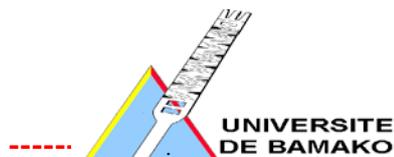


MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE DU MALI
Un Peuple - Un But



Faculté de Médecine, de Pharmacie et
d'Odonto Stomatologie

Année Universitaire 2009-2010

N° :...../

Titre

*LA PROBLEMATIQUE DE LA MISE EN
ŒUVRE DE LA CULTURE DU BACILLE
DE KOCH DANS LE LABORATOIRE
NATIONAL DE REFERENCE DE LA
TUBERCULOSE DU MALI (LNR)*

THESE

Présentée et soutenue publiquement le /__/_/2009

Par Epouse **SISSOKO Née FATOUMATA M TOURE**

Pour obtenir le grade de **Docteur en Pharmacie**
(Diplôme d'État)

Jury

Président : Pr. Gaoussou KANOUE
Membre : Dr. Mohamed BERTHE
Co-directeur : Dr. Abdelaye KEITA
Directeur de thèse : Pr. Flabou BOUGOUDO

A ALLAH (SWA)

Le tout puissant miséricordieux
Pour m'avoir donné la force nécessaire
Et le courage pour la réalisation de ce modeste travail.
Merci pour la grâce dont je suis l'objet.
Accorde moi ta bénédiction afin que je sois sage de cœur,
Que je ne trébuche pas, mais que mes jours se
multiplient,
Et que les années de ma vie s'augmentent dans ta paix.

DEDICACES

A mon père (MAMADOU B TOURE)

Ce fut difficile, tu as été pour moi un exemple à suivre,
l'éducation, la rigueur pour le travail bien fait que tu nous as

enseignées et l'amour que tu nous as donné nous ont beaucoup aidés, j'espère qu'un jour on dira de moi "tel père telle fille" Qu'Allah le tout puissant te garde toujours à mes cotés.

A mes mères (NAKIA TRAORE, Djelika DIAKITE)

Si l'on avait le pouvoir de se choisir une mère, je n'aurai pas hésité une seconde à vous choisir. Vous est l'exemple de ma vie, la lumière qui a guidé mes pas et qui continuera toujours à me guider. Je n'aurai jamais assez de vos conseils et de votre tendresse. Puisse Dieu vous prêter une longue et solide vie pour que vous vous rendez compte à quel point vous êtes ma référence et pour que vous soyez encore fière de moi. Qu'Allah vous bénisse et vous récompense.

A mes petits frères et sœurs (Mambé, Mamadou, Awa et Kadiatou)

Je n'exprimerai jamais assez tout l'amour que je ressens pour vous. Vous êtes et vous serez toujours mes premiers compagnons pour la vie, je vous souhaite beaucoup de courage et de chance dans la vie pour qu'ensemble nous puissions adoucir et remplir de bonheur nos parents.

A mon cher et tendre époux (Mody Sissoko)

Ton sens du respect pour ton prochain, ta tolérance, ta sagesse, la bonté de ton cœur et ton sens de l'humour à toute épreuve font de toi le gendre que tout parent espère pour sa fille et l'époux dont toute femme rêve dans sa vie. Tes conseils, ton amour, ta patience et surtout ta compréhension m'ont été indispensables pour la réalisation de cette thèse qui est aussi la tienne.

A ma fille chérie (Assa Oumy Sissoko)

Que ce travail soit pour toi le signe de ma profonde affection.

A mes beaux parents : Merci pour toutes ces qualités que vous avez inculquées à mon époux.

A tous mes cousins et cousines : Voyez en ce travail toute ma sympathie.

A tous mes oncles et tantes paternels et maternels : Soyez assurés de ma profonde reconnaissance.

A mes grands parents : Merci pour vos bénédictions

A ma tante chérie (Sitan Traoré)

Gentille et vertueuse, tu m'as entouré d'une attention et d'une affection jamais égalées. Trouve à travers ce modeste travail le témoignage de ma profonde gratitude.

A mes très chères amies (Fatoumata M.T Ky, Neissa Camara et Sighoko Alliance)

Vous êtes plus que des amies pour moi, mais des sœurs. Que ce travail soit un lien qui nous unisse encore d'avantage.

A mon grand frère et aîné (Aboudramane BATHILY)

Que ce travail soit pour toi le signe de ma profonde gratitude.

REMERCIEMENTS

Au corps enseignant de la FMPOS

Chers maîtres, merci pour toutes ces connaissances apprises auprès de vous. Soyez rassurés que j'en ferai bon usage pour porter haut le flambeau de cette faculté.

Au personnel du service de l'INRSP : Merci pour tout ce que j'ai appris auprès de vous pendant ma formation.

Au personnel du service de la bactériologie : Merci pour votre collaboration. Recevez toute ma reconnaissance.

A Mme Sangaré Fatima, Mr Touré Isac M, vous qui avez guidé mes pas en matière de recherche au LNR, recevez ma Profonde gratitude.

A Messieurs Amadou, Maiga, Yossi, Daou Ibrahim et Mesdames Awa, Alimatou, Aissata et Fatim. Mes sincères remerciements.

A mon collègue et aîné Dr Ouattara Abdoulaye : Pour vos encouragements, vos soutiens et pour tous ces moments passés ensemble, veuillez recevoir l'expression de mon infinie reconnaissance.

A toute ma promotion : Toutes mes affections et bonne carrière professionnelle

A notre maître et président du jury
Professeur Gaoussou Kanouté

Professeur de chimie analytique
Responsable de l'enseignement de chimie analytique à la Faculté de
médecine, de pharmacie et d'odontostomatologie

Cher maître, vous nous faites un grand honneur en acceptant de
présider le jury de notre thèse malgré vos multiples occupations.

Au-delà de notre respectueuse reconnaissance pour l'agréable
professeur que vous avez été, nous sommes toujours très sensibles
à vos qualités humaines et intellectuelles.

Veillez croire monsieur le président, à l'expression de notre
grande admiration et notre profonde gratitude.

A notre maître et juge
Docteur Abdelaye Kéita
Doctorat d'état en pharmacie
DEA en Biotechnologie et immunologie appliqués aux maladies
transmissibles
DESS Hémiobiologie et transfusion sanguine
Chef Adjoint à l'unité de la tuberculose service de bactériologie
à l'INRSP

Cher maître, nous sommes très honorés de votre présence parmi les
juges de ce travail. Votre simplicité, votre générosité et votre
sens du travail bien fait font de vous un maître apprécié et
admiré de tous.

Veillez accepter cher maître toute notre profonde gratitude.

**A notre maître et juge
Docteur Berthé Mohamed
Docteur en médecine
Coordinateur Adjoint du Programme National de Lutte Contre la
Tuberculose**

Chère maître, vous nous faites un honneur en acceptant de siéger dans ce jury malgré vos multiples occupations. Nous vous remercions pour l'aide précieuse que vous avez apportée à notre travail.

Veillez trouver ici, chère maître l'expression de nos sincères remerciements et de notre profond respect.

A notre maître et directeur de thèse
Professeur Flabou BOUGOUDOGO

Professeur agrégé en Bactériologie et Virologie
Directeur de l'Institut National de Recherche en Santé Publique
Responsable de l'enseignement de Bactériologie et de virologie à
la faculté de médecine, de pharmacie et d'odontostomatologie

Cher maître, en acceptant notre travail, vous nous avez signifié par la même occasion votre confiance. Nous vous remercions de nous avoir accepté au sein de votre service. Votre expérience, votre rigueur dans la recherche scientifique, votre dévouement pour le travail correct, vos qualités exceptionnelles de chercheur, de formateur, l'étendu de votre savoir font de vous un maître accompli, admirable et respecté.

Veillez accepter cher maître toute notre profonde gratitude.

LISTE D'ABREVIATIONS

BAAR : Bacille Acido-Alcoololo-Résistant
BCG : Bacille de Calmette et de Guerin
BK : bacille de Koch
c : commune
C : contaminé
Cm : centimètre

CSRéf : Centre de Santé de Référence
Cp : comprimé
°C : degré Celsius
E : éthambutol
g : gramme
h: heure
H : isoniazide
IDR : IntraDermo-Réaction
INRSP : Institut National de Recherche en Santé Publique
LNR : Laboratoire National de Référence
Mn : minutes
mg/kg : milligramme/kilogramme
mg: milligramme
mm: millimètre
ml: millilitre
N : négatif
Nvx : nouveaux
N° : numéro
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
P : positif
PSM : Postes de Sécurité Microbiologique
% : pourcentage
R : rifampicine
S : streptomycine
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
S2 : suivi deuxième mois
S3 : suivi troisième mois
S5 : suivi cinquième mois
S7: suivi septième mois
>S8 : suivi supérieur au huitième mois
T : tioacétazone
TEP : tuberculose extra pulmonaire
TPM+ : tuberculose pulmonaire à microscopie positive
TPM- : tuberculose pulmonaire à microscopie négative
UICMR : Union Internationale de La Lutte Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires
UV : Ultra Violet
VIH : Virus De L'Immunodeficiency Humaine
Z : Pyrazinamide

TABLES DE MATIERES

I.	
INTRODUCTION.....	1
II. OBJECTIFS.....	3
1. Objectif général.....	3
2. Objectifs spécifiques.....	3

III. GÉNÉRALITÉS.....	4
1. Définition.....	4
2. Agents pathogènes.....	4
3. PHYSIOPATHOLOGIE.....	10
4. DIAGNOSTIC.....	15
5. EVALUATION ET PREVENTION DES RISQUES.....	28
6. Tâches du LNR	49
7. Besoin en personnel au LNR	50
IV. METHODOLOGIE.....	52
1. CADRE D'ETUDE.....	52
2. CREATION ET MISSION DE L'INRSP.....	52
3. Période d'étude.....	53
4. Type d'étude.....	53
5. Echantillonnage.....	53
6. Critères d'inclusion.....	54
7. Critères de non inclusion.....	54
8. Méthodes.....	54
9. Saisie edonnées	58
10. Considérations éthiques.....	58
V RESULTATS.....	60
VI. DISCUSIONS.....	73
VII. CONCLUSION.....	78
VIII. RECOMMANDATIONS.....	79
BIBLIOGRAPHIES.....	80
I. ANNEXES.....	85

INTRODUCTION

La Tuberculose est une maladie infectieuse transmissible et contagieuse provoquée par une mycobactérie du complexe tuberculosis correspondant à différents germes et principalement *Mycobacterium tuberculosis* ou bacille de Koch (BK). [3]

Malgré l'avènement des nouvelles mesures thérapeutiques l'épidémie mondiale a gagné du terrain. [21]

D'après les estimations de l'OMS, l'incidence de la maladie est passée de 7,3 millions en 1996 à 8,8 millions de cas en 2002. 2 millions de décès par an sont attribuables à la tuberculose. 98 % de ces décès surviennent dans les pays d'Afrique, d'Asie et d'Amérique latine. 450 000 des décès sont dus à la coinfection tuberculose / VIH. L'Afrique subsaharienne qui compte environ 11% de la population mondiale, notifie par an 24% des cas de tuberculose toutes formes et 26% des cas de tuberculose pulmonaire contagieuse. L'incidence estimée de la tuberculose contagieuse est de 63 pour 100 000 habitants en moyenne mondiale, en Afrique subsaharienne, elle atteint 149 pour 100 000 habitants [5].

Dans le monde on compte une nouvelle infection chaque seconde et 5 à 10% des sujets infectés (non infectés par le VIH) développent la maladie ou deviennent contagieux au cours de leurs existences. [44]

La croissance reste très forte en Afrique avec une proportion importante de séropositivité HIV (près de 13% contre moins de 1% dans les pays Asiatiques) [3].

Le rapport annuel 2007 du Programme National de Lutte contre la Tuberculose (PNLT) du Mali, à l'instar des précédents, résume le bilan des activités de Lutte contre la maladie. Il présente la synthèse des activités de dépistage, de traitement, du réseau de microscopie et aussi des activités de soutien (approvisionnement en médicaments, réactifs et autres fournitures spécifiques, formation, supervision et réunion de monitoring) à tous les niveaux de la pyramide. [32]

L'incidence de la tuberculose au niveau national a été estimée à 123 pour 100 000 habitants en 2007.

Environ 26% des cas sont déclarés pour une population de 12 millions d'habitants ; ceci reste insignifiant dans la prise en charge de la tuberculose car le PNLIT s'est fixé comme objectif le dépistage d'au moins 70% de nouveaux cas.

La culture qui permet d'augmenter le taux de dépistage et confirmer les cas de résistances n'était pas faite au LNR de 2000 à 2007.

Le rôle du laboratoire est essentiel pour obtenir la confirmation d'un diagnostic clinique et radiologique de tuberculose, grâce à l'isolement et à l'identification de l'agent étiologique de la maladie. La culture est le moyen le plus sûr d'établir ce diagnostic car elle est beaucoup plus sensible que l'examen microscopique puisqu'elle est positive même quand le nombre de mycobactéries ne dépasse pas 100 cellules par ml d'échantillon. [22] L'étude in vitro de la sensibilité des germes isolés par culture à l'égard d'agent antituberculeux (plus spécifiquement l'INH et RMP), permet souvent d'adapter la thérapeutique avant que la résistance n'apparaisse cliniquement ; et en cas de suspicion de tuberculose multi résistante, on utilisera préférentiellement un système de culture permettant la détection rapide de la croissance bactérienne et adapter un schéma thérapeutique approprié pour chaque cas.

Aussi à la relance de la culture en février 2008 le taux de contamination était élevé d'où l'intérêt de notre étude contribuant à améliorer la culture au LNR.

II. OBJECTIFS

1. Objectif général

- ❖ Evaluer les problèmes liés à la mise en œuvre de la culture au LNR.

2. Objectifs spécifiques

- ❖ Identifier la qualification des ressources humaines du LNR ;
- ❖ Faire l'état des lieux du laboratoire en consommable et en équipement (Matériels techniques et réactifs) ;
- ❖ Apprécier l'infrastructure du laboratoire ;
- ❖ Identifier les problèmes liés à la culture.

III. GÉNÉRALITÉS

1. Définition

Selon l'Union Internationale de Lutte Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires (U.I.C.T.M.R), «la tuberculose est une maladie infectieuse provoquée dans la plus part des cas par un bacille appelé *Mycobacterium tuberculosis* ». [12]

2. Agents pathogènes

2.1 Le bacille de la tuberculose

L'agent responsable de la tuberculose est une mycobactérie, appartenant à la famille des mycobacteriaceae, ordre des Actinomycétales, classe des Shizomycètes. Cette famille, renferme un seul genre : le genre *Mycobacterium*, comportant de nombreuses espèces. [26]

Trois espèces répondent à cette appellation : *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*.

Etymologiquement <<*Mycobacterium*>> signifie <<bâtonnet champignon>> car ces bactéries peuvent former des extensions filamenteuses présentant parfois des branchements courts. Ces formes filamenteuses ramifiées sont rares et une faible perturbation suffit à les fragmenter en forme bacillaires ou coccoïdes. [38]

2.2 Réservoir [18]

Mycobacterium tuberculosis est une bactérie stricte de l'homme, mais il est capable d'infecter certaines espèces animales proches de l'homme (chien et plus rarement chat, perroquet, animaux de ménagerie...). *M. tuberculosis* est l'agent principal de la

tuberculose humaine. On ne le trouve pas dans la nature en dehors des produits contaminés par l'homme infecté.

2.3 Caractères bactériologiques

2.3.1 Morphologie [31,15]

M. tuberculosis est un bacille fin, légèrement incurvé, de 2 à 5µm de longueur sur 0,2 à 0,3µm de largeur. Ses extrémités sont arrondies. Il est immobile, acapsulé, asporulé et se présente en petits amas ou sous forme isolée, aérobie intra et extracellulaire. Il est très sensible à certains agents physiques : chaleur, lumière solaire, rayons X ou UV. Il résiste bien au froid et à la dessiccation et peut demeurer vivant plusieurs jours dans des produits contaminés tels que des produits d'expectoration. Il est peu sensible à des nombreux agents tels que les acides et bases dilués, en revanche, il est tué rapidement par l'alcool dilué. IL n'est pas colorable par les colorants usuels, mais est coloré par la fuchsine phéniquée à chaud selon la méthode de Ziehl-Neelsen. Il retient le colorant malgré l'action combinée des acides dilués et de l'alcool (acido-alcoolorésistance) et apparaît alors comme un fin bâtonnet rouge. Coloré par l'auramine phéniquée, il devient fluorescent sous l'influence de la lumière UV.

2.3.2 Caractères cultureux [19]

Les mycobactéries se caractérisent par leur exigence de culture et leur lenteur de croissance. Strictement aérobie, toute diminution en apport d'oxygène entrave leur culture. Cette particularité joue *in vivo* un rôle décisif dans l'arrêt de la multiplication des bacilles au sein des lésions caséeuses.

La température optimale de croissance est de 35 à 37°C. Le pH optimum est de 6,8 à 7. L'aspect des colonies est rugueux.

M.tuberculosis ne pousse pas sur les milieux de cultures ordinaires. Seuls ceux qui contiennent du sérum, de la glycérine, de la pomme de terre glycélinée, de l'albumine bovine.

Parmi les nombreux milieux de culture qui ont été proposés, seul un nombre limité est couramment employé :

- milieux de Löwenstein-Jensen : milieu de référence pour la détermination de la nature eugonique ou dysgonique des colonies ;
- milieux de Dubos ;
- milieux Middlebrook 7H11, 7H10, 7H9.

Le temps de division de *M.tuberculosis* étant de 20 heures en moyenne, les cultures ne seront positives qu'après au moins trois semaines d'incubation à 37°C pour les milieux solides et une à deux semaines pour les milieux liquides.

2.3.3 Caractères biochimiques

Il est indispensable de considérer que le développement des colonies sur milieu de Löwenstein-Jensen n'est pas systématiquement synonyme de B.K. L'identification des mycobactéries repose alors sur une batterie d'épreuves biochimiques. [23]

- Présence de la catalase à 22°C et à 70°C ;
- Présence de la peroxydase ;
- Production d'acide nicotinique ;
- Réduction des nitrates ;
- Transformation du citrate de fer ammoniacal ;
- Présence de glucosidase ;
- Présence de l'uréase ;
- Présence de l'aryl-sulfatase ;
- Hydrolyse de tween 80.

Les plus couramment utilisés sont les suivants :

- La catalase qui décompose l'eau oxygénée en libérant de l'oxygène. Sa présence dans une souche donnée se traduit par un dégagement gazeux lorsqu'on met cette souche en présence d'eau oxygénée. Toutes les mycobactéries synthétisent de la catalase à 22°C sauf certaines souches izoniasido-résistantes de *Mycobacterium bovis* et *Mycobacterium tuberculosis*. Il existe

différentes souches distinguables les unes des autres par leur sensibilité thermique.

- Acide nicotinique : les souches de *Mycobacterium tuberculosis* produisent une importante quantité d'acide nicotinique dont la présence est révélée par le bromure de cyanogène à 10% et l'aniline.

- Réduction des nitrates : les BK présentent une nitrate réductase leur permettant de réduire les nitrates : (NO₃ ---→ NO₂)

2.4 Modes de transmission

La tuberculose se transmet à d'autres personnes le plus souvent à partir d'un malade souffrant de tuberculose pulmonaire. L'infection se fait par l'intermédiaire de gouttelettes infectées venant des poumons du malade. Ces gouttelettes sont produites lorsque le malade tousse ou éternue. Ces fines gouttelettes sèchent rapidement. Elles se fixent à de fines particules de poussières et les plus petites d'entre elles restent en suspension dans l'air pendant plusieurs heures. Seules les particules de moins de 10µm (micromètres) de diamètre peuvent atteindre les alvéoles du poumon, tandis que les plus grosses se déposent dans les voies aériennes supérieures d'où elles sont emportées par le courant mucociliaire pour être habituellement dégluties. [14]

D'autres modes de transmission du bacille tuberculeux sont à noter, à savoir : les conditions de vie précaire, la surpopulation des prisons, les mauvaises conditions à l'intérieur des institutions pénitentiaires etc. [6]

Enfin le contact manuel avec des objets contaminés ou l'introduction artificielle du bacille dans ou sous la peau, sont des cas de transmission très rares et sans importance épidémiologique.

En dehors de l'éventualité d'un contact étroit avec des cas index dont l'expectoration est à frottis positif, une proportion relativement faible de sujets en contact développe la maladie. Si

le bacille tuberculeux atteint un individu, il peut ne pas l'infecter : le nombre de micro-organismes viables reçus peut être insuffisant pour provoquer l'infection ; ils peuvent aussi ne pas pouvoir atteindre l'appareil respiratoire à une dose infectante suffisante. Même si le bacille arrive à infecter l'homme, il faut souligner cependant que l'infection n'entraîne une tuberculose active que pour environ 10% des individus qui ont acquis une infection primaire. [14]

2.5 Facteurs favorisant la contamination [43]

Tout sujet peut développer une tuberculose pulmonaire, mais certaines conditions majorent ce risque :

- Infection par le virus de l'immunodéficience humaine ;
- Précarité et promiscuité ;
- Migration des populations de pays à haute prévalence de la tuberculose ;
- Immunodépression autre que le virus de l'immunodéficience humaine (diabète, cancer, hémopathie maligne, immunodépression thérapeutique).

2.6 Répartition géographique de la tuberculose [33]

Bien qu'inégalement répartie dans le monde, la tuberculose reste l'une des plus grandes plaies de l'humanité. [40]

L'OMS estime qu'il y'avait, en 2002, 2 milliards de sujets infectés par le bacille tuberculeux, 8800000 nouveaux cas, 4000000 de cas de tuberculose pulmonaire à bacilloscopie positive et plus de 1800000 décès par an.

L'incidence estimée de la tuberculose contagieuse est de 63 pour 100000 habitants en moyenne mondiale, en Afrique subsaharienne, elle atteint 149 pour 100000 habitants, à Madagascar elle est de 77 pour 100000 habitants.

L'OMS estime que la tuberculose ne cesse de progresser dans le monde : l'incidence annuelle était de 8,8 millions en 2002, la prévision en 2005 était de 10 millions (dont 5 millions de tuberculose pulmonaire à frottis positif).

Les raisons de la persistance de la tuberculose dans le monde et en Afrique sont liées à :

- la pauvreté : 95% des tuberculeux vivent dans les pays pauvres ;
- l'accroissement démographique : plus de 6 milliards en 2000, 7,9 milliards prévus en 2025, et les migrations humaines ;
- l'épidémie de VIH/SIDA : la proportion de tuberculeux co-infectés par le VIH est en 2002 de 10% dans le monde, de 30% en Afrique subsaharienne.

Il y'a une grande inégalité des situations épidémiques dans le monde. On distingue :

- des pays à basse prévalence où l'objectif est l'élimination de la tuberculose, malgré un réveil épidémiologique actuel ;
- des pays à haute prévalence (regroupant la plupart des pays en voie de développement) où l'objectif est de maîtriser la maladie.

La tuberculose se propage par voie aérienne, la contamination étant interhumaine à partir des gouttelettes de sécrétions respiratoires aérosolisées. En l'absence de traitement, une personne atteinte de tuberculose évolutive peut en infecter en moyenne 10 à 15 autres en l'espace d'une année.

Au Mali, l'incidence de la tuberculose est estimée de 123 cas pour 100000 habitants. Pour une population de 10 millions d'habitants, 12000 nouveaux cas seront déclarés. [28,41]

Sur les 4000 cas de tuberculose dépistés en 1997 au Programme National de Lutte contre la Tuberculose, soit 30% des cas estimés, 2476 cas sont des formes pulmonaires à frottis positifs soit 61,83% ; 760 cas sont des tuberculoses pulmonaires à frottis négatifs soit 18,98% et 546 cas de tuberculose extra pulmonaire soit 13,63%.

En 2003 le Programme National de Lutte contre la Tuberculose du Mali estimait à 37.000 les nouveaux cas de tuberculose dans ce

pays par ans, soit 320 pour 100.000 habitants et 16500 les nouveaux cas de Tuberculose pulmonaire à frottis positifs, soit 142 pour 100.000 habitants. [12]

3. PHYSIOPATHOLOGIE [1,27]

Les affections tuberculeuses chez l'homme sont très variées et les lésions qu'elles déterminent sont très polymorphes. D'autant plus que les facteurs intervenant dans la détermination de ces lésions sont nombreux :

- Le nombre de bacilles infectants et leur vitesse de croissance au niveau des différentes localisations ;
- La résistance de l'hôte et les phénomènes d'hypersensibilités au cours de l'infection.

Cependant, la localisation pulmonaire est de loin la plus fréquente, étant entendu qu'elle est la plus contagieuse. Elle est aussi la plus grave par son caractère invalidant et son impact sur la vie socio-économique.

Elle évolue en plusieurs étapes aussitôt après l'arrivée des bacilles tuberculeux dans les alvéoles pulmonaires par la voie aérienne, deux éventualités peuvent se présenter :

- Si le sujet est immunologiquement compétent, les bacilles sont captés par les macrophages tissulaires et sanguins. Il se développe une réaction fibreuse impliquant les lymphocytes et les cellules épithélioïdes aboutissant à la formation d'une gangue calcifiée autour des bacilles qui sont du coup privés d'oxygène. Si cette gangue persiste, la multiplication des bacilles peut s'arrêter là et elle peut évoluer vers une résorption totale ou une sclérose. Les symptômes disparaissent peu à peu et l'individu peut guérir sans faire une tuberculose maladie.

Seulement, la radiographie montre des traces au niveau des poumons et l'IDR reste positive : c'est le cas heureux.

- Si le sujet est soumis à des conditions défavorables ; affaiblissement de l'organisme pour plusieurs raisons qui produit une décalcification de la gangue suivie de la libération des

bacilles ; le sujet peut subir une ré-infestation et la maladie évolue vers le second stade. On observe alors deux types de lésion :

- Un type exsudatif : caractérisé par une réaction inflammatoire aigue avec infiltration liquidienne suivie d'œdème pulmonaire avec présence de macrophages, de polynucléaires et plus tard, de monocytes autour des bacilles tuberculeux, si la multiplication s'arrête là, il y'a évolution vers la résorption.

- Un type productif : caractérisé par une lésion granulomateuse chronique, constituée par trois zones : une zone centrale avec de nombreuses cellules géantes contenant des bacilles tuberculeux, une zone médiane constituée par des cellules épithélioïdes et une zone périphérique formée par des fibroblastes, des lymphocytes et des monocytes.

Quand la zone centrale se nécrose, il se produit une homogénéisation solide qui aboutit à la formation du caséum, processus fondamental de la tuberculose.

Au bout de la caséification, on observe un grand nombre de bacilles dans la lésion par rapport à sa fin où le nombre diminue progressivement. Cette lésion caséuse solide peut évoluer vers une liquéfaction qui s'accompagne d'une véritable flambée bacillaire suivie d'une collection dans une cavité délimitée par une coque scléreuse qui la sépare du parenchyme pulmonaire.

Cette cavité peut s'ouvrir dans une bronchiole et s'accompagner d'une élimination des parties ramollies, c'est la caverne pulmonaire qui explique la chronicité de la tuberculose, sa marche envahissante et sa contagiosité surtout dans les familles où il y'a promiscuité.

En effet, cette caverne ne guérit pas spontanément et il se produit une multiplication bacillaire intense dans le revêtement nécrotique de sa coque et les bacilles se répandent par les bronches. On assiste à une forme disséminée dans le tissu pulmonaire. Il peut y avoir des complications graves telles que :

pulmonaire, hémorragie capillaire ou artérielle diffuse, atélectasie et cardiaque.

3.1 Caractères antigéniques : [11,16]

Les mycobactéries ont une forte teneur en liquide 20 à 45%. Ceux-ci représentent environ 60% des constituants de la paroi.

L'étude de la structure de la paroi du bacille tuberculeux permet de comprendre comment l'agent responsable de la tuberculose bouleverse, contourne ou neutralise les mécanismes cellulaires antimicrobiens.

Les mycobactéries en général et *Mycobacterium tuberculosis* en particulier, comme les bactéries Gram positif ont une couche épaisse de peptidoglycane et pas de membrane externe. Mais elles ont à l'intérieur du peptidoglycane une structure lipopolysaccharidique semblables à celle qui existe chez les bactéries à Gram négatif, mais en plus épais et en plus dense.

Cette structure, composée d'arabino-galactane et d'acides mycoliques, d'acides gras de poids moléculaire très élevé, forme une barrière particulièrement hydrophobe autour du corps microbien.

En l'absence de membrane externe et de porine, les acides mycoliques empêchent les colorants habituels des bactéries de pénétrer à l'intérieur des mycobactéries.

On conçoit facilement que la difficulté de passage à travers la paroi des mycobactéries n'est pas limitée aux colorants. Elle s'étend à de nombreuses autres molécules et notamment aux antibiotiques actifs sur les autres espèces bactériennes. Cette résistance naturelle, qui constitue l'un des grands problèmes chez le clinicien est due à un défaut de passage à travers la paroi et pas à une insensibilité de la cible d'action. La découverte des antibiotiques comme la streptomycine, l'isoniazide, le pyrazinamide, la rifampicine,... auraient permis de surmonter la résistance naturelle de *Mycobacterium tuberculosis*.

3.2 Caractères immunologiques

Les mycobactéries tuberculeuses et plus particulièrement *Mycobacterium tuberculosis* induit chez l'homme infecté une allergie et une immunité spécifique dont le support expérimental décrit par Robert Koch en 1891 est connu sous le nom de phénomène de Koch. [37]

Phénomène de Koch [4]

- L'inoculation de bacilles tuberculeux virulents, à un cobaye sain ne provoque aucune lésion apparente jusqu'au 10^{ème} ou 14^{ème} jour. Un nodule va apparaître par la suite au point d'inoculation puis s'ulcérer et l'ulcération va persister jusqu'à la mort de l'animal ;
- L'inoculation faite chez un cobaye déjà tuberculeux a une évolution différente. Très rapidement en 24 à 48 heures, la peau rougit et se nécrose. La lésion inflammatoire et nécrotique atteint un maximum en 72 heures, puis s'élimine et guérit spontanément sans que l'évolution de la maladie sous-jacente soit affectée ;
- La réaction inflammatoire précoce avec nécrose est le fait de l'hypersensibilité, mais la réaction d'hypersensibilité nécessite quand même 24 à 72 heures pour se produire, il s'agit donc du type même de l'hypersensibilité retardée. On l'appelle allergie tuberculinique ou hypersensibilité tuberculinique ; le caractère transitoire de la réaction prouve qu'il y'a une immunité, celle-ci ne se manifeste qu'à l'égard des bacilles de ré-inoculation. L'immunité est dite de surinfection. Chez le cobaye, l'hypersensibilité s'installe d'autant plus vite et est d'autant plus forte que les bacilles inoculés sont plus virulents et en nombre élevé.

➤ **Adjuvant de Freud**

Freud a montré en 1937 qu'en injectant un mélange de substance protéique (inducteur d'une hypersensibilité de nature humorale immédiate) et d'une suspension de bacilles tuberculeux tués, enrobés dans une huile minérale (adjuvant de Freud), on provoque l'apparition d'hypersensibilité vers le type retardé. [16]

- des travaux avaient d'abord établi la responsabilité des cires D dans le caractère retardé de l'hypersensibilité. Plus, grâce aux travaux de Lederer et Chedid (1974), on sait que l'unité active du peptidoglycane (contenu, des cires D) est N-acétyl-muramyl-1-analyl-D-isoglytamine ou muramyl-dipeptide (MDP) qui peut être synthétisé actuellement.

- Le test de la tuberculine pour rechercher l'hypersensibilité tuberculinique chez l'homme,

- La seule méthode recommandée par l'OMS est l'intradermo-réaction de Mantoux ; elle seule assure la pénétration dans le derme d'une quantité constante de tuberculine purifiée par voie intradermique et à mesurer 72 heures plus tard le diamètre de l'induration réactionnelle.

Tuberculine : filtrat concentré à chaud de bouillon dans lequel les bacilles tuberculeux ont été cultivés pendant six semaines

La vaccination : Le bacille de Calmette et Guérin est le vaccin le plus ancien dans l'histoire de la tuberculose. Il est administré le plus tôt possible dans la vie, de préférence à la naissance. S'il ne protège pas totalement contre la maladie sous toutes ses formes, il permet d'éviter les formes les plus graves surtout chez les enfants à l'âge de la scolarisation. Il est injecté par voie intradermique (habituellement dans la partie supérieure du bras gauche) à la dose de 0,05ml pour les enfants de 0 à 1 an et à 0,1ml pour ceux qui ont plus d'un an.

Chez l'homme, l'immunité n'empêche pas l'apparition de la maladie tuberculeuse chez certains sujets infectés.

Le bacille de Calmette et Guérin est à l'heure actuelle le vaccin le plus immunisant et en même temps le moins pathogène dont on dispose pour créer l'état de surinfection [16].

4. DIAGNOSTIC

4.1 Diagnostic clinique [12]

4.1.1 Forme typique

La forme typique de la tuberculose est la forme pulmonaire.

La forme pulmonaire comprend :

- la primo-infection tuberculeuse ;
- la tuberculose pulmonaire commune.

4.1.1.1 Primo-infection tuberculeuse

La primo-infection, encore appelée tuberculose primaire est l'ensemble des manifestations anatomiques et radio immunologiques accompagnant la pénétration du bacille de Koch dans l'organisme jusque là indemne. On distingue trois formes :

- Primo-infection latente

Vue dans 90 % des cas elle est asymptomatique et caractérisée habituellement par le virage des tests tuberculiniques.

- Primo-infection frustrée

Elle est caractérisée par des manifestations cliniques discrètes à savoir une légère altération de l'état général, une fébricule, une asthénie, un amaigrissement et une IDR positive.

- Primo-infection patente

Elle est caractérisée par :

- la thypho bacillose de Landouzy qui est faite de fièvre progressive en plateau située entre 39-40°C, de sueurs abondantes, de tachycardies, de splénomégalie et d'un sérodiagnostic de Widal négatif et d'une IDR positive.

- les manifestations cutanées marquées par l'érythème noueux, principale pathologie dominant le tableau clinique chez l'enfant.

- les manifestations oculaires marquées par la kératonjonctivite phlycténulaire.

4.1.1.2 Tuberculose pulmonaire commune

Elle est la plus fréquente et représente 80 % des formes cliniques. Elle est le résultat soit d'une surinfection exogène à partir d'un sujet contagieux (tuberculose primaire), soit d'une réinfection endogène à partir des bacilles persistants après une infection tuberculeuse pulmonaire insuffisante ou non traitée, ayant laissé en place des bacilles.

4.1.2 Les formes cliniques de la tuberculose

On distingue :

➤ **La tuberculose pulmonaire** : attaque le poumon dans 80% des cas. A frottis positifs chez l'adulte, elle est hautement contagieuse. Les cas dont les crachats sont positifs à la culture seulement sont 7 à 10 fois moins contagieux que ceux qui sont positifs à l'examen microscopique [38].

➤ **La tuberculose extra pulmonaire** :

Elle se définit classiquement par l'atteinte d'un organe qui n'est pas le poumon. Elle peut survenir en la présence ou l'absence d'une atteinte pulmonaire patente. L'évolution d'une tuberculose extra pulmonaire peut être aiguë ou foudroyante ou au contraire être chronique et lentement évolutive sur plusieurs années. N'importe quel viscère peut être concerné. [24] Elle atteint des organes aussi divers que les ganglions lymphatiques, les os et les articulations, le tractus génito-urinaire, le système nerveux (méningite).

La plus grande affinité pour les poumons semble être expliquée par deux phénomènes :

- 1) Les bacilles tuberculeux sont aérobies stricts, alors que les poumons sont les organes les plus aérés de l'organisme.
- 2) Le mode de transmission qui est essentiellement aérien.

4.2 Diagnostic para clinique

4.2.1 L'imagerie

La radiographie du thorax intervient dans le diagnostic de la tuberculose. Elle montre des nodules regroupés ou des cavernes dans un segment ou tout un lobe pulmonaire.

4.2.2 Le diagnostic bactériologique [34]

Le diagnostic bactériologique de la tuberculose peut se faire par plusieurs façons : examen direct de frottis des crachats, culture, PCR...Mais c'est la première procédure qui est plus pratiquée. Quelle que soit la procédure, la qualité de l'examen est tributaire de celle du prélèvement bactériologique.

➤ Recueil des crachats [34]

Le recueil se fait au laboratoire ou dans les services cliniques. On utilise pour cela des crachoirs qui ont une large ouverture, fermant hermétiquement avec un couvercle vissé afin d'éviter la dessiccation et les risques de contamination du personnel par fuite du contenu.

Trois échantillons de crachats doivent être demandés pour chaque personne suspecte de tuberculose pulmonaire :

Un échantillon est recueilli sur place le jour de la consultation, un deuxième échantillon est recueilli le matin au réveil, un troisième échantillon est recueilli sur place au moment où le crachat matinal est apporté par le malade au laboratoire. Il y'a en effet plus de chance de trouver des bacilles dans trois échantillons de crachats différents que dans un seul ou dans deux échantillons.

Tout malade pour lequel la recherche de BAAR a été effectuée doit être enregistré dans le registre du laboratoire avec un numéro de laboratoire, la date, le nom, le prénom, le sexe, l'âge, la provenance, l'adresse complète, l'indication si le malade est nouveau ou ancien, le résultat en nombre de croix pour chacun des trois échantillons et des commentaires s'il y'a lieu.

Le numéro du laboratoire sera porté sur le bulletin de réponse pour permettre un suivi correct du malade.

Le risque de contamination étant très élevé, lorsque le malade tousse, les crachats doivent être recueillis en plein air, et le plus loin possible d'autres personnes. Si le recueil n'est pas possible à l'extérieur, il vaut mieux utiliser une pièce isolée, aérée, et ensoleillée.

Le technicien doit :

1 - mettre le malade en confiance en lui expliquant le motif de l'examen et en lui montrant comment tousser afin que l'expectoration vienne du plus profond possible du thorax. Au besoin il devra lui donner l'exemple.

2 - remettre le crachoir au malade en lui expliquant comment l'ouvrir et le fermer hermétiquement.

3 - contrôler la qualité et la quantité de crachats émis : pour le dépistage il faut obtenir un volume suffisant (3-5ml) de crachats contenant des particules solides ou purulentes et pas seulement de la salive. Si l'expectoration recueillie est insuffisante ou uniquement salivaire, il faut encourager le malade à tousser à nouveau jusqu'à l'obtention d'un résultat satisfaisant.

4 - Au cours de la surveillance du traitement, on doit s'appliquer à recueillir au moins 2ml du produit d'expectoration, même claire ou salivaire. Si le malade n'arrive pas à cracher, il faut considérer le crachoir comme ayant servi et par conséquent l'éliminer et le détruire.

5 - Fermer le crachoir de façon étanche et le mettre dans la boîte réservée au transport s'il doit être envoyé au laboratoire.

6 - porter sur la paroi du crachoir et non sur son couvercle le nom du malade et la date.

7 - Se laver les mains à l'eau et au savon.

8 - Donner au malade un crachoir neuf en lui expliquant de recueillir le crachat le matin au réveil comme il convient de le faire et de le porter au laboratoire le plus tôt possible.

➤ **Transport et conservation des échantillons de crachats [7]**

Le transport des produits pathologiques (crachats, pus ...) doit s'effectuer sans danger pour ceux qui sont amenés à les manipuler. Les produits pathologiques doivent être dans un récipient fermé hermétiquement (flacons bouchés à vis) entouré d'une capsule et le tout dans un étui en bois de manière à éviter tout écoulement du produit, même en cas de bris du premier récipient.

Les moyens dont on dispose actuellement pour s'opposer à la pullulation des germes saprophytes, donc à la diminution de la vitalité du bacille tuberculeux sont les suivants par ordre d'intérêt décroissant :

- la réduction maximale du temps de transport ;
- l'action du froid : les produits pathologiques étant placés dans des boîtes isothermes contenant de la glace ;
- l'adjonction de produits chimiques comme le phosphate trisodique ou le bromure de cétyl pyridinium permet de réduire la pullulation des germes saprophytes. Ces produits détruisent lentement les germes saprophytes en respectant le bacille tuberculeux ;
- après plusieurs jours de contact, le crachat peut être cultivé après centrifugation sans autre décontamination ;
- l'utilisation d'antibiotiques ordinaires comme la pénicilline, les tétracyclines et autres ne s'est pas révélée intéressante car à dose élevée, ils diminuent considérablement la vitalité du bacille tuberculeux sans empêcher la multiplication des germes saprophytes qui sont généralement résistant aux antibiotiques utilisés.

Il n'est pas toujours facile d'examiner sur place et dans un court délai les expectorations, ou les autres produits pathologiques. On est donc amené à les conserver pendant un temps plus ou moins prolongé et parfois à les transporter sur d'assez longues distances.

A la température ambiante, il se produit une pullulation de la flore associée, toujours nombreuse dans les crachats. Cette pullulation qui entraîne en quelques jours, la liquéfaction complète du produit pathologique (crachats, pus, etc.) a un double inconvénient.

D'une part, elle gêne la mise en évidence microscopique du bacille, qui ne peut plus être recherché sur le culot de centrifugation du produit liquéfié. Cet inconvénient est mineur, car cette homogénéisation spontanée ne diminue pas la colorabilité du bacille tuberculeux.

D'autre part, la pullulation de la flore associée à une influence très défavorable sur la culture du bacille tuberculeux, entraînant des variations de pH et surtout la libération d'enzymes bactériens, elle affecte considérablement la vitalité du bacille. A ce premier effet néfaste, s'ajoute celui que va exercer la décontamination puissante qu'il faudra effectuer avant la mise en culture.

Pour ces multiples raisons, tout produit qui ne peut être examiné dès émission doit être gardé au froid à 4°C, notamment dans un réfrigérateur. Cela permet une conservation relativement satisfaisante pendant plusieurs jours.

En résumé, le froid est le meilleur agent de conservation. Cependant dans la mesure du possible, l'examen immédiat est préférable. D'autre part, les produits du tubage gastrique toujours acides (par Hcl stomacal) doivent être neutralisés avec de la soude ou du bicarbonate de soude en présence de quelques gouttes d'indicateur de pH. Il faut enfin des mesures de protection du personnel travaillant.

La conservation est une opération bactériologique très décisive dans le diagnostic des infections à mycobactéries.

➤ **Préparation des frottis [34]**

Une fois les crachats recueillis, les crachoirs doivent être rangés sur la paillasse en vue de la confection des frottis.

Après s'être lavé les mains, le technicien prend la boîte de lames neuves et à l'aide d'un marqueur (crayon ou graveur en diamant), il porte sur le tiers de la lame le numéro d'identification du malade.

1/3

2/3

001/1/98	Frottis	
----------	---------	--

Figure 1 : Schémas d'une lame de frottis

Pendant cette opération, le technicien évitera de mettre ses empreintes digitales sur la partie réservée à l'étalement.

On a le maximum de chance de trouver des bacilles en les recherchant dans les particules solides de l'examen. La phase d'ouverture des crachats et l'étalement des crachats est celle qui comporte le plus de risque de contamination aussi devra-t-elle être exécutée avec la plus grande minutie.

1 - Placer la lame sur la paillasse à côté de la flamme d'un bec bunsen numéro du malade haut.

2 - Porter un gant pour prendre le crachoir correspondant au numéro de la lame. Vérifier que l'identification inscrite sur la lame correspond bien à celle du crachoir. Ouvrir le crachoir et à l'aide d'une anse métallique préalablement chauffée au rouge puis

refroidie prélever une parcelle purulente ou hémorragique du crachat.

3 - Réaliser un étalement fin sur les 2/3 de la lame à environ 0,5 cm des bords pour éviter les contaminations.

4 - Stériliser l'anse de platine en la portant au rouge à la flamme du bec bunsen ou d'une lampe à alcool.

Les frottis préparés doivent être laissés à la température du laboratoire à l'abri des mouches pendant 15 à 20 mn pour séchage. Ne pas utiliser la flamme pour le séchage des frottis.

Avec une pince, prendre la lame par sa partie gravée, frottis tourné vers le haut, la passer 3 fois à travers la flamme du bec bunsen ou de la lampe à alcool, ceci doit prendre 3 à 5 secondes et ensuite la placer sur un porte lames pour coloration.

Les crachoirs en plastique ayant servi au recueil des crachats doivent être incinérés, les porte-lames et la surface de travail doivent être stérilisés par la flamme.

4.2.2.1 Examen microscopique

La mise en évidence des bacilles acido-alcool-résistants à l'examen microscopique du frottis fait à partir du produit pathologique est le moyen le plus rapide et le moins coûteux de faire le diagnostic de présomption de la tuberculose. La recherche microscopique des mycobactéries s'effectue après coloration. Diverses méthodes de colorations sont proposées.

➤ Méthode de coloration de Ziehl-Neelsen [34]

La technique de coloration utilisée dans le cadre du programme National est la coloration à chaud (Kinyoun modifiée)

Les colorants utilisés sont :

Réactifs :

- Fuchsine phéniquée de Kinyoun :

Dissoudre 4g de fuchsine dans 20ml d'éthanol à 90-95% et additionner 100ml d'une solution aqueuse de phénol à 8%.

- Mélange acide-alcool :

Additionner lentement 3ml d'acide chlorhydrique dans 97ml d'éthanol à 90-95%.

- Contre colorant au bleu de méthylène :

Dissoudre 0,3g de bleu de méthylène dans 100ml d'eau distillée.

Technique de coloration :

N. B. La coloration, le rinçage, la décoloration et la contre coloration, en série dans les bacs, doivent être évités en raison du risque très réel de contamination d'une lame à l'autre.

Procéder de la façon suivante :

- Placer les lames sur un porte-lame, frottis tourné vers le haut ;

- Couvrir le frottis de fuchsine phéniquée de Ziehl ;

- Laisser agir pendant 5mn pour chauffer ;

- Rincer la lame à l'aide d'un filet d'eau du robinet ou d'une pissette ;

- Couvrir le frottis avec le mélange acide-alcool et laisser agir pendant 3mn,

- Rincer la lame à l'aide d'un filet d'eau du robinet ou d'une pissette ;

- Couvrir le frottis avec le bleu de méthylène et laisser agir pendant 3mn ;

- Rincer et laisser sécher la lame.

➤ **Méthode de coloration fluorescente [20]**

La méthode de coloration fluorescente est basée sur le même principe que la méthode classique à la fuchsine basique. C'est une coloration de la totalité de la préparation suivie d'une décoloration sélective par l'alcool acide puis d'une recoloration du fond.

Il y'a plusieurs variantes :

- méthode Degommier

- méthode de Smithwk modifiée

Principe : il consiste à colorer les bacilles avec des substances organiques excitables par une lumière de longueur d'onde déterminée et qui après excitation donne une lumière de longueur d'onde plus élevée. Les colorants les plus courants sont excités par la lumière rouge ou verte.

Exemple : Fluorescéine ; Rhodamine, Orangé d'acridien, Auramine et Rouge thiazine.

Après la coloration de Ziehl, les frottis sur lames sont examinés au microscope avec l'objectif 100 en immersion dans une goutte d'huile.

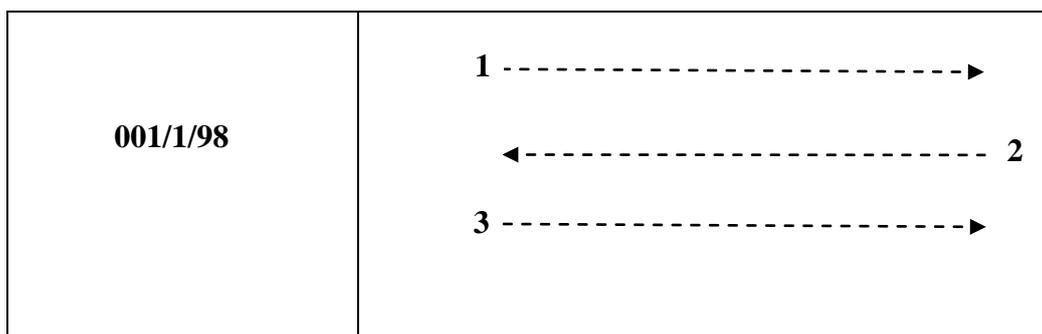


figure 2 : Schémas de la procédure de lecture.

La lame est lue selon la figure ci-dessus.

La lecture doit être systématique en commençant par le premier champ à l'extrémité du frottis en observant champ par champ jusqu'à l'extrémité.

Si le frottis occupe les 2/3 de la lame, une longueur compte environ 100 champs microscopiques. Si l'on n'observe pas de BAAR dans une longueur, on doit examiner une deuxième longueur puis une troisième (dans le sens 1, 2 et 3 sur la figure). Ainsi sur trois longueurs on observe 300 champs, ce qui demande environ 10 à 15 mn d'observations.

Les BAAR apparaissent sous la forme de bâtonnets fins rouges de 2 à 3 microns de long sur 0,2 à 0,5 microns de diamètre.

Notation des résultats :

IL faut donner une réponse quantitative qui permet d'apprécier le degré de contagiosité du malade, directement en rapport avec le nombre de bacilles contenus dans l'expectoration. Ce comptage permet aussi d'apprécier l'effet du traitement si la réduction du nombre de BAAR est nette entre deux examens.

TABLEAU I : METHODE STANDARD DE NOTATION DE RESULTAS (OMS)

Nombre de BAAR observés	Champs examinés en immersion	Réponse à rendre
Zéro (0) BAAR	300 champs	NEGATIF
1 à 9 BAAR	100 champs	Faiblement positif (indiquer le nombre)
10 à 99 BAAR	100 champs	1+
1 à 10 BAAR	par champ	2+
Plus de 10 BAAR	par champ	3+

4.2.2.2 CULTURE [8,26,37,39,40]

➤ **Historique**

Nous avons signalé comment, en 1882, Koch obtint la culture sur sérum de boeuf coagulé. Mais, sur ce milieu, elle est si mauvaise que Robert Koch avait douté que la culture ne puisse jamais apporter une notion importante dans l'étude de la maladie. En 1887, Nocard et Roux montrèrent l'intérêt de l'adjonction de glycérine à 5 %. En 1888, Pawlowsky recommanda l'emploi de la

pomme de terre, qui, une fois glycérimée, représente un milieu très favorable. En 1899, Bezançon et Griffon mirent au point la gélose glycérimée au sang de lapin. Puis en 1903, en même temps d'ailleurs que Dorset et Lubenau, la gélose glycérimée au jaune d'œuf.

Quel que soit le milieu, la présence de germes d'infection secondaire rend difficile la culture. Les bactériologistes s'ingénierent donc, soit à les supprimer, soit à empêcher leur pullulation sans gêner le bacille de Koch. Pour stériliser le produit pathologique, Spengler (1900) proposa les vapeurs de formol ; Uhlenhut (1909) l'adjonction d'antiformine (eau de Javel et soude)- Petroff comme Bezançon et Philibert, la lessive de soude, qui assure de plus l'homogénéisation du produit et permet la centrifugation. Enfin, en 1924, Löwenstein conseilla le traitement par l'acide sulfurique et la soude. Pour inhiber la pullulation des germes secondaires qui persistent, on eut recours à l'incorporation au milieu de produits qui ne gênent pas la multiplication du bacille de Koch : violet de gentiane (Petroff), vert malachite (Löwenstein)- la pénicilline peut rendre le même service, et aussi le teepol (Tison).

Elle n'est pas pratiquée en routine pour la prise en charge de la tuberculose sur le plan de la santé publique. Elle intervient généralement en cas de résistance au traitement et permet de faire un antibiogramme.

La première culture du bacille tuberculeux a été obtenue par Robert Koch en 1882 sur le sérum de bœuf coagulé.

Nocard et Roux ont obtenu une croissance satisfaisante du bacille en 1887 par l'adjonction de glycérine en proportion convenable (5 à 8%). Depuis lors, de nombreux milieux de culture ont été élaborés. On en distingue trois groupes :

- Les milieux liquides [Dubos, Sulla] ;
- Les milieux solides [Löwenstein-Jensen, Colestos-base] ;
- le milieu gélosé [Middlebrook].

En effet, obtenir en culture pure le germe responsable est certainement le moyen le plus rigoureux de faire le diagnostic de certitude de la tuberculose, c'est aussi un moyen très sensible, puisque à priori tout bacille viable va donner naissance à une colonie. Mais la culture est d'exécution relativement laborieuse et dont les résultats ne sont disponibles qu'après un délai de 3 à 4 semaines voire plus. L'isolement du bacille tuberculeux dans les produits de l'expectoration nécessite :

- La décontamination préalable de l'expectoration ;
- L'ensemencement sur un milieu de culture enrichi.

➤ **Aspect des colonies :**

Les mycobactéries cultivables donnent sur les milieux de culture des colonies dont l'aspect est caractéristique et variable d'un milieu à l'autre. Cependant, les milieux solides sont les mieux indiqués à cet effet. Sur milieu de Löwenstein-Jensen par exemple :

- *Mycobacterium tuberculosis* : donne des colonies eugoniques rugueuses, sèches de teinte crème beige de 1 à 4 millimètres de diamètre. Les colonies âgées peuvent prendre l'aspect de chou-fleur. Il existe de rares colonies dysgoniques.
- *Mycobacterium africanum* : donne des colonies dysgoniques rugueuses, poussant lentement sur Löwenstein-Jensen. Sa croissance peut être stimulée par addition de pyruvate de sodium. Les colonies sont plates mates avec un mamelon central sur les vieilles cultures.
- *Mycobacterium bovis* : donne des colonies lisses dysgoniques non pigmentées, blanchâtres.
- Bacille de Calmette et Guérin : donne des colonies similaires à celles de *Mycobacterium bovis*. Mais, ces colonies sont rugueuses eugoniques ; pigmentées en crème beige et apparaissent en 10 à 30 jours comme *Mycobacterium tuberculosis*.
- Les mycobactéries atypiques, donnent des colonies variant selon les espèces.

5. EVALUATION ET PREVENTION DES RISQUES

BIOLOGIQUES EN LABORATOIRE DE RECHERCHE [5]

Le risque biologique en laboratoire a été, pendant de nombreuses décennies essentiellement associé au domaine de la bactériologie et des prélèvements de substances d'origine biologique humaine (sang, liquide céphalorachidien, crachat, etc...) lié à la présence connue ou non connue de microorganismes pathogènes.

Cependant, l'essor de la biologie cellulaire et moléculaire, l'interpénétration des disciplines scientifiques ont sérieusement agrandi le domaine des risques biologiques durant ces trois dernières décennies.

5.1 La contamination

Elle résulte d'une défaillance ou d'une absence de protection appropriée lors de la réception du matériel biologique contaminant, de son utilisation au laboratoire, de la manipulation directe ou indirecte d'objets souillés à son contact.

Le pouvoir contaminant d'un agent infectieux dépend de son degré de pathogénicité, de sa virulence, de sa stabilité biologique naturelle dans l'environnement et de son mode de transmission.

Il est bien évident que l'état immunitaire de l'expérimentateur module sa susceptibilité à une infection éventuelle.

5.1.1 Les voies et modes de contamination

Les voies de contamination peuvent être respiratoires, digestive, cutanée ou oculaire.

5.1.1.1 La voie pulmonaire

C'est la porte d'entrée des poussières, vapeurs, fumées et particulièrement des aérosols. En effet, la plupart des travaux de laboratoire produisent des aérosols : pipetage, centrifugation, broyage, sonication, agitation, ouverture d'ampoule de lyophilisats, manipulation de milieux liquides, ouverture de récipients contenant des cultures microbiennes ou cellulaires, ensemencements de boîtes de gélose, changement de litières d'animaux de laboratoire etc.

L'aérosol se propage à distance et peut atteindre plusieurs personnes avec une contamination maximale sur le plan de travail et sur les mains du manipulateur. L'impact infectieux de l'aérosol produit dépend de sa vitesse de retombée, variable avec la taille, la lourdeur des particules et sa force d'émission. Il dépend également de la concentration de l'agent infectieux, de sa viabilité dans l'environnement et de son degré de rétention dans les poumons.

5.1.1.2 La voie digestive

Ce mode de contamination, bien que le pipetage à la bouche soit strictement interdit dans les laboratoires, reste encore trop fréquent car elle peut intervenir par la cigarette, l'alimentation au laboratoire, l'onychophagie, le défaut d'hygiène (absence de gants, port de blouses souillées hors du laboratoire, et notamment dans les « pièces cafétéria »).

5.1.1.3 La voie cutanée et transcutanée

La pénétration par cette voie peut être importante. Elle intervient lorsque le tissu cutané est atteint ou abîmé. Les situations les plus classiques au laboratoire sont :

- .Piqûre d'aiguille de seringues lors d'injections mais aussi d'évacuation d'aiguilles et seringues dans des sacs inadaptés.
- .Coupures ou égratignures par de la verrerie cassée contaminée ou par des instruments chirurgicaux lors d'autopsie d'animaux.
- .Morsure ou griffure par des animaux
- .Certains solvants comme le DMSO, DMF, vasodilatateurs facilitent la perméation du revêtement transcutané.
- .Enfin, la contamination peut intervenir indirectement par contact d'un « nonexpérimentateur » avec des objets souillés par l'expérimentateur : téléphone, robinetterie, stylo, serviettes etc.

5.1.1.4 La voie conjonctivale

La forte vascularisation de la conjonctive en fait une porte d'entrée importante des agents infectieux lors de projection ou de contact avec des oculaires contaminés de microscopes ou d'appareils d'optiques.

5.2 LES RISQUES LIÉS AUX MICRO-ORGANISMES NATURELS OU SAUVAGES (bactéries, virus, champignons, parasites) [5]

Toute activité de recherche impliquant la manipulation d'un agent biologique pathogène pour l'homme ou d'un échantillon biologique susceptible d'être contaminé par ce pathogène doit donner lieu à l'évaluation du risque de contamination encouru par l'expérimentateur, ses collègues ainsi que le personnel chargé de l'entretien du laboratoire.

Cette évaluation tient compte essentiellement :

- des caractéristiques propres au micro-organisme manipulé et à sa classification.
- de l'établissement d'un protocole intégrant la sécurité de la manipulation.

5.2.1 Caractéristiques du germe et classification

• **Pathogénicité** du micro-organisme en tout premier lieu (possibilité de transmettre une pathologie chez l'homme possédant un système immunitaire en ordre de fonctionnement, c'est-à-dire, capable de bonnes réponses humorales et cellulaires) et sa **virulence** : C'est cette notion qui fait intervenir le nombre d'unité infectante, c'est-à-dire le nombre de germes nécessaire et suffisant pour créer une infection chez un organisme immunocompétent. Plus le nombre est faible, plus la virulence est grande. À titre d'exemple :

• Les arbovirus, responsables d'encéphalites foudroyantes, infectent à l'unité, c'est-à-dire qu'un seul virus suffit à créer la pathologie.

• La tularémie, due au bacille Francisella tularensis, nécessite 10 unités infectantes pour faire apparaître une pathologie clinique.

• Les salmonelloses mineures nécessitent, quand à elles, 10⁵ unités de Samonella typhi pour créer une infection.

• **Taille et mode de transmission** : comme on l'a vu plus haut, il existe quatre grandes voies de contamination : aérien, cutané, digestif oculaire. La taille du microorganisme est souvent corrélée avec le mode de transmission.

Le fait de connaître le mode de transmission permet de mettre en oeuvre une protection collective et/ou individuelle.

• **Stabilité biologique naturelle du micro-organisme** dans l'environnement (chaleur, froid, dessiccation). A titre d'exemple, le virus de l'hépatite B résiste plusieurs semaines à température ambiante et résiste à la chaleur.

• **Résistance aux moyens de désinfection**

- Physiques : Rayons UV, X, Chaleur sèche ou humide

- Chimiques : Eau de javel et dérivés chlorés, alcools, aldéhydes, ammoniums quaternaires etc.

Les procédés de désinfection doivent avoir été validés. La concentration du produit utilisé ainsi que son temps d'action nécessaire doivent être clairement précisés.

- **Traitement** préventif par vaccination (BCG, rage, tétanos, hépatite B, poliomyélite etc.) ou curatif efficace.

L'ensemble de ces caractéristiques a permis d'établir une classification qui prend en compte le risque pour le manipulateur mais aussi le risque de propagation dans l'environnement.

Ces « niveaux de risque » ainsi définis conditionnent les mesures de prévention, à la fois collective et individuelles, à mettre en oeuvre lors de la manipulation de matériel biologique possiblement contaminé par l'agent infectieux. Ces mesures doivent être prise depuis la conception même des locaux où l'échantillon est manipulé, jusqu'à l'organisation des déchets biologiques en passant, bien entendu, par de bonnes pratiques de laboratoire.

TABLEAU II : DEFINITION DES GROUPES DE RISQUES DES AGENTS BIOLOGIQUES PATHOGENES [5]

Groupe	Risque infectieux	Risque de propagation dans la collectivité	Prophylaxie ou traitement efficace
1	Ne provoquent pas de Pathologies	Sans objet	Sans objet
2	Peuvent provoquer une Maladie	Peu probable	Oui (en général)
3	Peuvent provoquer une maladie grave	Possible	Généralement possible
4	provoquent une maladie grave (mortelle)	Élevé	Inconnu à ce jour

5.3 CLASSIFICATION DES NIVEAUX DE SECURITE

Les groupes de risques ont conduit à définir des niveaux de confinement correspondant à chacun de ces groupes. En règle générale, la correspondance est directe.

Groupe 1	Laboratoire	L1 Animalerie
A1 Serre S1		
Groupe 2	Laboratoire	L2 Animalerie
A2 Serre S2		
Groupe 3	Laboratoire	L3 Animalerie
A3 Serre S3		
Groupe 4	Laboratoire	L4 Animalerie
A4 Serre S4		

Dans la pratique, la détermination des niveaux de confinement doit être faite plus précisément par le chef d'unité lors de l'élaboration des projets de recherche.

.

5.3.1 Description des niveaux de confinements.

Cette notion de confinement intègre les 3 notions suivantes :

- La conception du laboratoire
- Les aménagements internes
- Les bonnes pratiques de travail.

5.3.2 Le laboratoire de recherche standard (confinement L1)

- La conception du laboratoire :

Dans un laboratoire L1, le matériel biologique manipulé n'est pas pathogène. Il s'agit, par conséquent d'un laboratoire standard qui doit être séparé des autres locaux par une porte et posséder les caractéristiques suivantes :

- Un espace convenable pour chaque manipulateur

- Des surfaces lisses (murs, sols, paillasses), faciles à nettoyer et résistantes aux agents détergents et de désinfection
- Une absence d'endroits difficilement accessible au nettoyage (éviter les plinthes par exemple)
- Présence d'un évier ou d'un lavabo
- Présence d'un vestiaire
- Présence d'un autoclave dans le bâtiment.

➤ **L'équipement du laboratoire :**

Aucun équipement spécial de confinement n'est exigé

➤ **Les bonnes pratiques de laboratoire :**

- Connaître les consignes de sécurité et la conduite à tenir en cas d'accident
- Interdiction de boire, manger, fumer, se maquiller
- Ne pas décapuchonner les stylos feutres avec les dents
- Les plans de travail doivent être désinfectés avant et après manipulation
- Se laver les mains avant et après manipulation
- Le port de la blouse est obligatoire
- Le port de gants, de lunettes de protection et/ou de masque est optionnel et dépend de la manipulation réalisée (association avec un risque chimique, par exemple)
- Dans la mesure du possible, utiliser du matériel à usage unique
- Eviter l'emploi d'aiguilles et de matériel en verre
- Les aiguilles et matériels coupants doivent être récupérés dans des containers spéciaux imperforables de type "boîte de sécurité". Ne jamais recapuchonner les aiguilles.
- Ne pas pipeter à la bouche, utiliser un système d'aspiration et de refoulement mécanique de type "Pipetaid"
- Minimiser la formation d'aérosols
- Lors des centrifugations, privilégier l'utilisation de tubes hermétiquement fermés

- Ne pas stocker d'animaux non concernés par l'expérimentation en cours

5.3.3 Le laboratoire de confinement L2

➤ La conception du laboratoire :

- Marquage du niveau de confinement par apposition du pictogramme de danger biologique à l'entrée du laboratoire
- Accès réglementé et verrouillable. Accès possible pour les seuls travailleurs autorisés
- Les noms du responsable du L2 et des personnes autorisées à y travailler seront affichés sur la porte
- La fermeture de la porte doit être automatisée (pose de ferme-porte)
- Les robinets d'eau doivent être à commande non manuelle
- La présence d'un oculus permettant de voir les occupants est recommandée
- L'étanchéité du local est recommandée afin de pouvoir le désinfecter par fumigation

➤ L'équipement du laboratoire :

- Poste de Sécurité Microbiologique de type II (PSM type II) homologué à l'ancienne norme NFX 201 ou la nouvelle norme EN 12469 et certifié par le LNE.
- Autoclave facilement accessible et, si possible, dans le bâtiment et à l'étage.
- Centrifugeuse à rotor étanche ou centrifugation en utilisant des tubes étanches
- Incubateur à CO₂
- Présence de tout le petit matériel de pipetage automatique (pipetaid, pipetman...)
- Un moyen de communication avec l'extérieur du local est recommandé (téléphone, interphone...). Ne pas l'utiliser avec les gants servant à l'expérience en cours.

- Il est conseillé de climatiser le laboratoire afin que la porte reste fermée pendant l'exécution du travail.

➤ **Les bonnes pratiques de laboratoire :**

- Afficher clairement dans le L2 la conduite à tenir en cas de contamination.
- Le port de la blouse est obligatoire. Il est conseillé d'en avoir une spéciale, facilement identifiable (par exemple de couleur), qui sera retirée après manipulation et restera dans le Local.
- Le port de gants est obligatoire. S'assurer que la jonction entre gants et manches de blouse est totale.
- Le port de masque et/ou de lunettes* est optionnel. Cela dépend de la manipulation réalisée.
- Les broyages de tissus et de cellules doivent être réalisés sous PSM de type II.
- Après centrifugation ou homogénéisation, ouvrir les rotors ou récipients sous PSM de type II, afin d'empêcher la dissémination des aérosols.
- Eviter au maximum la création d'aérosols et de projections
- Inactiver le matériel contaminé et les déchets. Si l'inactivation est effectuée à l'extérieur du L2, transporter le matériel dans un container étanche et fermé.

5.3.4 Le laboratoire de confinement L3

➤ **La conception du laboratoire :**

- Accès au laboratoire par un sas. L'aménagement du sas devra comporter.
 - des vestiaires pour permettre de changer de blouse et de s'équiper des équipements de protection individuelle nécessaire aux manipulations.
 - une douche, si possible, pour permettre la décontamination du personnel en cas d'accident.

- Filtration de l'air extrait par un filtre absolu type HEPA.
- Fenêtres du laboratoire incassables et scellées hermétiquement.
- Maintient du L3 en dépression par rapport aux zones voisines.
- Alarme signalant tout changement de pression.
- Présence d'un système permettant l'inactivation des effluents des éviers et des douches.
- Etanchéité du local obligatoire permettant la désinfection par fumigation.
- La présence d'un groupe électrogène de secours est vivement conseillée.

➤ **L'équipement du laboratoire :**

- Poste de Sécurité Microbiologique de type II (PSM type II).
- Autoclave à double entrée.
- Centrifugeuse à rotor étanche ou centrifugation en utilisant des tubes étanches.
- Incubateur à CO₂.
- Congélateur permettant de stocker le matériel biologique sur place. Il est conseillé de le coupler à une alarme.
- Présence de tout le petit matériel de pipetage automatique (pipetaid, pipetman...)
- Un moyen de communication avec l'extérieur du local est recommandé (téléphone, interphone...). Ne pas l'utiliser avec les gants servant à l'expérience en cours.
- Appareil pour formolisation.

➤ **Les bonnes pratiques de laboratoire :**

- Connaître les consignes de sécurité et la conduite à tenir en cas d'incident ou d'accident.
- Il est conseillé d'avoir soit des blouses jetables, soit des blouses spéciales, facilement identifiables (code couleur), qui seront retirées après manipulation et resteront dans le sas. Elles doivent être autoclavées avant d'être envoyées à la blanchisserie.

La problématique de la mise en œuvre de la culture du bacille de Koch dans le LNR du MALI

- Le port de gants, de coiffe et de surbottes est obligatoire.
- Le port de masque* et/ou de lunettes** est optionnel car cela dépend de la manipulation réalisée.
- Les broyages de tissus seront réalisés sous PSM de type II.
- Après centrifugation ou homogénéisation, ouvrir les rotors ou récipients sous PSM de type II, afin d'empêcher la dissémination des aérosols.
- Eviter au maximum la création d'aérosols et de projections.
- Inactiver le matériel contaminé et les déchets par autoclavage.
- Mettre en place un programme de lutte contre les insectes et les rongeurs.
- Ne pas stocker d'animaux non concernés par l'expérience en cours.

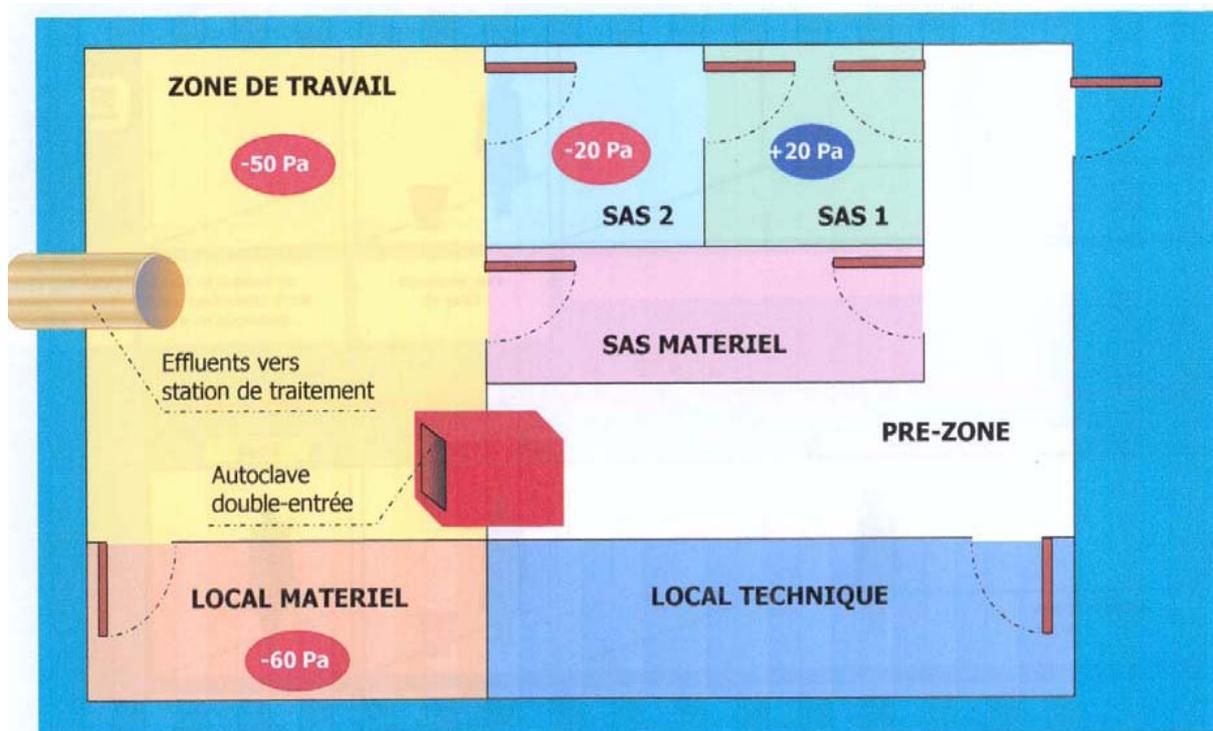


Figure 3 : Schéma d'un laboratoire de type L3

(Document Clima+ Ingénierie du confinement)

5.3.5 Les Equipements de confinement

➤ Postes de Sécurité Microbiologique (PSM)

Nous avons vu que la prévention du risque biologique en laboratoire de recherche repose sur le principe de confinement du risque en tenant compte de 3 paramètres étroitement corrélés :

- La conception du laboratoire, c'est-à-dire son confinement physique propre.

- L'équipement particulier du laboratoire.

- La définition et le respect des bonnes pratiques de laboratoire

Concernant le deuxième point, le confinement est assuré par l'utilisation d'enceintes ventilées.

presque fermées dans lequel l'air est extrait au travers de filtres dont les pores sont adaptés à la rétention de particules dont la taille est supérieure à 0,22 μ .

Ces filtres appelés « absolus » ou HEPA pour « High efficiency particulate air filtration » possèdent donc la capacité de retenir tous micro-organismes de type bactéries.

Ces enceintes ventilées ou postes de sécurité microbiologiques (PSM) doivent être conforme à la norme française NF X 44-201 ou à la norme européenne EN 12 469. Cette norme précise la classification des PSM, leurs caractéristiques et les méthodes permettant leur vérification. Elle ne précise pas si les effluents extraits des PSM doivent être rejeté dans l'atmosphère extérieure ou peut être recyclé dans le laboratoire. C'est cette seconde possibilité qui a été retenue par la majorité des constructeurs.

Il existe trois types de PSM qui se différencient par les moyens technologiques mis en œuvre et les niveaux de protection atteints. Leurs domaines d'emploi respectifs intéressent la manipulation des micro-organismes de groupes de pathogénicité croissante, mais la norme française se borne à indiquer que les PSM de types II sont destinés à assurer la protection du manipulateur contre les risques biologiques faibles ou modérés (groupes 1 et 2). D'après les normes américaines et britanniques, seuls les PSM de type III,

voient leur domaine d'application étendu aux micro-organismes du groupe 4.

➤ **PSM de type I**

Ce type de PSM assure simultanément la protection du manipulateur par la création d'un flux d'air entrant dans l'enceinte et de l'environnement par évacuation du flux d'air hors de l'enceinte à travers un filtre HEPA.

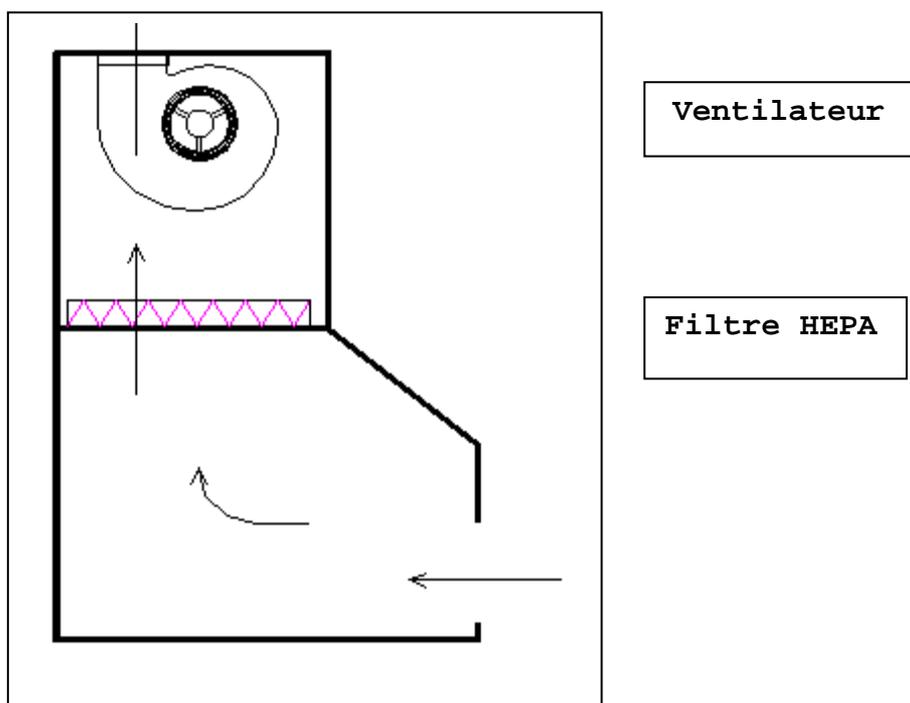


Figure 3 : PSM de type I

➤ **PSM de type II**

Ils fonctionnent avec un flux d'air laminaire vertical qui s'écoule dans le volume de travail de haut en bas et est aspiré au niveau du plan de travail ou à travers celui-ci lorsqu'il est perforé.

Ils assurent la protection du manipulateur par une aspiration créée sur le bord avant du plan de travail constituant ainsi une barrière immatérielle entre le manipulateur et la manipulation. Ils assurent également la protection de l'environnement par

l'évacuation du flux d'air hors de l'enceinte à travers un filtre HEPA.

En outre ils assurent la protection du produit manipulé contre la contamination à l'aide d'un flux d'air unidirectionnel vertical descendant, passant à travers un filtre absolu, la contamination pouvant provenir aussi bien de l'atmosphère du laboratoire que d'autres produits manipulés simultanément.

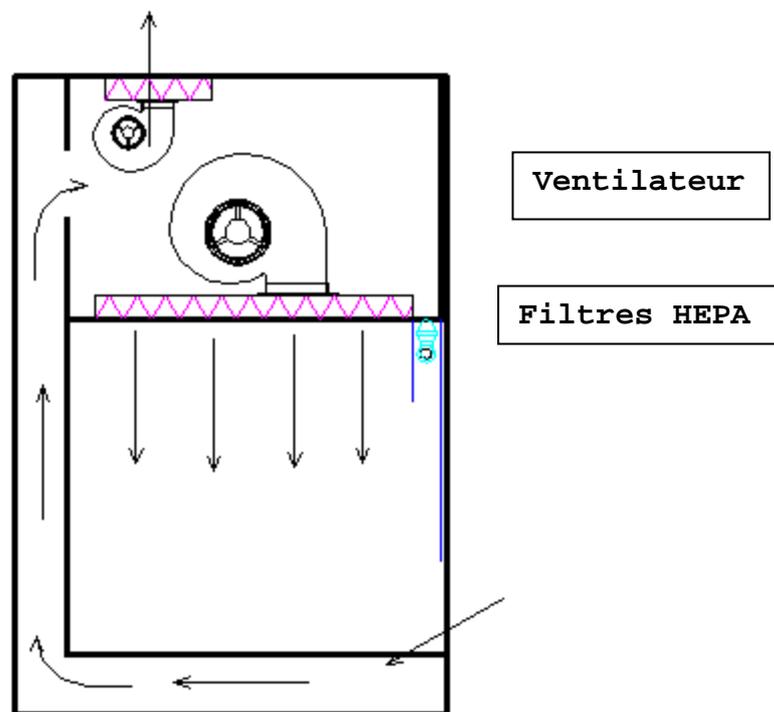


Figure 4 : PSM de type II

➤ PSM de type III

Ce dernier type de PSM assure :

La protection du manipulateur par la création d'un volume entièrement fermé puisqu'on accède à la zone de travail par des gants sertis sur l'enceinte.

La protection de la manipulation par l'alimentation de l'enceinte en air passé sur filtre HEPA.

La protection de l'environnement puisque l'évacuation du flux d'air potentiellement contaminé se fait à l'extérieur de l'enceinte après passage sur deux filtres HEPA placés en série. Par contre, ils n'assurent pas de protection particulière du produit contre la contamination croisée en raison de l'absence d'écoulement d'air unidirectionnel dans l'enceinte.

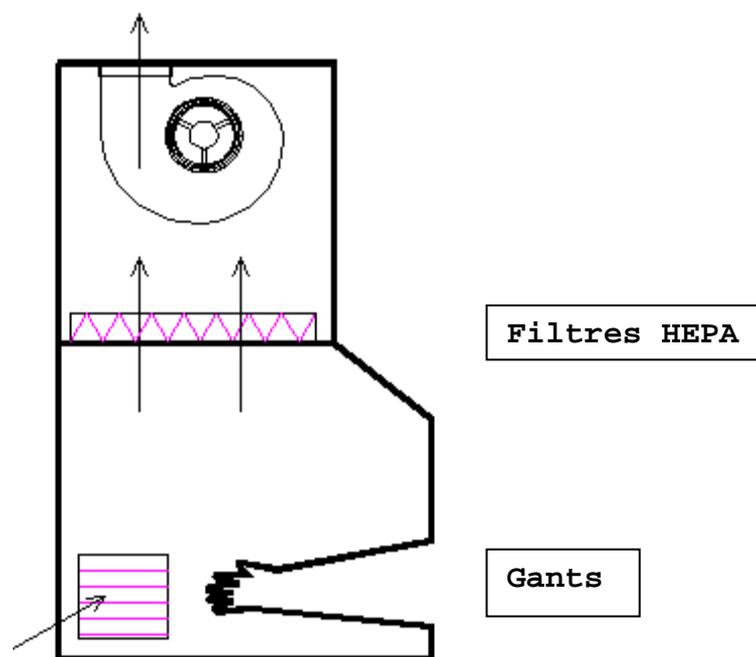


Figure 5 : PSM de type III

L'entretien et la vérification de tous ces matériels doivent être faits régulièrement.

Les contrôles doivent avoir lieu :

- Lors de la réception du PSM.
- Lors du changement du/des filtre(s) HEPA.
- Lors de tout déplacement du PSM.
- Après toute projection de liquide sur le filtre HEPA.
- Lors de l'apparition d'une contamination du produit manipulé.
- Systématiquement au moins une fois par an.

Ces contrôles doivent porter essentiellement sur :

- La propreté particulaire et biologique de l'air soufflé sur le plan de travail et de l'air expulsé dans l'environnement.
- La vitesse et la laminarité du flux d'air.
- L'étanchéité du poste et l'efficacité du bandeau de reprise.

L'utilisation de ces trois types de PSM répond à des obligations minimales :

- Nettoyage de l'intérieur de l'enceinte à l'alcool ou au désinfectant type Incidine SP. Pas d'eau de javel trop concentré sur des plans de travail en inox.
- Nettoyer, dépoussiérer, aseptiser tout objet devant être introduit dans l'enceinte. Ne pas y introduire de matériel réputés polluants comme : bois, liège, carton, papier, crayon, gomme.
- La zone stérile de l'enceinte n'est pas un placard de rangement. Evitez d'encombrer le volume de travail, car cela perturbe le flux laminaire.
- Pas de sources de chaleur de type bec bunsen, la encore, il y a perturbation du flux laminaire. De plus, il y a un risque de brûler le filtre HEPA ou tout du moins de l'endommager.
- Pas de désinfection par rampe UV germicide d'une durée supérieure à un quart d'heure.

Leur utilisation prolongée détériore la structure du matériau.

- Ne pas effectuer de mouvements rapides ou de gestes brusques dans le volume de travail, car cela perturbe le flux laminaire et contribue à la génération d'aérosols.

Remarque concernant les hottes à flux laminaires

On trouve encore actuellement dans les pièces de cultures des hottes à flux laminaire vertical.

Il faut savoir que ce sont des postes à écoulement laminaire, définis par la norme française NF X 44-102, qui ne sont pas des postes de sécurité microbiologiques car ils laissent échapper dans l'atmosphère extérieure des proportions non négligeables d'air non

La problématique de la mise en œuvre de la culture du bacille de Koch dans le LNR du MALI

filtré et donc potentiellement contaminé par des agents biologiques pathogènes.



Figure 6 : Hotte à flux laminaire vertical



Figure 7 : Hotte à flux laminaire horizontal

Les hottes à flux laminaire horizontal que l'on trouve encore également dans les laboratoires de biologie ne devraient être utilisées que pour des travaux nécessitant la stérilité du matériel manipulé. En aucun cas elles ne doivent servir à la manipulation d'agents pathogènes, même minime. En effet, dans ce type de hotte, le flux laminaire potentiellement contaminé est directement expulsé sur le manipulateur.

5.3.6 Les procédés de désinfection, décontamination et inactivation

Quelques définitions :

- **La désinfection** est une action momentanée, limitée dans le temps qui permet d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus indésirables contenus dans les milieux inertes contaminés. Le résultat de cette opération est limité aux micro-organismes présents au moment de l'action. En cas de contamination postérieure, il faudra recommencer l'opération.
- **La décontamination** est une opération qui a pour but d'éliminer, de tuer ou d'inhiber les micro-organismes indésirables en fonction des objectifs fixés. Seuls sont détruits les microorganismes présents au moment de l'opération. La décontamination est partiellement bactériostatique, c'est-à-dire que les procédés utilisés pour la décontamination n'inhibent que momentanément la prolifération des micro-organismes dans des conditions bien définies.
- **L'antisepsie** est une opération ou un ensemble de mesures permettant, au niveau des tissus vivants et dans la limite de leur tolérance, d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus. Le résultat de cette opération est limité aux micro-organismes présents au moment de l'application.

- **La stérilisation** est un ensemble de moyens tendant à obtenir la stérilité ou, au moins l'abaissement du degré de contamination à un niveau acceptable. La stérilité correspond à l'état du produit, d'un fluide, d'un local dans lequel les micro-organismes ne peuvent être détectés.

- Un produit est dit **bactéricide** lorsqu'il a la propriété de tuer les bactéries dans des conditions d'usage bien définies.

- Un produit est dit **bactériostatique** lorsqu'il possède la propriété d'inhiber momentanément la multiplication des bactéries dans des conditions d'emploi précises.

Il est impératif d'afficher en termes clairs le mode d'emploi des méthodes de désinfection utilisées. De s'assurer que ce mode d'emploi a été bien lu, bien compris et qu'il est bien respecté.

➤ **Désinfection des surfaces (sols, murs, paillasses de laboratoire)**

Parmi les produits désinfectants que l'on peut trouver dans le commerce (halogènes, aldéhydes, phénols ou agents tensioactifs) celui le plus couramment utilisé est l'eau de javel.

Ce produit possède en effet, et de loin, le meilleur rapport qualité/prix.

Ce produit halogéné chloré possède un large spectre d'action et son effet bactéricide est obtenu très rapidement par la destruction des protéines de structure des cellules, des bactéries gram+ et gram-, de la grande majorité des virus, des champignons et des levures. Cette destruction est due au pouvoir oxydant du chlore contenu dans l'eau de javel.

L'eau de javel est instable dans le temps, à la lumière et à température élevée. Il est donc nécessaire d'utiliser des dilutions fraîchement préparées et de laisser agir pendant une demi heure minimum. Dans certaines situations, il sera bon de laisser agir l'eau de javel toute la nuit. Par exemple, la

présence de protéines dans l'échantillon retarde l'effet de la désinfection.

L'eau de javel se présente sous la forme de berlingots de 250 ml concentré à 48° chlorométriques. Ils doivent être dilués au quart avec de l'eau froide de manière à obtenir une eau de javel à 12°Cl (attention aux projections à l'ouverture du berlingot et au transvasement).

Ne surtout pas utiliser de récipient alimentaire pour réaliser et stocker la dilution (risque d'empoisonnement).

On trouve également dans le commerce l'eau de javel prête à l'emploi (à 12°Cl) dans des flacons plastiques de 1, 2 ou 4 litres.

Pour la désinfection des surfaces (paillasses, sols...), on utilisera une solution à environ 1 à 2° Cl.

L'eau de javel à 12°Cl sera utilisée pure pour une désinfection correcte des récipients contenant ou ayant contenu des produits biologiques (surnageants de culture par exemple) ainsi que des siphons d'évier.

Ne jamais utiliser l'eau de javel en présence d'un acide car il se produit alors un dégagement de chlore gazeux toxique.

L'alcool éthylique est également un bon produit désinfectant lorsqu'il est utilisé à la concentration de 60 à 70°GL. A cette concentration, il est moins volatil que l'alcool à 90°GL, voir à l'alcool absolu et il ne déshydrate pas les membranes cellulaires.

➤ **Stérilisation des produits biologiques, des cultures microbiennes et des récipients les ayant contenus.**

- **Chaleur sèche : fours**

La chaleur sèche agit en dénaturant les protéines. On peut l'utiliser dans les fours Poupinel, chauffés électriquement ou dans les fours Pasteurs. Dans ces fours, il doit y avoir une répartition homogène de la chaleur dans toute l'enceinte. Le temps

nécessaire à la stérilisation doit être compté à partir du moment où l'objet atteint la température désirée. Il est de 30 minutes à 180°C et de 1 heure à 170°C. Ce procédé est utilisé pour les instruments détériorés par l'humidité.

- Chaleur humide : autoclave

La stérilisation par la chaleur humide sous pression est la méthode la plus utilisée car elle est fiable efficace et facile d'emploi.

L'autoclave est une enceinte hermétique dans laquelle on peut faire agir de la vapeur d'eau saturée. Ce procédé détruit les bactéries en dénaturant les protéines en 20 minutes à 121°C, à condition que l'atmosphère de l'autoclave soit saturante et débarrassée d'air. Il est donc très important de respecter avant la fermeture de l'appareil, les phases initiales destinées à le purger de l'air qu'il contenait.

Les utilisateurs d'autoclaves doivent avoir reçu une formation agréée et les appareils, qui relèvent de la législation des récipients sous pression sont soumis à des vérifications périodiques effectuées par un organisme agréé par le service des Mines.

Ce procédé peu coûteux doit rester la méthode de choix pour pré-traiter du matériel biologique destiné à une incinération ultérieure.

- L'élimination des déchets biologiques

En règle générale et dans l'attente de réglementations précises concernant chacun des cas particuliers, il faut impérativement inactiver les déchets biologiques soit à l'autoclave, soit à l'eau de javel puis les faire incinérer par une entreprise spécialisée après les avoir collectés dans des récipients inviolables, étanches et résistants. Un bordereau de suivi des déchets industriels (BSDI) doit accompagner ces déchets et revenir

au producteur, signé du transporteur et de l'entreprise qui a éliminé le déchet.

6. Tâches du LNR [36]

Le laboratoire national de référence de la tuberculose donnera priorité aux activités qui soutiennent ces objectifs dans le cadre du réseau national de laboratoires. Dès lors les tâches principales du laboratoire national de référence de la tuberculose consistent à :

- maintenir un niveau élevé de compétences en matière d'examens microscopiques de routine des frottis exécutés dans les services de santé périphériques ;
- standardiser les techniques utilisées dans le réseau ;
- organiser et coordonner la formation du personnel du réseau ;
- organiser les tests d'assurance de qualité de l'examen microscopique des frottis dans le réseau national de laboratoires ;
- mettre en œuvre la surveillance de la résistance aux médicaments antituberculeux ;
- élaborer et exécuter des recherches opérationnelles.

Il est clair que le laboratoire national de référence de la tuberculose est rarement en état d'exécuter toutes les tâches concernant la formation, la supervision et les tests de contrôle de qualité des examens microscopiques des frottis de crachats sur l'ensemble du pays ; cela d'ailleurs ne constituerait pas une utilisation efficiente de ses ressources. Néanmoins, il porte globalement la responsabilité d'élaborer des standards nationaux et de superviser l'application des stratégies. La décentralisation de certaines activités est hautement souhaitable et le laboratoire national de référence de la tuberculose devrait être un moteur pour encourager les laboratoires de niveau intermédiaire (régionaux ou provinciaux) à prendre part à l'exécution des tâches essentielles dans le réseau national de laboratoires. A long

terme, il est bon de mettre en œuvre une décentralisation efficace pour rendre le soutien du PNT de plus en plus efficient.

7. Besoin en personnel au LNR [36]

Afin d'assurer un fonctionnement correcte, le laboratoire national de référence de la tuberculose doit bénéficier d'un personnel adéquat. Pour une charge de travail modérée, le nombre minimum exigé d'employés comportera :

- 1 chef de laboratoire qui est responsable du fonctionnement global du laboratoire de référence et du maintien d'une étroite coordination avec le PNT afin d'exécuter les tâches essentielles pour la lutte antituberculeuse dans le pays. En particulier, il y a lieu de classer clairement les tâches du dit laboratoire de référence par ordre de priorité. La qualification du chef de laboratoire répond idéalement à un grade de doctorat en microbiologie, médecine ou secteur apparenté. Le chef du laboratoire doit être capable d'organiser, de coordonner et de mener toutes les tâches à un niveau très élevé de compétence.
- 1 chef adjoint, professionnel junior du laboratoire qui doit être suffisamment qualifié et compétent pour entreprendre les tâches du chef dans toutes les activités liées au laboratoire et jouer un rôle actif en l'absence du chef du laboratoire. Les qualifications requises sont similaires à celles du chef du laboratoire, mais l'ancienneté dans la profession peut être moins importante.
- 2 techniciens de laboratoire pour l'examen microscopique bien entraînés, compétents à la fois pour la microscopie à champ clair et en fluorescence sont nécessaires pour le fonctionnement du laboratoire de référence. Ils sont essentiels pour garantir une qualité élevée des services de routine, pour former les stagiaires et participer aux activités d'évaluation externe de qualité des frottis de crachats.

- 2 personnes (en rotation) responsables des services de culture (préparation des milieux, inoculation, test de sensibilité aux médicaments, lecture). Cela est nécessaire si l'on veut assurer et maintenir un niveau élevé de compétence pour les techniques standardisées de culture et de test de sensibilité aux médicaments
- 1 personne pour le nettoyage et l'entretien qui sera utilisé à temps plein est nécessaire pour garantir la stérilisation l'élimination du matériel contaminé, le nettoyage de la verrerie ainsi que le nettoyage général quotidien du laboratoire.

Si la charge de travail augmente, un accroissement du personnel peut être nécessaire. La rotation du personnel du laboratoire national de référence de la tuberculose pour un travail dans d'autres laboratoires nationaux de référence est rarement efficace et devrait être évitée.

IV. METHODOLOGIE

1. CADRE D'ETUDE

Notre étude s'est déroulée au sein de l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP), dans le service de bactériologie - virologie (section laboratoire National de Référence de la Tuberculose : LNR

2. Période d'étude

Elle s'est déroulée sur une période de 6 mois, de juin à décembre 2008.

3. Type d'étude

L'étude était prospective.

4. Echantillonnage

Il était fait de façon aléatoire. Il concerne les échantillons de crachats mis en culture au LNR et les données recueillies au près du personnel et les acteurs principaux du LNR. Les crachats mis en culture étaient ceux collectés au LNR et ceux des laboratoires des CSRef.

Le recueil des données était fait à partir d'un questionnaire.

La taille était définie par le nombre d'échantillon mis en culture durant la période d'étude.

5. Critères d'inclusion

Était inclus dans notre étude :

- Tous les échantillons mis en cultures pendant notre période d'étude ;
- Le personnel et les acteurs principaux du LNR.

6. Critères de non inclusion

Ne sont pas inclus dans notre étude :

- Les crachats salivaires ;
- Les crachats contenant des débris alimentaires ;
- Le personnel retraité du service.

7. Méthodes

Au préalable une demande de consentement était adressée au directeur de l'INRSP et aux responsables du service de bactériologie et des centres de santé concernés pour la réalisation de notre étude.

Collecte des données

- Un questionnaire était adressé au personnel afin de déterminer les conditions générales du laboratoire.
- Une observation du laboratoire et des conditions de travail nous ont permis d'évaluer la performance et la qualité de bio sécurité.

Collecte et transport des échantillons :

Le délai entre la collecte de l'échantillon et la mise en culture

était très important.

Une collecte des échantillons était faite dans les centres de diagnostic du district de Bamako et transporté au LNR pour culture dans un portoir.

Procédures de culture

➤ Matériel et équipement

- Poste de sécurité - Hotte
- Etuves à 37°C
- Tubes Falcon 50 ml à usage unique et portoirs des tubes
- Pipettes transfert à usage unique
- Pipettes pasteurs stériles pour ajouter la solution de décontaminant
- Minuterie
- Vortex
- Crachoirs
- Poubelle munie d'un sachet plastique pour jeter les déchets solides contaminés ou non destiné à l'incinération
- récipient en plastique avec couvercle à vis (bidon) de 5 litres contenant un désinfectant (phénol) à 25%. Cette solution sera diluée en y versant les surnageants et les pipettes. Elle aura une concentration finale de 5% quand le récipient est plein.
- Gants à usage unique non stériles
- Papier absorbant
- Plateaux
- Milieux de culture
- Incubateur à 37°C +/- 1°C
- Centrifugeuse (3000 G)
- Agitateur de Khan

Réactifs

- Solution stérile de soude à 4% : 20g de lentilles de NaOH

dans 500 ml d'eau distillée. Mélanger jusqu'à dissolution et stériliser à l'autoclave. Conserver de 2 à 8°C au maximum 6 mois ou 3 mois à température ambiante dans un flacon en verre.

Solution tampon stérile

➤ **Mode opératoire**

- S'assurer de travailler de manière aseptique en évitant la contamination du matériel stérile.
- Utiliser des gants à usage unique et travailler avec les échantillons sous le poste de sécurité ou hotte classe I ou II disponible au laboratoire.
- Placer le papier absorbant sur la surface de travail du poste de sécurité et l'imbiber de solution de phénol 5%. Réaliser toutes les manipulations du matériel contaminé sur ce papier et éviter la projection de gouttes de matériel contaminé.

➤ **Procédure pour les échantillons ne contenant pas de CPC**

- Ajouter un volume égal de solution de NaOH à 4% à un tube de 50 ml contenant le crachat. Si ceci est très purulent ou consistant ajouter le double de volume de soude.
- Mélanger la soude et le crachat avec le vortex en s'assurant que tout l'échantillon est en contact avec la soude. Agiter sur l'agitateur de Kahn pendant 20 minutes. Si la hotte utilisée est de classe II le temps de contact avec la soude peut être diminué à 15 minutes car ce type de cabine protège aussi le produit manipulé.
- Ajouter de l'eau distillée stérile jusqu'à 40 ml environs pour diminuer la viscosité et favoriser la sédimentation. Centrifuger à 3000G pendant 15 mn puis éliminer avec précaution le surnageant. Il faut éviter dans la mesure du possible que le temps de contact entre l'échantillon et la soude excède 30 minutes. Faire attention en ouvrant la

centrifugeuse une fois complètement arrêtée. Eliminer le surnageant dans le récipient pour les déchets liquides contenant du phénol 5%.

➤ **Ensemencement**

- ✓ Identification des tubes du milieu LJ.

Noter sur chaque tube le numéro de l'examen et la date de mise en culture en se servant d'étiquette.

- ✓ Ensemencement du milieu de culture.

Ensemencer, pour chaque échantillon, le culot en déposant 3 gouttes/tube dans 2 tubes de Lowenstein Jensen.

Incubation

Placer les tubes contenant l'inoculum à l'étuve à 37° C, en position horizontale. Ne pas fermer hermétiquement afin que la partie liquide de l'échantillon s'évapore (bouchon non complètement serré). Vérifier les tubes les 3 premiers jours et serrer les bouchons si le liquide s'est déjà évaporé. Placer les tubes de culture en position verticale dans l'étuve afin de gagner de la place. Il est très important de contrôler la température de l'étuve qui doit être 37°C +1°C - 2°C (c'est-à-dire entre 35 et 38°C) avec un thermomètre à l'intérieur.

Surveillance de la Culture

- ✓ 48 heures à 3 jours après l'ensemencement, examiner les tubes pour dépister les contaminations (milieu verdi ou liquéfié).
- ✓ Fermer les tubes, sans bloquer le bouchon, s'il n'y a plus de liquide dans les tubes.
- ✓ Les tubes sont incubés pendant 8 semaines. Ils sont examinés

une fois par semaine.

- ✓ La culture est déclarée positive dès l'apparition de colonies formées de bacilles acido-alcool-résistants contrôlés par la coloration de Z.N. Ces colonies sont «en chou fleur» pour *M tuberculosis*.
- ✓ Quatre caractéristiques sont observées et rapportées sur une fiche ou registre : l'aspect et la consistance du milieu de culture, vitesse de croissance (lente ou rapide), morphologie des colonies et couleur (présence ou absence de pigmentation).

➤ **Interprétation des résultats de la culture**

Elle était faite en fonction de tubesensemencés et on a considéré comme culture contaminé si un échantillon avait un tube contaminé.

Identification

Elle n'était faite à cause de l'absence de certains réactifs.

8. Saisie et analyse des données :

La saisie a été faite sur world 2007 et l'analyse des données sur EPI info.

9. Considérations éthiques

Ce travail a été possible grâce aux personnels du LNR et les laboratoires de csref ou les collectes ont eu lieu. Nous n'avons pas eu de contact direct avec les patients au cours de cette étude. Cependant, tous les crachats positifs et le registre des csref ainsi que les crachats et registre du LNR pendant la période d'étude ont été mis à notre disposition. Les renseignements

nécessaires à la réalisation de ce travail ont été recueillis sur des fiches d'enquête anonymes.

Aussi, nous nous sommes engagés à ne divulguer aucun renseignement lié à un malade.

Eu égard aux objectifs de cette étude, les conclusions nous permettront de cerner la problématique de la mise en œuvre de la culture de BK dans le laboratoire national de référence (LNR). Elles nous permettront également de formuler des recommandations pour un meilleur fonctionnement du laboratoire ce qui permettra une meilleure prise en charge des malades

V. RESULTATS

Pour atteindre les objectifs de cette étude, nous avons mené une étude de type prospectif allant de juin à décembre 2008. Ainsi l'évaluation du laboratoire LNR nous a permis d'avoir les résultats suivants :

1. Ressources humaines

Tableau III: Répartition du personnel de laboratoire selon leur qualification

Qualification	Fréquence	Pourcentage
Biologistes	1	16.67
Assistants Médicaux	3	50.00
Techniciens	2	33.33
Total	6	100

Les assistants médicaux représentaient 50% du personnel.

2. Matériels et Réactifs

Tableau IV : Liste des matériels techniques du laboratoire

Matériel	Fréquence
Hotte (classe I)	1
Hotte (classe II)	0
Centrifugeuse	1
Vortex	1
Agitateur de Kahn	1
Tubes fonds coniques	1000
Pipettes stériles	1000
Bain mari	1
Autoclave	0
Etuves	5
Réfrigérateur	1
Congélateur	0
Microscopes	2
Lames	2500
Gants	2000
Bavettes	600
Portoir pour tubes	64

Absence d'hotte de classe II, de congélateur et d'autoclave.

Tableau V : Listes des réactifs utilisés au laboratoire de microscopie

Noms des réactifs pour la bacilloscopie	
Fuchsine	2,5 Kg
Bleue de méthylène	1,5 Kg
acide chloridrique	30,3 L
Alcool 90°	1800 L
Huile à immersion	3 L

L'alcool était à 1800 L.

Tableau VI : Listes des réactifs utilisés au laboratoire de culture

Réactifs pour la culture, l'identification et l'antibiogramme	Quantité
Soude caustique 4%	2 Kg
Phénol 5%	10 Kg
Milieu lowenstein-Jensen	1,5 Kg
Niacine test bandellette (Tube de 25 bdes)	8
Tween 80 (100g)	1 bte
Eau oxygenée 130V	1L
Nitrate de sodium	100 g
TCH	25 g
Chlorure de cetylpyridinium	100 g
Acide sulfanilique	100 g
N-diméthyl naphtylamine	25 g
Poudre de zinc	250 g
Acide para amino salicylique	1 L

Pas de réactifs pour l'antibiogramme.

3. Infrastructure

Tableau VII : Tableau représentant l'infrastructure du laboratoire

Les différentes pièces utilisées	Nombre
Bureau du responsable	1
Petit magasin	1
Salle de culture	1
Salle de la bacilloscopie	1
Total	4

La salle de bacilloscopie est aussi utilisée comme bureau par le reste du personnel.

4. Résultats de la culture

4.1. Caractéristiques sociodémographiques

➤ Sexe

Tableau VIII: Fréquence des échantillons en fonction du sexe

Sexe	Fréquence	Pourcentages
F	70	35,0%
M	130	65,0%
Total	200	100,0%

Le sexe ratio était de 1,86 en faveur des hommes.

➤ Age

Tableau IX : Fréquence des échantillons en fonction de l'âge

Age (Ans)	Fréquence	Pourcentages
3-20	15	7,5%
21-40	103	51,5%
41-60	55	27,5%
61-80	25	12,5%
Sup à 80	2	1%
Total	200	100

La classe 21-40 représentait la moitié de notre échantillon avec 51,5% des cas ; la moyenne d'âge était de 36 ans avec des extrêmes de 3 et 95 ans.

➤ lieu de provenance

Tableau X : Provenance des échantillons mis en culture

Provenance	TPM+	TPM-	Pourcentages
C 1	14	0	7,0%
C 2	13	0	6,5%
C 6	12	0	6,0%
LNR	48	113	80,5%
Total	87	113	100,0%

Les échantillons du LNR représentaient 80,5% de notre étude.

4.2. Résultats biologiques

➤ Microscopie

Tableau XI : Répartition des échantillons TPM+ selon la quantification à la lecture

Provenance	TPM	TPM	TPM	TPM	Total
	1+	2+	3+	f+	
C 1	4	1	9	0	14
C 2	1	3	9	0	13
C 6	4	4	2	2	12
LNR	16	6	16	10	48
Total	25	14	36	12	87

36 échantillons étaient TPM3+ soit un taux de 41%.

Tableau XII : Intervalle entre date de recueil et de mis en culture du crachat

Durée entre recueil et mis en culture (en jour)	Fréquence	Pourcentages
0	68	34%
1-2	93	46,5%
Sup à 2	39	19,5%
Total	200	100%

La durée 1 à 2 jours représentait 46,5%, avec une durée maximum de 13 jours.

Tableau XIII : Résultat de la culture des échantillons négatifs à la microscopie

Statut du patient	Contaminé	Négatifs	Positifs	Total	pourcentage
Nvx	5	88	8	101	89,4%
S2	0	3	1	4	3,5%
S3	0	1	1	2	1,8%
S5	0	2	0	2	1,8%
S7	0	2	0	2	1,8%
Sup S7	0	2	0	2	1,8%
Total	5	98	10	113	100%

10 échantillons TPM - ont été positifs à la culture soit 8,85%.

Tableau XIV : Résultat de la culture des échantillons positifs à 1+ à la microscopie

Statut du patient	Contaminé	Négatifs	Positifs	Total	pourcentages
Nvx	1	1	10	12	48%
S2	0	3	5	8	32%
S3	0	2	0	2	8%
S5	0	1	0	1	4%
S7	0	1	0	1	4%
SupS8	0	0	1	1	4%
Total	1	8	16	25	100%

Les diagnostics nouveaux représentaient 62,5% des échantillons positifs à la culture.

Tableau XV : Résultat de la culture des échantillons positifs 2+ à la microscopie

Statut du patient	Contaminé	Négatifs	Positifs	Total	pourcentages
Nvx	0	0	14	14	100%
S2	0	0	0	0	0%
S3	0	0	0	0	0%
S5	0	0	0	0	0%
S7	0	0	0	0	0%
SupS8	0	0	0	0	0%
Total	0	0	14	14	100%

Les nouveaux cas TPM 2+ sont tous positifs à la culture

Tableau XVI : Résultat de la culture des échantillons positifs 3+ à la microscopie

Statut du patient	Contaminé	Négatifs	Positifs	Total	pourcentages
Nvx	2	0	30	32	88,9%
S2	0	1	0	1	2,8%
S3	0	0	0	0	0%
S5	0	0	0	0	0%
S7	0	0	0	0	0%
SupS8	0	1	2	3	8,3%
Total	2	2	32	36	100%

Sur les 36 échantillons TPM 3+, 32 sont positifs à la culture soit 88,9%

Tableau XVII : Résultat de la culture des échantillons faiblement positifs à la microscopie

Statut du patient	Contaminé	Négatifs	Positifs	Total	pourcentages
Nvx	0	2	2	4	33,3%
S2	0	2	1	3	25%
S3	0	3	0	3	25%
S5	0	2	0	2	16,7%
S7	0	0	0	0	0%
SupS8	0	0	0	0	0%
Total	0	9	3	12	100%

Plus de la moitié des échantillons F+ ont été stérile à la culture soit un taux de 75%.

Tableau XVIII : résultat de la culture des échantillons ensemencés en double

Résultat de la culture	TPM+	TPM-	Total	Pourcentages
C	12	24	36	9%
N	35	184	219	54,75%
P	127	18	145	36,25%
Total	174	226	400	100,%

9% de contamination et 36,25% de culture positive

VI. DISCUSION

Depuis un certain nombre d'année, la culture mycobactériologique connaît des difficultés, ce qui a conduit à son arrêt pendant un certain temps.

Cette étude est une première au Mali avec l'objectif de cerner les problèmes liés à la culture. Nous avons choisi 200 échantillons au hasard dont la majorité venait du LNR (80,5%) ; seulement 19,5% provenaient des CSRéf et étaient tous positifs.

A travers un questionnaire établi à l'endroit des personnels exerçant au LNR pendant notre période d'étude, nous avons recensé certains problèmes suivant nos objectifs

Les insuffisances méthodologiques sont dues essentiellement

- A l'absence de transport des échantillons des CSRef vers le LNR.
- A la rupture de stock des milieux de cultures.
- A la non identification des souches cultures positives.

Les qualifications en ressources humaines

Etant au nombre de six personnes suivant leur qualification les capacités en ressources humaines sont insuffisantes car le LNR ne disposait pas de pharmaciens ni de personnel de soutien. Le manque de personnel s'est accentué avec le départ de deux techniciens et en plus pour que le personnel soit apte à manipuler, il doit être en bonne santé, vacciné à l'aide du BCG avec vérification grâce au test à la tuberculine (sauf si la non réaction est montrée), être suivi par examen radiologique. Il est préférable que les femmes enceintes ne manipulent pas les produits susceptibles de contenir des mycobactéries tuberculeuses [35].

L'infrastructure du laboratoire

Sur le plan infrastructure le bâtiment utilisé est moyen avec une bonne fourniture en eau et électricité deux pièces techniques disponibles, une pour la bacilloscopie et la deuxième pour la culture ;

Un bureau pour le responsable du laboratoire contigu à un petit magasin et l'absence de bureau pour le reste du personnel

L'interview du personnel exerçant au LNR nous a aussi permis de dégager certaines difficultés qui sont les suivantes :

- Le manque d'équipement de sécurité.
- Le problème de contrôle de flux d'air dans la salle de culture.
- La non utilisation de moyen de protection correctement.
- La procédure d'élimination des déchets non respectée.

Etat de lieu du laboratoire

Matériels techniques

Hormis la hotte utilisée qui est un peu inadéquat pour la manipulation tous les autres matériels techniques sont au complet. La maintenance préventive des appareils n'est pas régulière, les pièces détachées non disponibles et les relevés de températures pour les frigos sont absents.

Dans les règles de travail en mycobactériologie le laboratoire doit être équipé correctement : le travail sur les mycobactéries impose l'utilisation d'un **PSM (Poste de sécurité en Microbiologie) de classe II**. Il doit être installé dans une pièce séparée du laboratoire, pièce mise en dépression (pression négative). L'air doit y être renouvelé 6 à 12 fois par heure. En l'absence du personnel il doit être stérilisé par lampes germicides [35].

La plupart des cas d'infection acquise au laboratoire proviennent de l'aspiration d'aérosols contenant des micro-organismes viables. Ces aérosols sont produits lors de la manipulation de produits pathologiques ou de cultures : ouverture de tubes,

préparation de frottis, transfert de frottis avec pipettes ou anses, centrifugation ou agitation des tubes ou fioles, accident de manipulation où les tubes sont brisés. Même avec les meilleures techniques, il n'est pas possible d'empêcher la formation d'aérosol. Le personnel de laboratoire est donc susceptible d'être infecté si des précautions adéquates ne sont pas adoptées [13].

Produits et Réactifs

Ayant une satisfaction dans les commandes de l'ordre de 79% les produits et réactifs sont gérés à deux niveaux : une partie à la DPLM (division prévention et de lutte contre la maladie) et l'autre partie au LNR. Cette gestion à deux niveaux différents peut amener la rupture de stock et même la péremption de certains produits ou réactifs.

Les Problèmes liés à la culture

Les principaux sont :

- Locaux LNR inadéquat pour la culture d'où la construction d'un nouveau bâtiment.
- Non disponibilité d'une ligne budgétaire pour le LNR.
- L'irrégularité dans le suivi du laboratoire par le chef service de la bactériologie.
- Absence de salle propice pour la préparation de milieux de culture.
- Insuffisance de ressources humaines pour la préparation des produits et réactifs et la stérilisation.
- L'utilisation de milieu périmé (milieux prêt à l'emploi)
- L'intervalle entre la date de mise en culture et la date de collecte des expectorations liée à la rupture de milieux de culture.

Par contre dans le service de bactériologie-virologie du CHU Aristide le Dantec et dans les laboratoires périphériques de Dakar, une étude comparative entre LJ et MGIT sur 531 échantillons dont 121 positifs à la bacilloscopie et 410 négatifs à la

bacilloscopie ont été ensemencés sur MGIT et sur LJ pour l'isolement du complexe M.Tuberculosis.

Les cultures étaient positives pour 173 échantillons soit 32,5%. Parmi les 173 échantillons le taux d'isolement a été de 91,9% (159/173) pour MGIT et de 54,9% (95/173) pour LJ.

Le taux de contamination était plus élevé avec le MGIT soit 32,3% (172/531) que sur LJ soit 11,3% (60/531) [25].

Une autre étude comportait 163 échantillons de crachats, conservés pendant 3, 5

ou 7 jours. Chaque échantillon a été examiné avant et après 2 périodes de stockage au hasard. Ici encore, les résultats de l'examen de frottis n'ont pas été affectés.

Pourtant, une perte significative de la viabilité a été observée, la proportion de culture positive ayant été réduite de 92 % avant la conservation à 83 % au 3^{ème} jour 71 % au 5^{ème} jour et 63% au 7^{ème} jour. Les taux de contamination étaient de 5 %, 7 %, 12 % et 18 % respectivement.

Les auteurs concluent que les crachats ne devraient pas être conservés à la température ambiante au-delà de 3 jours pour la culture, mais qu'ils peuvent être gardés 4 semaines sans que cela entraîne une réduction dans la proportion de frottis positifs [29].

Les résultats de ces études comparatives entre les milieux liquide et solide démontrent que notre taux de contamination bien qu'élevé peut toujours s'améliorer pour atteindre la norme internationale et même descendre en dessous.

Résultats descriptifs

En fonction de la provenance, les échantillons recueillis au niveau du LNR étaient ensemencés le même jour, par contre ils avaient un retard d'ensemencement des échantillons provenant des CSRef d'où la durée moyenne de mise en culture de 1 à 2 jours.

Aussi nous avons constaté au cours de cette étude que la tranche d'âge des malades rentrés dans l'étude de 21-40 ans était la plus touchée avec une prédominance masculine de 65%.

Résultats analytiques :

Répartitions des résultats selon la bacilloscopie :

Les résultats négatifs représentaient 113 sur les 200 échantillons dont 10 échantillons étaient positifs à la culture soit un taux de 8,85%.

Les résultats positifs à 1+ en microscopie direct avaient un taux élevé de cultures positives du à la sensibilité de la culture.

Les résultats positifs à 2+ en microscopie direct provenant des nouveaux cas avaient les 100% de cultures positives

Parmi les 36 échantillons les résultats positifs à 3+ 88,9% étaient positifs à la culture avec 2 échantillons négatifs et 2 autres contaminés.

Les résultats faiblement positifs ont plus de 50% de culture négative.

Répartitions des résultats selon le nombre de tube ensemencé en double :

Sur les 200 échantillons ensemencés en double on a 145 tubes qui étaient positifs à la culture, 36 tubes étaient contaminés soit 9% et les 219 tubes restant étaient négatifs à la culture.

Ces résultats démontre que notre taux de souillures est encore élevé contrairement au donné internationale dont la norme est de 5%.

VII. CONCLUSION

En Afrique la tuberculose a été et demeurera un problème majeur de santé publique. Le diagnostic bactériologique est le moyen le plus sûr et fiable. En dehors de la bacilloscopie la culture augmente le taux de positivité. C'est pourquoi le programme national y attache une grande importance pour augmenter sa performance

Nous avons mené une étude prospective allant de juin à décembre 2008 (6 mois d'étude) et a porté sur 200 échantillons ensemencés en double soit 400 tubes mis en incubations.

Au terme de cette étude nous avons obtenu 145 tubes de cultures positives (poussées) soit un taux de 36,25%.

219 tubes de cultures négatives (stériles) soit 54,75% et 36 tubes de cultures contaminées soit 9%.

Ceci démontre que le taux de contamination est élevé par rapport à la norme internationale. Ce résultat peu satisfaisant s'explique par de différentes difficultés à savoir le transport des échantillons des CSRef vers le LNR et la rupture des milieux de cultures.

Mais il est à espérer que les ressources humaines et matérielles seront suffisantes pour faire face à la situation et on peut aussi considérer ces résultats comme encourageant et une source de motivation pour les échéances futures.

VIII. RECOMMANDATIONS

Au terme de cette étude, il nous paraît opportun de faire certaines recommandations :

➤ A L'INRSP

- D'inscrire une ligne budgétaire pour le LNR
- D'accorder une assistance particulière au fonctionnement de ce service
- Avoir un environnement propice pour la préparation de milieux de culture des réactifs et la stérilisation
- D'accorder une attention particulière au laboratoire de Mycobactérie
- D'élaborer un plan stratégique pour le développement du laboratoire de la tuberculose.

➤ AU PNLT

- Veiller à l'utilisation rationnelle des moyens mis à la disposition du LNR
- Continuer à assurer la formation des personnels en mycobactériologie et surtout veiller à un temps suffisant pour la formation
- Continuer à assurer une supervision régulière et permanente

➤ AU LNR

- Assurer une formation régulière des techniciens
- Assurer un suivi régulier des échantillons mis en cultures
- Eviter la rupture de milieu de culture
- Avoir une bonne organisation du travail au sein du LNR et créer une atmosphère de bonne camaraderie

BIBLIOGRAPHIE

1) Albert J.P., Menanio M., Rétif M.

Résultats des antibiogrammes pratiqués sur les mycobactéries isolées au centre Munaz en 1967. *Med-Af Noire*.

2) AUDIGIER P. (5).

Techniques biologiques récentes pour le diagnostic des infections à mycobactéries- la presse médicale, 1995. 25, 14 : 601-70.

3) Article Wikipédia, l'encyclopédie libre

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Phtisie> du 15/05/2008

4) BÂ A.

Nouvelle contribution à l'étude de la résistance primaire du bacille tuberculeux au Mali. Thèse Pharm. Bamako 1989. N°18.

5) BOULAHBAL F., CHAULET P.

La tuberculose en Afrique épidémiologie et mesures de lutte. *Med Trop* 2004; **64** : 224-228

6) Boni A.M.L.

Climat social dans l'univers carcéral. Une étude de cas à la prison de Yopougon. Mémoire de sociologie Abidjan 1988, N°6749.

7) Cannetti G., Rist N., GROSSET J.

Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions: méthodologie, critères de -résistances, résultats, interprétation. *Rev Tuber Pneumol* 1963 j 27 : 217-272.

8) Christian Bleux chargé de recherche CNRS

Evaluation et prévention des risques biologiques en laboratoire de recherche. Mars 2009 p1-42

9) COMSTOCK G.W.

Epidemiology of tuberculosis. *Am. Respir.Dis.* 1982, 125:8-15.

10) Cours de Mycobactériologie Médicale et de Formation aux Techniques de Mycobactériologie

Tests de sensibilité aux antituberculeux et dosages sériques de l'INH et la Rifampicine. Alger 4 - 24 avril 2004

11) DAFTE M.

Structure de l'enveloppe de Mycobacterium tuberculosis. Med, Mal, inf, 1996. 26 :891-7.

12) DIARRA B.

Étude des connaissances, des attitudes et pratiques comportementales de la population générale de Bamako face à la tuberculose- thèse méd, 2005-91P. ; 60N°60

13) Diguimbaye C.

La tuberculose humaine et animale au Tchad : contribution à la mise en évidence et caractérisation des agents causaux et leur implication en santé publique. 2004.165 p123-125

14) DONALD E. et coll.

GUIDE DE LA PTUBERCULOSE POUR LES PAYS À HAUTE PREVALENCE 2^{ème} édition 9P.

15) FLANDROIS J.P.

Mycobacterium tuberculosis : Bactériologie médicale collection AZAY, presse universitaire de Lyon 1997, P : 152-157.

16) GROSSET J., BOISVERT M.

Le bacille de Koch. L'objectif médical. Ed-Afri- Noire Francophone1987. , 47 : 42-64.

17) GROSSET J.

Place des examens microbiologiques et anatomopathologiques dans la décision diagnostique et thérapeutique. Med. Mal. Inf. 1995. 25 : 327-333.

18) GROSSET J., BOISVERT H., TRUFFOT-PERNOT C.H.

Mycobactéries ; bactériologie médicale 2^e édition chapitre 48. 966P.

19) GROSSET J. et coll.

Mycobactéries : Bactériologie médicale 2^e édition chp 48, 968P.

20) Institut Pasteur. (Division diagnostique).

Les mycobactéries : recherche, identification, antibiogramme, 1995 ; P-3-11.

21) KAZE A.F

Etude bibliographiques de la tuberculose au Mali de 1982 -2003

Thèse med 2003

22) Kent P.T., Kubica G.P.

Public Health Mycobacteriology : a Guide for the level III laboratory. US Department of Health and Human Services, Centers for Diseases Control, Atlanta 1985.

23) KUBICA G.P., GROSS W.M., HAWKINS J.E., et coll.

Laboratory. Services for Mycobacterial diseases. AM. REV. Respir. Dis., 1975; 112: 773-787.

24) LACUT J.Y., DUPONT M., et PATY M.C..

« Tuberculoses extrapulmonaires ». Revue et possibilité de diminution de délais d'intervention thérapeutique. Med. Mal. Inf. 1995,25 (3) : 304.

25) Macondo E.A., Ba F., Toure-Kane N.C. et coll.

Amélioration du diagnostic de la tuberculose par le Mycobacteria Growth Indicator tube (MGIT) dans un laboratoire de pays en développement. 2000. 4. 1-2

26) Meyer L., HUGO D.

Mycobactériologie en santé publique centre national de référence pour la tuberculose et mycobactéries. Institut Pasteur ; Paris. 1980.

27) MOKHTART (2).

Les méthodes simplifiées du diagnostic bactériologique de la tuberculose - Rev Alger des sciences médicale 1983 ; 7 : 1-135.

28) OMS Info

Anonyme tuberculose dans les populations réfugiées. 2^e édition 1997: 12-13.

29) Paramasivan C.N., Narayana A.S.L., Prabhakar R., et coll.

Indian Council of Medical Research Tuberculosis Research Cent/e, Madras-600 031, India

30) PARROT R., BRAUM J., GALLAR J.P., SUR H. et coll.

Les mycobactérioses pulmonaires à *Mycobacterium xenopi* à propos de 50 cas, éléments de diagnostic. Rev. Fr. Mal. Resp. 1979. 7 : 501-503.

31) PICHARD D.E. et coll.

Tuberculose : maladies infectieuses 2002 FMPOS/

32) P.N.L.T

Rapport annuel d'activités du Programme National de Lutte contre la Tuberculose (PNLT) Mali année 2007

33) Professeur Pierre Aubry.

La tuberculose à l'heure du Sida. Actualités 2004.

http://medecinetropicale.free.fr/cours/tuberculose_et_sida.htm

34) Programme national de lutte contre la tuberculose au Mali.

Guide technique pour les personnels de santé. 1999.

35) Règles de travail en mycobactériologie

<http://www.Membres.lycos.fr/microbio/systematique/mycobacteries.htm-62K> 17/04/09

36) RIEDER H.L., DEUN A.V., KAM K.M., et coll.

Priorités pour les services de bactériologie de la tuberculose dans les pays à faibles revenus

Deuxième édition 2007 P. 3 - 11

37) SANAGO N'F.

Étude de la résistance aux antituberculeux des souches de bacilles hébergées par les malades tuberculeux dans le district de Bamako ; thèse pharm. Bamako 1996.N°21.

38) SISSOUMA B.

Contribution à l'étude bactériologique de la tuberculose pulmonaire à Bamako thèse Pharm N° 53.

39) TANGARA D.

État de sensibilité aux antibiotiques antituberculeux des souches de bacilles hébergées par les malades tuberculeux en traitement à Bamako 1990. 124 p. N°29 A 15.

40) TOKO T.L.

Echec du traitement antituberculeux au Mali de 2000 à 2003. Thèse méd ; Bamako, 2005-64P. 48.

41) TRAORÉ S.

Étude épidémiologique, clinique et économique des patients sidéens et des cas de SIDA tuberculeux hospitalisés dans les 3 hôpitaux de Bamako juillet 1994 en décembre 1996. thèse de méd 1996.N°16.

42) U.I.C.T.M.R

Recommandation de l'U.I.C.T.M.R concernant la chimiothérapie antituberculeuse- Bull U.I.C.T, 1983.58 :2-166.

43) Underner M., Meurice J.C.

Tuberculose pulmonaire et primo-infection tuberculeuse.

La revue du praticien, paris 1999,49 ; pneumologie B 96, p : 867-876

44) WHO, Global tuberculosis control 2007 : key findings

(http://www.who.int/tb/publications/global_report/2007/key_findings/en/index.html) du 15/05/2008

ANNEXES

ANNEXES 1

QUESTIONNAIRE DE CULTURE

Date de mis en culture /____/____/____/

Numéro de laboratoire /_____/

Provenance /_____/

Sexe /____/ F /____/ M

Age /_____/

Date de recueil du crachat

/____/____/____/

Résultat de la bacilloscopie /_____/

0= Négatif 1= positif 1+ 2= positif 2+ 3= positif
3+ 4= faiblement positif

Motif de l'examen /____/ Nvx

/____/ S2 /____/ S3

/_____/ S7
/_____/ Sup à S8
/_____/ S5

Résultat de la culture tube N°1
/_____/ N /_____/ P /_____/ C

Résultat de la culture tube N°2
/_____/ N /_____/ P /_____/ C

C= Contaminé N= Négatif P= Positif

ANNEXES 2

Questionnaire pour le directeur de l'INRSP

1. Pouvez-vous nous donner un aperçu sur l'historique du LNR que vous dirigez ?

.....
.....

2. Est ce que le LNR rentre dans les activités prioritaires de votre institut ?

OUI ____/ NON ____/

3. Y a t il une ligne budgétaire de l'institut pour le LNR ?

OUI ____/ NON ____/

4. Comment s'effectue l'approvisionnement ?

.....

5. Est-ce que le suivi du laboratoire est Fait ? OUI

____/ NON ____/

_ Si oui, par qui ?

.....

Est-t-il régulier ? OUI ____/ NON ____/

6. Comment le suivi s'effectue ? Journalier

/____/ Hebdomadaire /____/

Mensuel /____/ Trimestriel /____/ Semestriel /____/ Annuel

/____/

7. Est ce que le labo a été évalué après le démarrage de la culture ? OUI ____/ NON ____/ 8. le compte rendu est il

disponible OUI ____/ NON ____/

9. Y a-t-il des dispositions prises pour la résolution d'éventuelles recommandations ?

OUI ____/ NON ____/

10.

Lesquelles ?.....

.....

ANNEXES 3

Questionnaire pour le préparateur de milieu pour la culture des BK

1. L'environnement de votre salle est elle propice pour la préparation ?

OUI ____/ NON ____/

2. Avez-vous assez de ressources humaines pour faire face à votre tâche ?

OUI ____/ NON ____/

3. Votre matériel technique est il au complet ?

OUI ____/ NON ____/

4. Avez-vous une bonne dotation en milieux, produits et réactifs de labo ?

OUI ____/ NON ____/

5. comment s'effectue la préparation du milieu pour la culture ?

.....
.....

6. Arrive-t-il que vous travaillez avec de milieux périmés

OUI ____/ NON ____/

7. Le milieu est il contaminé avant l'utilisation ?

_ OUI ____/ NON ____/

8. combien de temps fait vous pour préparer le milieu ?

.....

9. combien de personnes participent à la préparation du milieu ?

1 /____/ 2 /____/ 3 /____/ ou plus /____/

10. le control du PH est il fait ?

OUI ____/ NON ____/

11. si oui comment.....

ANNEXES 4

QUESTIONNAIRE PERSONNEL LNR

01. Personnel

Quel est le nombre et la qualification du personnel : Nombre
/___/

Qualifications : Médecins /___/ Biologistes /___/
Pharmaciens /___/

Assistants médicaux /___/ Techniciens /___/ Personnel de
surface /___/

Le laboratoire dispose t'il d'un technicien de surface ? Oui
/___/ Non /___/

Existe-t-il un plan de formation des techniciens ? Oui
/___/ Non /___/

Combien de jours travaillez-vous par semaine.....

Quelle est l'heure d'ouverture du laboratoire.....

02 Bâtiment

Condition du bâtiment.....

Approvisionnement en eau et électricité.....

Nombre de pièces techniques (niveau).....

Possibilité de communication
Oui /___/ Non /___/

03. Biosécurité

Type de hotte utilisé: Class I /___/ Class II /___/ Class III/___/

Le personnel utilise t'ils des moyens de protection
Oui /___/ Non /___/

Sont ils formés en biosécurité
Oui /___/ Non /___/

Quelles sont les conditions de biosécurité qui sont respectées.....

.....

Existe-t-il des équipements de sécurité
Oui /___/ Non /___/

Comment les déchets sont éliminés :

.....

L'aération du laboratoire est elle contrôlée ? Oui /___/
Non /___/

Existe-t-il un document en biosécurité
Oui /___/ Non /___/

04. prélèvement et Hygiène

Les procédures de prélèvement sont elles respectées Oui
/___/ Non /___/

La qualité des prélèvements est elle mentionnée à la réception
Oui /___/ Non /___/

Les crachoirs sont ils tous fermés à l'ouverture du carton ? Oui
/___/ Non /___/

La collecte et le transport sont il assurés
Oui /___/ Non /___/

Devenir des prélèvements.....

05. Equipement

a.% d'équipement disponible

b.% de réactif disponible pour la culture

c.% de réactif disponible pour la bacilloscopie

06. Réactifs - milieu de culture et approvisionnement

Quels types de milieux utilisez vous: Préparation maison
/___/ ou prêt à l'emploi /___/

Quels types de réactifs utilisez vous: Préparation maison
/___/ ou prêt à l'emploi /___/

Quelle est la structure qui vous approvisionne

Satisfaction dans les commandes à 80 % ou plus /___/ 79 à 50 %
/___/ moins de 50% /___/

Comment sont gérés les réactifs au niveau du
laboratoire:.....

Disposez-vous de fond pour les intrants Oui /___/ Non /___/

Avez-vous déjà utilisez des réactifs périmés /Oui /___/ Non /___/

Disposez-vous de milieu de transport ? /Oui /___/ Non
/___/

Si oui le quel.....

Disposez-vous de colorants spécifiques Oui /___/ Non /___/

Si oui les quels.....

07. Les examens réalisés

Quels sont les examens réalisés :

- Bacilloscopie par le microscope à lumière blanche
Oui /___/ Non /___/

- Bacilloscopie par le microscope à fluorescence
Oui /___/ Non /___/

- Culture des Mycobactéries
Oui /___/ Non /___/

- Test de sensibilité aux antituberculeux Oui
/____/ Non /___/

- Identification des Mycobactéries Oui
/____/ Non /___/

- Détection des mycobactéries par Bactec Oui
/____/ Non /___/

- Biologie moléculaire (PCR) Oui
/____/ Non /___/

- Détection des mycobactéries par MGIT Oui
/____/ Non /___/

- Test VIH Oui
/____/ Non /___/

08. Condition de réalisation des tests

Existe-t-il une planification de réalisation des examens
Oui /____/ Non /___/

La bacilloscopie est elle faite tous les jours
Oui /____/ Non /___/

La culture est elle faite tous les jours
Oui /____/ Non /___/

09. Qualité

Qualité du formulaire de demande de culture.....

Qualité du registre.....

Disposez vous de matériel et réactifs pour la bacilloscopie ? Oui /___/ Non /___/

La quantité est elle suffisante pour 6 mois ? Oui /___/ Non /___/

Disposez-vous de matériel et réactifs pour la culture ? Oui /___/ Non /___/

La quantité est elle suffisante pour 1 an ? Oui /___/ Non /___/

Disponibilité de réactifs et milieux pour test de sensibilité Oui /___/ Non /___/

Les procédures d'analyse sont elles écrites et disponibles Oui /___/ Non /___/

Quels sont les contrôles de qualité interne réalisés ?.....

.....

.....

Participer vous à un contrôle de qualité externe Oui /___/ Non /___/

Comment assurez-vous la maintenance préventive.....

.....

Qui assure la réparation et réglage d'appareils.....

Les documents et les pièces détachées sont t'ils disponibles Oui
/____/ Non /___/

Les relevés de température sont ils disponibles
Oui /____/ Non /___/

10. Rapports

Les rapports d'activités sont ils archivés
Oui /____/ Non /___/

Le laboratoire est il supervisé
Oui /____/ Non /___/

LNR collabore-t-il avec d'autres laboratoires Oui /____/ Non /___/

FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : TOURE

Prénom : Fatoumata M.

Nationalité : Malienne

Date de soutenance : 2009

Ville de soutenance : Bamako

Titre : Problématique de la mise en œuvre de la culture du bacille de Koch dans le Laboratoire National de Référence du Mali.

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie.

Résumé

Ce travail avait pour but d'évaluer les problèmes liés à la mise en œuvre de la culture au LNR. Notre étude s'est déroulée de Juin à Décembre 2009.

Pour atteindre cet objectif nous avons effectué une étude prospective portant sur l'état des lieux, ainsi que sur les échantillons de crachat positifs et négatifs provenant des structures sanitaires de prise en charge des personnes infectées de la tuberculose ainsi que le LNR, L'étude a porté sur 200 prélèvements qui ont tous bénéficié d'une mise en culture sur deux milieux de Loweinstein Jensen.

Au terme de notre étude nous avons noté un manque de personnel, de matériel et de réactifs.

Aussi nous avons obtenu 145 tubes positifs, 219 négatifs et 36 contaminés à la culture sur les 400.

Ceci nous amène à affirmer que la contamination est élevée en rapport avec la norme OMS qui est de 5%.

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence des maîtres de la faculté, des
conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes
condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de
mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant
fidèle à leur enseignement ;

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma
profession, avec conscience et de respecter non seulement
la législation en vigueur mais aussi les règles de
l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs
envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes
connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et
favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle
à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes
confrères si j'y manque.

Je le jure !