IV.4. fréquence des résistances primaire et secondaire

Dans notre étude, 24,1% (45/187) des isolats étaient résistants à au moins un médicament. Cette proportion est au dessus du seuil critique fixé par l'OMS à 10% [Boulaïbal *et al.*, 2004].

La résistance chez les nouveaux cas ou résistance primaire résulte de la transmission directe de mycobactéries déjà résistantes aux antituberculeux : son taux augmente habituellement lorsque celui des résistances chez les cas antérieurement traités est déjà important et que les conditions de dissémination sont favorables [Sangaré *et al.*, 2010]. Cette augmentation traduirait donc une forte prévalence de personnes vivant avec des BK déjà résistants au Burkina Faso, la prévalence de la résistance primaire étant le reflet de l'importance du réservoir de souches résistantes parmi les cas déjà traités [Boulaïbal *et al.*, 2004].

Une autre étude menée au Burkina Faso sur les résistances aux médicaments antituberculeux en 2010 par Sangaré *et al.* a rapporté une proportion de 12,4% (40/323) [Sangaré *et al.*, 2010]. La proportion plus élevée de notre peut s'expliquer par l'augmentation constante de la résistance dans le monde [PNT, 2009].

La résistance secondaire observée dans notre étude était de 37,5%. Cette proportion est en deçà du taux de résistance secondaire observé par Sangaré *et al.* en 2010 qui était de 66,7% [Sangaré *et al.*, 2010]. Cette différence pourrait s'expliquer par la faible population enregistrée dans notre étude pour cette catégorie de patients c'est-à-dire des patients ayant un antécédent de tuberculose.

Le taux de 13% rapporté par l'OMS est inférieur à celui obtenu dans cette étude ; il peut provenir de pratique de routine et non d'une étude [Sangaré *et al.*, 2010].

Par comparaison, des fréquences plus élevées ont été observées au Rwanda (39,2%) et au Bénin (54,2%) [Sangaré *et al.*, 2010]. Cela peut s'expliquer par le fait qu'il y a une variabilité géographique sur la distribution des résistances aux médicaments antituberculeux [Shao *et al.*, 2011].

IV.5. Fréquence des multi résistances (MR) primaire et secondaire

Dans notre étude, 5,9% des isolats étaient MR chez les nouveaux cas. Lorsque les programmes de chimiothérapie standardisée et conforme aux recommandations de l'OMS sont appliqués, la prévalence de la TB-MR primaire est inférieure à 3% [Boulaïbal *et al.*, 2004]. Des taux de multi résistance supérieurs à 5,9% ont été rapportés au Rwanda (7%) [Umubyeyi *et al.*, 2007] et dans la province de Henan en Chine (11%) [Nachega *et al.*, 2003].

Ces différences pourraient s'expliquer par les forts taux de TB dans ces pays. Par contre des taux plus faibles ont été observés à Madagascar (0,2%) [Ramarokoto *et al.*, 2010] et au Kenya (0,54%) [Ogaro *et al.*, 2012].

La proportion de la TB-MR secondaire rapporté par notre étude était de 37,5% (3/8). Au Burkina Faso, les TSM sont peu courant. Cela signifie que les patients chez qui on a noté des multi résistances ont été soumis à un traitement antituberculeux de première ligne alors que les TB-MR ne sont pas sensibles à ces antituberculeux. Ces patients traités à tort seront probablement en échec de traitement et constitueraient donc un réservoir de dissémination de souches multi résistantes. Cette étude démontre l'importance des TSM en complément de la microscopie dans le traitement de la tuberculose en particulier chez les patients à risque. Des fréquences supérieures ont été observées au Kenya (8,54%) et au Rwanda (25,5%) [Ogaro *et al.*, 2012; Umubyeyi *et al.*, 2007]. Notre résultat est par contre inférieur à celui trouvé par Sangaré L *et al.* dans leur étude sur la résistance aux antituberculeux chez les cas de tuberculose pulmonaire nouveaux ou traités antérieurement au Burkina Faso en 2005-2006 qui était de 50,5%.

La survenue de la multi résistance est une menace majeure, à la fois au niveau individuel qu'au niveau du programme national de lutte antituberculeux. En effet, les patients hébergeant ces souches sont extrêmement difficiles à soigner et nécessitent des traitements beaucoup plus coûteux et malheureusement plus toxiques [Ouédraogo *et al.*, 2010].

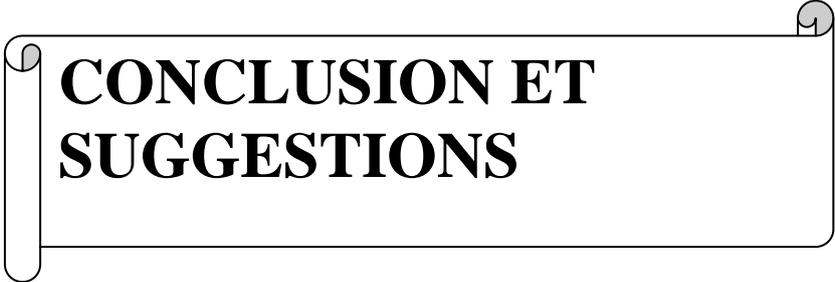
La fréquence d'apparition de la multi résistance chez les nouveaux cas (5,9%) différait significativement de celle des anciens cas (37,5%) avec $P= 0,01$. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Merza MA *et al.* dans leur étude sur la résistance aux antituberculeux et les facteurs de risques associés en Iran de 2000 à 2005 [Merza *et al.*, 2011]. Les patients ayant un antécédent de traitement ou anciens cas seraient plus à risque de développer la multi résistance car ils ont déjà été en contact avec l'INH et la RMP utilisé aussi bien en phase intensive de traitement qu'en phase de continuation.

IV.6. Répartition des multi résistances en fonction de la sérologie

Notre étude a montré que 9,2% (17 / 184) des patients étaient VIH positif. Cette fréquence est en deçà de celle du PNT du Burkina Faso qui rapporte une séroprévalence de 15% parmi les patients TPM+ [Zida, 2012]. Selon le rapport 2012 de l'ONUSIDA la prévalence moyenne de l'infection à VIH dans la population adulte du Burkina Faso est estimée à 1,1% en fin 2011 [CNLS-IST, 2013]. Cette baisse importante de la prévalence pourrait être le résultat

combiné des programmes de prévention et de la thérapie antirétrovirale qui ont significativement atténué le risque de transmission du VIH.

Dans notre étude, la fréquence de la TB-MR chez les patients séropositifs pour le VIH ne différait pas significativement de celle des malades séronégatifs pour le VIH aussi bien chez les patients nouveaux cas que chez les patients ayant un antécédent de traitement avec respectivement $P= 0,65$ et $P= 0,42$. Le VIH affaiblit l'immunité cellulaire humaine et raccourcit le temps de passage de la tuberculose infection à la tuberculose maladie [Berhan *et al.*, 2013]. Cependant, cette analyse montre que le risque de développer une tuberculose multi résistante semble ne pas être lié à l'immunité. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres études africaines [Benon, 2008; Berhan *et al.*, 2013; Kouassi *et al.*, 2004]. La réponse au traitement antituberculeux est habituellement similaire chez les patients avec et sans VIH. La guérison des cas contagieux est toujours possible, cependant, les patients VIH-positifs présentent un risque plus élevé de souffrir de la toxicité et des effets indésirables des médicaments et d'en mourir pendant le traitement [Sangaré *et al.*, 2010].



**CONCLUSION ET
SUGGESTIONS**

CONCLUSION

La résistance aux antituberculeux constitue un problème réel et une préoccupation dans le monde. Le Burkina Faso n'est pas en marge car confronté à ce problème. En effet, notre étude a montré des fréquences de 24,1% de résistance globale et 5,9% de MDR chez les nouveaux cas de *M. tuberculosis* versus 37,5% de résistance globale qui représente aussi la fréquence des MDR chez les cas traités antérieurement. Notre étude a aussi révélé que les patients ayant un antécédent de tuberculose étaient plus à risque de développer la TB MR (MDR), mais nous n'avons pas noté de différence entre les patients VIH positif et VIH négatif.

La difficulté du diagnostic de tuberculose pharmaco résistante (liée au temps de d'isolement, d'identification et des TSM) est le premier de la longue série d'obstacles que rencontrent les soignants sur le terrain. La fréquence élevée des résistances devrait interpeller les décideurs à développer des stratégies pour un diagnostic précoce de ces cas afin de préserver l'avenir thérapeutique des patients traités et la population exposée.

SUGGESTION

➤ Au PNT

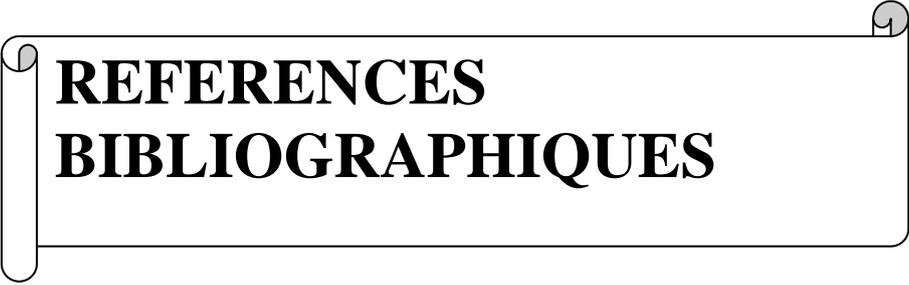
Intégrer le dépistage des résistances dans les documents plan pour le dépistage précoce des résistances avant la fin des traitements

➤ Aux chercheurs

Développer la recherche sur les outils de diagnostic des résistances adaptés aux contextes général (BF).

➤ Aux décideurs

Faciliter l'accès aux techniques de diagnostic rapide déjà existantes

A decorative horizontal scroll graphic with a black outline and rounded ends. The scroll is unrolled, showing the text inside. The text is in a bold, black, serif font.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Affolabi D., Adjagba O. A. B. G., Tanimomo-Kledjo B., Gninafon M., Anagonou S. Y, Portaels F., 2007.** Antituberculosis drug resistance among new and previously treated pulmonary tuberculosis patients in Cotonou, Benin. *Int J Tuberc Lung Dis*; 11(11),1221–1224.
- Barrera L., 2007.** The Basics of Clinical Bacteriology. In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, editors. Tuberculosis 2007: from basic science to patient care. Brazil; 93-112.
- Bendadda O., 2003.** Tuberculose humaine à *Mycobacterium bovis*: Enquête bactériologique et Application de la PCR à la détection et l'identification du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Thèse de Doctorat d'Université, Biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la santé. Fès : Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Faculté des Sciences Dhar Mehraz. 169p.
- Benon A., 2008.** Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Kampala, Uganda Thèse de Doctorat. Kampala: Makerere University. Departement of Medical Microbiology, College oh Health Sciences. 39p
- Berhan A., Berhan Y., Yizengaw D., 2013.** A meta-analysis of drug resistant tuberculosis in sub-saharan africa: how strongly associated with previous treatment and hiv co-infection? *Ethiop J Health Sci.* 23, (3): 271-282.
- Boulahbal F., Chaulet P., 2004.** La tuberculose en afrique épidémiologie et mesures de lutte. *Med Trop.* 64 : 224-228
- Chanteau S., Rasolofo V., Ramarokoto H., Rasolonavalona T., Ratsirahonana O., Ratsitorahina M., Rakotomanana F., Boisier P., Cauchoix B., Auregan G., 1997.** Résistance aux antituberculeux à Madagascar en 1994-1995. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1 (5), 405-410.
- CNLS-IST, 2013.** Termes de références pour l'identification de paquet minimum d'activités au profit des groupes spécifiques, 6p.

- Cole S. T, Brosch R., Parkhill J. et coll., 1998.** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393: 537-544.
- Harries A., Maher D., Graham S., 2005.** Informations générales sur la tuberculose et le vih. In : OMS, editor. TB/VIH : Manuel Clinique. Genève, 23-42.
- Kabedi M. J., Kashongwe M., Kayembe J. M., Mumba Ngoyi D., Mampasi P., Fissette K., Verhaegen J., Portaels F., Muyembe-Tamfum J. J., 2007.** Primary resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to anti tuberculosis drugs in Kinshasa, (DRC). *Bull Soc Patho Exot.* 100(4), 275-6.
- Kouassi B., Horo K., N'douba K. A., Ngom A., Aka-Danguy E., Dosso M., 2004.** Epidemiological, clinical and biological profile of resistant or recurrent pulmonary tuberculosis in Abidjan. *Bull Soc Pathol Exot.* 97 (5): 336-7.
- Langlet M., 2007.** La tuberculose résistante, l'épidémie cachée. *Le Journal du SIDA.* (196), 26-27.
- Ledru S., Cauchoix B., Yaméogo M. et al. 1996.** Impact du traitement de courte durée sur la résistance aux médicaments antituberculeux dans le Sud Ouest du Burkina Faso. *Tuberc Lung Dis.* 77 (5) : 429-36.
- Lougue / Sorgho L. C., Cisse R., Ouedraogo M., Koshinga B. A., Kouanda S., Bamouni Y. A., Tapsoba T. L., Drabo Y. J., 2005.** Les aspects radiologiques de la tuberculose pulmonaire à bacilloscopie positive de l'adulte dans un pays à forte prévalence tuberculose / VIH. *Sidanet.* 2(7), p870.
- Merza M. A., Farnia P., Tabarsi P., Khazampour M., Masjedi M. R., Velayati A. A., 2011.** Anti-tuberculosis drug resistance and associated risk factors in a tertiary level TB centre in Iran: a retrospective analysis. *J Infect Dev Ctries.* 5(7), 511-519.
- Migliori G. B., Dheda K., Centis R., Mwaba P., Bates M., O'Grady J., Hoelscher M., Zumla A., 2010.** Review of multidrug resistant and extensively drug resistant TB: global perspectives with a focus on sub-Saharan Africa. *Tropical Medicine and International Health*, 15 (9): 1052-1066.

- Nachega J. B., Chaisson R. E., 2003.** Tuberculosis Drug Resistance: A Global Threat. *Clin Infect Dis. 36 (Suppl1): S24-S30.*
- Ogaro T. D., Githui W., Kikvi G., Okari J., Wangui E., Asiko V., 2012.** Anti-tuberculosis drug resistance in Nairobi, Kenya. *Afr J Health Sci. 20, 21-27.*
- OMS, 1997.** Guide pour la surveillance de la résistance bactérienne aux médicaments antituberculeux. WHO/TB/96. 216.
- OMS, 2009.** Tuberculose multi résistante et ultra résistante : prévention et lutte. Avril 2009, 5p
- Otu A., Umoh V., Habib A., Soter A., Lawson L., Ansa V., 2013.** Drug resistance among pulmonary tuberculosis patients in Calabar, Nigeria. *Pulmonary medicine. ID 235190, 6 p*
- Ouédraogo M., Ouédraogo S. M., Diagbouga S., Coulibaly G., Achi V., Domoua K., N'Dathz M., Yapi A., 2010.** Résistance simultanée à la rifampicine et à l'isoniazide chez des malades atteints de tuberculose pulmonaire. *Rev Mal Respir. ; 17 :477-480.*
- Pilet C., Bourdon J. L, Toma B. et coll., 1979.** Bactériologie médicale et vétérinaire. 2ème édition. Oubr A, Buttiaux R (eds.). DOIN éditeurs. Paris. 438p.
- PNT, 2009.** Guide technique de prise en charge des cas de tuberculose pharmaco résistante au Burkina Faso, Burkina Faso. Ed 2009 : 115p.
- PNT, 2011.** Guide technique de lutte contre la tuberculose, Burkina Faso. Ed 2011 :144p.
- Ramarokoto H., Ratsirahonana O., Soares J. L., Ravaosolo J., Ravololonandriana P., Rakotoarisaonina A., Ranjalahy G., Ranaivohajaina S., Mosa M., Robinson R., Ratsitorahina M., Rasolofo V., Rarivoson B., 2010.** Première enquête nationale sur la résistance de Mycobacterium tuberculosis aux antituberculeux à Madagascar, 2005–2006. *Int J Tuberc Lung Dis. 14(6):745–750.*
- Ratsirahonana O., Rasolofo V., Rasolonalona T., Rakotonirina V., Rakotoarisaonina A., Rakotoherisoa A., Ralamboson M., Cauchoix B., Rakotondramarina D., Ramarokoto H., 2002.** Résistance de Mycobacterium

tuberculosis aux antituberculeux à Antananarivo en 2000. *Arch Inst Pasteur Madagascar*. 68, 44-47.

Raviglione M. C, Espinal M. A., 2000. Vers une meilleure surveillance de la résistance aux antituberculeux en Europe. *Euro Surveill*, 5(10) :103-114.

Sangare L., Diande S., Badoum G., Dingtounda B., Traore A. S., 2010. Anti-tuberculosis drug resistance in new and previously treated pulmonary tuberculosis cases in Burkina Faso. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 14(11):1424-1429.

Shao Y., Yang D., Xu W., Lu W., Song H., Dai Y., Shen H., Wang J., 2011. Epidemiology of anti-tuberculosis drug resistance in a chinese population: current situation and challenges ahead. *BMC Public Health*, 11(1):110.

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

Umubyeyi A. N, Rigouts L., Zissis G., Kamanzi E., Pauwels P., Gasana M., Vandebriel G., Struelens M., Portaels F., 2007. Résistance primaire et acquise aux antituberculeux des souches de *Mycobacterium tuberculosis* isolées au Rwanda. *Med Trop*. 67 :149-153.

Van Soolingen D., De Haas P. E, Haagsma J. et coll., 1994. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol*, 32: 2425-2433.

Zida S., 2012. Tuberculose et mycobacterioses atypiques dans la région des Hauts Bassins, Burkina Faso. Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA), Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques. Bobo- Dioulasso : Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso. Institut de Développement Rural, 62p.

Zignol M., Gemert Wv., Falzon D., Sismanidis C., Glaziou P., Floyd K., Raviglione M., 2012. Surveillance of anti-tuberculosis drug resistance in the world: an updated analysis, 2007–2010. *Bulletin of the World Health Organization*. 90,111-119D.

WHO 2013. Global tuberculosis report: report 2013 (WHO/HTM/TB/2013.11).

- Biomnis, 2012.** Mycobactéries. Consulté le 15/03/2013. URL: www.biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/MYCOBACTERIES.pdf
- Demangeat C., Fontaine M., Medda F., 2014.** La tuberculose du XIXème au XXIème siècle. Consulté le 07/02/2014. URL: <http://tpetuberculose.wordpress.com/type/quote/>
- Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, 2014.** La tuberculose. Consulté le 07/02/2014. URL : <http://www.institutpasteur.nc/la-tuberculose/>
- Neidhardt J. P. H., 2007.** Histoire de la tuberculose. Consulté le 15/11/2013. URL: <http://spiral.univ-lyon1.fr/.../Histoire%20de%20la%20tuberculose%20P.pdf>
- OMS, 2013.** Tuberculose. consulté le 13/11/2013. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/fr/>.
- Réseau International des Instituts Pasteur, 2013.** La Tuberculose. consulté le 07 /06/2013. URL: <http://www.pasteur-international.org/ip/resource/filecenter/document/01s-000042-0hu/plaquette-tb-fr>,
- Slim-Saïdi L., 2009.** Evolution de la résistance aux antituberculeux. Consulté le 15/02/2013. URL: www.liguerespir.org.tn/tbc%202006/ligue25.ppt
- Vincent C., 2012.** La tuberculose devient de plus en plus résistante. Consulté le 13/11/2013. URL: http://www.lemonde.fr/planete/article/2012/03/24/la-tuberculose-de-plus-en-plus-resistante_1675109_3244.html

A decorative scroll-like border containing the word ANNEXES. The border is a thin black line with rounded corners and small circular details at the top and bottom edges, resembling a rolled-up document.

ANNEXES

ANNEXE 1 : La préparation des milieux de culture de Löwenstein-Jensen

La préparation des milieux de culture de Löwenstein-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 Löwenstein Jensen
- Solution de glycérol
- Ballons de 3l
- Eau distillée
- Billes de verre de 7 mm de diamètre
- Pipettes de 10 ml
- Epprouvettes 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

1. Le premier jour (J1)

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.

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.

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) ;

2. Le deuxième jour (J2)

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 ;

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 paillasson 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.

3. Préparation du milieu de L.J. enrichi avec du pyruvate de sodium à 0,2%

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 répartir en tube à raison de 7 ml par tube (voir plus haut) ;

4. Préparation du milieu de L.J. enrichi avec du pyruvate de sodium à 0,5 %

Ex : préparation de 100 tubes de milieu de Löwenstein-Jensen enrichi avec 0,5 % de Pyruvate de sodium sans glycérol :

- Dans un erlenmeyer (1000 ml), mettre stérilement 600 ml de milieu de Löwenstein-Jensen (avec œufs mais avant coagulation) sans glycérol.
- Ajouter stérilement 15ml de pyruvate de sodium à 20 %
- Bien agiter et répartir en tube à raison de 7 ml par tube.

ANNEXE 2 : Fiche de collecte

Numéro chronologique de la fiche :

Numéro Identifiant du patient: |_| |_|_|_| |_|

Nom du site :

I. Caractéristiques sociodémographiques

01. Age (ans): |_|_|

02. Sexe : Masculin Féminin

II. Aspects cliniques

03. Antécédents de tuberculose : oui non

04. Forme pulmonaire : TPM+ TPM-

III. Aspects biologiques

III.1. Sérologie VIH

05. Statut VIH : Négatif Positif

06. Si positif, Type de VIH : VIH1 VIH2 VIH1+2

III.2. Identification des mycobactéries

07. Complexe *tuberculosis* :

08. Mycobactérie atypique :

III.3. Tests de sensibilité aux antibiotiques de premières lignes (S : Sensible ; R : Résistant)

09. Streptomycine: S R

10. Éthambutol: S R

11. Rifampicine: S R

12. Isoniazide: S R