

REPUBLIQUE DU MALI

Un peuple - un but - une foi

ECOLE NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI

Année 1980

N° 2

ASPECTS BACTERIOLOGIQUES DE LA TUBERCULOSE PULMORAIRE A BAMAKO

MEMOIRE

Présenté et soutenu publiquement le.....1981
devant l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie du Mali
par : *Bamane SINGARE*
pour le Diplôme de Pharmacien
(Diplôme d'Etat)

Examineurs :

Président	Professeur Jean DUVAL
Membres	Professeur Souleymane SANGARE
	Docteur Karim SANGARE
	Docteur Bréhima KOUMARE

ECOLE NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI
=====

ANNEE ACADEMIQUE : 1979 - 1980

Directeur Général	: Professeur Aliou BA
Directeur Général Adjoint	: Professeur Bocar SALL
Secrétaire Général	: Monsieur Godefroy COULIDALY
Econome	: Monsieur Dioncounda SISSOKO
Conseiller Technique	: Professeur Agrégé Philippe RANQUE

PROFESSEURS MISSIONNAIRES

Professeur Sadio SYLLA	: Anatomie-Dissection
- Francis MIRANDA	: Biochimie
- Michel QUILICI	: Immunologie
- Humbert GIONO-DARBER	: Pharmacodynamie
- Jacques JOSSELIN	: Biochimie
Docteur Bernard LANDRIEU	: Biochimie
- Gérard TOURAME	: Psychiatrie
- Jean DELMONT	: Santé Publique
- Boubacar CILSE	: Toxicologie-Hydrologie
- Mme P. GIONO-DARBER	: Anatomie-Physiologie Humaines
- Mme Thérèse FARES	: Anatomie-Physiologie Humaines

PROFESSEURS-TITULAIRES-RESIDANT A DAMAKO

Professeur Aliou BA	: Ophtalmologie
- Docar SALL	: Anatomie-Orthopédie-Traumatologie-Sécourisme
- Mamadou DEMBELE	: Chirurgie générale
- Mohamed TOURE	: Pédiatrie
- Souleymane SANGARE	: Pneumo-Phtisiologie
- Mamadou KOUMARE	: Pharmacologie-Matière Médicale
- Mamadou-Lamine TRAORE	: Gynécologie-Obstétrique-Médecine Légale
- Aly GUINDO	: Gastro-Entérologie
- Abdoulaye AG-RHALY	: Médecine Interne
- Sidi Yaya SIMAGA	: Santé Publique
- Siné DAYO	: Histologie-Embryologie-Anatomie Pathologique
- Pierre SAINT-ANDRE	: Dermatologie-Vénérologie-Léprologie
- Philippe RANQUE	: Parasitologie
- Bernard DUFLO	: Pathologie Médicale-Thérapeutique-Physiologie
- Robert COLOMAR	: Gynécologie-Obstétrique
- Oumar COULIBALY	: Chimie Organique
- Adama SISSOKO	: Zoologie
- Amadou Baba DIALLO	: Physique
- Bouba DIARRA	: Microbiologie

ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Docteur Abdel Karim KOUMARE	: Anatomie-Chirurgie
- Bréhima KOUMARE	: Bactériologie
- Abderhamane Sidèye MAIGA	: Parasitologie
- Sory KEITA	: Microbiologie
- Yaya FOFANA	: Microbiologie-Hématologie
- Sory Ibrahima KADA	: Santé Publique
- Moctar DIOP	: Sémiologie Chirurgicale
- Balla COULIDALY	: Pédiatrie - Médecine du Travail
- Bénitiéni FOFANA	: Obstétrique
- Boubacar CISSE	: Dermatologie

Docteur Yacouba COULIBALY : Stomatologie
 - Sanoussi KONATE : Santé Publique
 - Issa TRAORE : Radiologie
 - Mamadou Koréïssi TOURE : Sémiologie Cardio-Vasculaire
 - Mme SY (Assitan) SOW : Gynécologie

CHARGES DE COURS

Docteur GAUCHOT : Microbiologie
 - Gérard TRUSCHEL : Anatomie-Sémiologie chirurgicale
 - Boukassoum HAIDARA : Galénique-Diététique-Nutrition
 - Philippe JONCHERES : Urologie
 - Hamadi Mody DIALL : Chimie Analytique
 - Mme Brigitte DUFLO : Sémiologie Digestive
 - Mme KEITA O. DA : Biologie Animale
 - Cheick Tidiani TANDIA : Hygiène du Milieu

Professeur Tiémoko MALLE : Mathématiques
 - Kalilou MAGUIRAGA : Mathématiques
 - N'Golo DIARRA : Botanique-Cryptogamie-Biologie Végétale
 - Abdoulaye DIALLO : Gestion-Législation
 - Souleymane TRAORE : Physiologie générale
 - Daouda DIALLO : Chimie Générale-Minérale
 - Mme GAKOU Fatou NLANG : Anglais
 - Mme Odile VIMEUX : Chimie Analytique.

JE DEDIE CE TRAVAIL.

A MON PERE

A MA MERE

A MES FRERES ET SOEURS

A TOUS LES ONCLES ET TANTES

A TOUS MES AMIS ET CEUX QUI ME SONT CHERS

Qu'ils trouvent ici l'expression de notre profonde
gratitude.

A TOUT LE PERSONNEL DU DISPENSAIRE ANTITUBERCULEUX DE BAMAKO

-"- "- DU SERVICE DE BACTERIOLOGIE DE L'I.N.B.H. A BAMAKO

-"- "- DU SERVICE DE LA TUBERCULOSE DE L'INSTITUT PASTEUR DE PARIS

-"- "- DU SERVICE DE BACTERIOLOGIE DU C.H.U. PITIE SALPETRIERE PARIS

Qu'ils trouvent ici l'expression de notre profonde
gratitude pour leur esprit de franche collaboration.

...../.....

AU PROFESSEUR ALIOU BA
DIRECTEUR GENERAL DE L'ECOLE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DU MALI
PROFESSEUR D'OPHTALMOLOGIE

AU CORPS PROFESSORAL DE L'ECOLE DE MEDECINE

A TOUTE LA DIRECTION DE L'ECOLE DE MEDECINE

A MONSIEUR LASSANA TRAORE

A TOUS LES ETUDIANTS DE L'ECOLE NATIONALE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DU MALI POINT-"G"

En témoignage de ma reconnaissance

A NOTRE PRESIDENT DE JURY

Monsieur JEAN DUVAL
Professeur de Bactériologie-Virologie
Centre Hospitalo-Universitaire
Pitié Salpêtrière
PARIS .

A travers le Docteur Bréhima KOUMARE, nous avons
su apprécier vos immenses qualités humaines.

Avec l'honneur que vous nous faites de présider
ce mémoire, nous vous prions, de trouver ici, le
témoignage de notre gratitude et l'assurance de notre
respectueux attachement.

A NOTRE MAITRE DE MEMOIRE

Docteur Bréhima KOUMARE
Professeur de Bactériologie à l'E.N.M.P.,
Chef de Service de Bactériologie de l'I.N.BH.

B A M A K O

Vos immenses qualités professionnelles nous
guidé vers la Bactériologie.

Trouvez ici l'expression de notre profonde gratitude

...../.....

AUX MEMBRES DU JURY DE NOTRE MEMOIRE

Monsieur Souleymane SANGARE
Professeur de Pneumophtisiologie
à l'Ecole Nationale de Médecine
et de Pharmacie du Mali.

Nous garderons de vous le souvenir d'un grand
Maître, à l'enseignement de rigueur scientifique.

Veillez trouver ici l'expression de notre
profonde gratitude et soyez assuré de notre in-
défectible attachement.

Monsieur le Docteur Karim SANGARE
Directeur Général de l'Hôpital du Point-"G"

Malgré vos multiples occupations , vous nous
faites l'honneur de compter parmi les membres de
notre Jury .

Soyez en remercié.

- S O M M A I R E -

	P a g e s
I. INTRODUCTION.....	1
II. HISTORIQUE.....	3
III. LUTTE ANTITUBERCULEUSE AU MALI.....	5
1°)- Dépistage.....	5
A. Radiologique.....	5
B. Bactériologique.....	6
C. Organisation et Résultats.....	7
2°)- Traitement.....	10
A. Médicaments antibacillaires.....	10
B. Bases bactériologiques des traitements de la Tuberculose...11	
C. Traitement de la Tuberculose au Mali.....	18
3°)- Prophylaxie.....	19
IV. ETUDE BACTERIOLOGIQUE DU GENRE MYCOBACTERIUM.....	20
I. Examen Microscopique.....	20
II. Culture.....	35
III. Inoculation aux Animaux de Laboratoire.....	50
IV. Caractères biochimiques.....	58
V. Classification.....	69
V. TEST DE SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES.....	73
A. Principe.....	78
B. Choix du test.....	78
C. Préparation des dilutions bacillaires.....	79
D. Lecture des résultats.....	80
E. Critères de résistances.....	83
F. Test d'Inhibition par le T C H.....	84
G. Résultats des tests de sensibilité.....	84
H. Résistance du Bacille Tuberculeux et ses conséquences... 84	
VI. MATERIELS ET METHODES.....	88
A. Matériels.....	89
B. Méthodes bactériologiques.....	90
VII. RESULTATS.....	93
VIII. DISCUSSION.....	95
IX. CONCLUSION.....	97
X. BIBLIOGRAPHIE.....	98

Le Mali est un pays où l'endémie tuberculeuse constitue un problème majeur de Santé Publique . C'est pourquoi le Comité Antituberculeux Malien (C.A.M.) en collaboration avec certains organismes internationaux tels que l'Union Internationale contre la Tuberculose (U.I.C.T.) et l'Organisation pour la Coopération et la Coordination des Grandes Endémies (O.C.C.G.E.) a entrepris une vaste action de lutte contre la tuberculose à l'échelle nationale. Cette lutte se déroule dans des conditions très difficiles :

- Insuffisance d'infrastructure et d'Equipement Sanitaire adéquats
- Insuffisance du Personnel Sanitaire
- Insuffisance des moyens financiers et organisationnels
- Chimiothérapie inadéquate en qualité et en quantité,

Elle exige un programme moderne adapté aux conditions socio-économiques des collectivités. En effet rien ne peut remplacer une organisation structurée de lutte antituberculeuse basée sur le diagnostic des malades cracheurs de bacilles et la mise en place d'un système de traitement standardisé et contrôlé. Ce diagnostic repose sur la mise en évidence des bacilles par :

- l'examen microscopique direct qui ne permet de conclure qu'à la présence de corps bacillaires acido alcool résistants sans préjuger de leur réelle responsabilité (M. Atypiques Saprophytes) et surtout de leur viabilité (élimination de bacilles morts produite par les antituberculeux bactéricides).
- la culture beaucoup plus fiable et qui permet de faire le point sur la physionomie de la maladie, c'est-à-dire l'isolement et l'identification des souches de mycobactéries responsables des lésions tuberculeuses. Elle permet aussi de dégager les applications pratiques de ces nouvelles connaissances, notamment, la mesure de la sensibilité aux drogues antibacillaires, des différentes espèces mycobactériennes, et le taux et la nature de la résistance primaire.

Cette résistance primaire est un concept épidémiologique important. Son taux, faible, indique l'efficacité organisationnelle de la chimiothérapie et qu'elle existe depuis longtemps, fort, il indique que la chimiothérapie de la tuberculose n'est pas ou n'a pas été satisfaisante. Tout se tient en matière de lutte antituberculeuse. Une bonne coordination entre les techniques de détails et les stratégies d'ensemble est nécessaire sinon elle est condamnée à rester stérile. Ce travail essentiellement consacré à la culture, l'identification et la détermination de la sensibilité aux drogues antibacillaires des différentes espèces de Mycobactéries comporte le plan suivant :

- Historique
- Lutte Antituberculeuse au Mali
- Identification des sources d'infection par le diagnostic bactériologique
- Identification des différentes espèces de Mycobactéries isolées à partir des expectorations des tuberculeux pulmonaires
- Mesure de la sensibilité de ces différentes espèces aux drogues antibacillaires
- Matériels et Méthodes
- Résultats
- Discussion
- Conclusion.

...../.....

II. HISTORIQUE

La Tuberculose en tant que maladie a toujours existé depuis les temps anciens. HIPPOCRATE fait mention d'infections broncho-pulmonaires et pleurales parmi lesquelles les Phtisies occupent une place importante. Comme GALIEN d'ailleurs, et plus tard COELUIS AURELIUS, il décrit fort bien cette maladie, en distinguant plusieurs aspects cliniques. Ces descriptions cliniques resteront inchangées jusqu'au début du 19ème siècle, sauf à l'âge rayonnant de l'empire romain ou ARETEE DE CAPPADOCE consacra à la pathologie pleuro-pulmonaire des lignes remarquables. En Europe, à l'époque de la renaissance GIROLAMO FRACASTOR de Vérone a rénové entièrement la notion traditionnelle de phtisie en plaçant celle-ci dans le même cadre que les autres maladies infectieuses. Il est le premier (36) à avoir incriminé les microorganismes dans la pathogénicité et la transmission inter humaine de la maladie. Mais ses lueurs projetées sur l'avenir ne furent qu'éphémères et n'eurent pas de suites immédiates. Les temps n'étaient pas mûrs ni les moyens scientifiques suffisamment développés pour que ces données puissent se préciser, se confirmer, s'étendre. C'est au 19ème siècle qu'on a vu éclore une série de publications qui portent en germe les premiers fruits de la méthode anatomoclinique. C'est le lieu de signaler celle si clairvoyante de GASPARD LAURENT BAYLE " Recherche sur la Phtisie pulmonaire". Il a notamment décrit la granulation miliaire et plusieurs aspects anatomiques de la phtisie tuberculeuse. On était dès lors à la veille d'un tournant décisif dans l'histoire de la tuberculose. Celui-ci a été marqué par l'oeuvre mémorable de THEOPHILE RENE MARIE HYACINTHE LAENNEC " de l'auscultation médiate". Grâce à la mise au point patiente d'un procédé nouveau et adéquat, l'auscultation et par la confrontation méthodique des données qu'elle fournit avec les constatations macroscopiques faites au cours des autopsies, LAENNEC a pu échaffauder, non seulement la phtisiologie, mais l'essentiel de la pneumologie moderne sur des bases anatomocliniques irremplaçables.

En l'absence de toute possibilité de contrôle histologique ou bactériologique, il a affirmé l'unicité du processus tuberculeux à travers des atteintes fort dissimilables en apparence. Le pas franchi est considérable. Il se confirme avec LOUIS en 1825 dans les " Recherches Anatomocliniques sur la Phtisies". Sur le plan expérimental VILLEMIN (1865) a marqué une date mémorable en démontrant par inoculation sous cutanée, aux animaux de laboratoire, de broyats de lésions tuberculeuses, que la maladie est virulente, contagieuse et liée à un germe extérieur à l'organisme. A partir de 1882 ROBERT KOCH franchit l'étape bactériologique avec la découverte du Bacille tuberculeux, et il établit d'une manière définitive et nette la nature infectieuse et la spécificité de la maladie. Il prépare la tuberculine. A partir de 1895 WILHELM CONRAD ROETIGEN découvre les rayons X facilitant le diagnostic de la tuberculose qui prendra dès lors son aspect contemporain. VON FIRQUET en 1907 décrit les réactions cutanées tuberculiques. L'élaboration du vaccin B.C.G. de 1908 à 1921 par CALMETTE et GUERIN marque une étape importante dans la prophylaxie de la maladie. En 1944 WAKSMAN en découvrant la Streptomycine précurseur des nombreux médicaments antituberculeux modernes, inaugure l'ère actuelle de la lutte antituberculeuse. Celle qui permet d'espérer l'éradication totale de la maladie.

...../.....

III. LUTTE ANTITUBERCULEUSE AU MALI

Les progrès scientifiques de ces Vingt dernières années ont amené les mycobactériologistes de Santé Publique à adopter une politique nouvelle en matière de lutte antituberculeuse, tant sur le plan du dépistage de la prophylaxie que du traitement.

1°) DEPISTAGE : Les malades bacillifères constituent la principale source de transmission de la maladie tuberculeuse au sein des collectivités et le but de tout programme moderne de lutte antituberculeuse doit être leur identification et leur traitement. L'identification consiste à les dépister . Ce dépistage peut être :

- . Radiologique
- . Bactériologique
- . Mixte

Il peut être passif ou actif.

D'autres méthodes d'identification existent (Test tuberculinique, examen anatomopathologique etc....) mais pour diverses raisons ne peuvent être considérées comme méthodes d'identification des sources d'infection.

A.- DEPISTAGE RADIOLOGIQUE :

La Radiologie en médecine de l'appareil respiratoire est sans conteste un moyen précieux de dépistage (29) mais sa valeur comme moyen de dépistage de masse de la tuberculose pulmonaire est contestée. Le dépistage radiologique systématique (D.R.S.) s'adresse à toute la collectivité . Il est admis classiquement que toute tuberculose évolutive et contagieuse passe d'abord par un long stade de latence au cours duquel les lésions évoluent lentement à bas bruit sans signes cliniques. A ce stade seul le dépistage radiologique a-t-on dit peut mettre ces lésions en évidence, d'où la nécessité de soumettre régulièrement l'ensemble de la population à cette forme de dépistage précoce.

C'est un procédé coûteux mais justifié ajoute-t-on, car l'on peut dépister ainsi la tuberculose avant la phase de contagion.

...../.....

C'est pourquoi beaucoup de pays ont généralisé le dépistage radiologique systématique à toute la population adulte à intervalles réguliers (un à trois ans),

Des études rapportées à la conférence de New York (36) ont montré que le dépistage radiologique systématique n'avait en fait que peu d'influence sur la transmission de la maladie. Dans les pays où le dépistage radiologique systématique de l'ensemble de la population adulte est effectué tous les trois ans moins de 20 % (36) des tuberculoses évolutives et contagieuses sont découvertes par ce moyen. Une méthode de dépistage aussi coûteuse qui ne permet de mettre en évidence qu'une faible partie des tuberculoses les plus évolutives et les plus contagieuses ne peut être considérée que comme une mesure de rentabilité faible.

B.- DEPISTAGE BACTERIOLOGIQUE

Il est souvent le seul utilisable dans les pays à ressources limitées où l'on pratique la recherche du bacille tuberculeux par l'examen direct dans les expectorations des malades qui toussent et crachent. Ce sont les seules sources de propagation de la maladie, et l'examen bactériologique permet de les identifier. Des études ont prouvé que les malades positifs à l'examen direct des expectorations constituent au sein d'une population (29) :

- les plus dangereux pour le risque infection .

En moyenne ces malades infectent 3 à 5 personnes avant qu'ils ne soient dépistés. En effet des études faites en 1964 en Afrique et en 1967 en Inde (29) ont montré que respectivement 39 % des enfants de 0 à 9 ans et 44 % des enfants de 0 à 14 ans en contact avec un tuberculeux bacillifère sont tuberculino-positifs.

- les plus dangereux pour le risque maladie que court la population.
- les plus dangereux pour eux-mêmes (le pronostic est sombre) et les plus nombreux (77 à 85 % de l'ensemble des cas dépistés selon les pays).

...../.....

Ces différentes considérations font que la microscopie directe est acceptée partout comme la méthode de base pour le dépistage de la tuberculose. Mais l'examen microscopique direct est en défaut dans 15 % des cas il est en cela utilement complété par la culture qui permet de combler cette lacune. De plus la culture est le seul moyen sûr de montrer que les bacilles vus à l'examen direct sont viables (sous l'influence de la chimiothérapie des bacilles morts peuvent être éliminés dans les expectorations) et qu'ils sont effectivement responsables de la tuberculose observée chez le malade (par l'identification) enfin , l'antibiogramme réalisé, permet de choisir le meilleur traitement et d'éviter la sélection de mutants résistants.

C.- ORGANISATION ET RESULTATS

Les responsables de la lutte antituberculeuse au Mali ont mis sur pied un programme de dépistage et de traitement articulé par de nombreux textes administratifs (29) diffusés sur toute l'étendue du territoire en vue d'une large information du corps médical devant participer au fonctionnement de ce programme. En ce qui concerne le dépistage, la lettre circulaire n°2601 du 17 Octobre 1970 stipule notamment que : la découverte de bacilles dans les crachats doit être le principal sinon l'unique critère de diagnostic et de mise en traitement des patients. Neuf ans après la mise en route de ce programme les constatations suivantes sont enregistrées.

1°) La participation des formations sanitaires au dépistage est insuffisante selon le rapport $R_1 = \frac{\text{Nombre de formations participant au dépistage}}{\text{Nombre total des formations remplissant les critères définis}} \times 100$ (29)

...../.....

à Bamako	R_1	= 73 %
à Sikasso	R_1	= 54 %
à Ségou-Markala	R_1	= 91 %
à Mopti	R_1	= 57 %
à Gao	R_1	= 62 %

2°) Ces formations sanitaires ont assuré de façon très irrégulière la couverture des populations relevant de leur rayon d'action. Selon le rapport R_2 = Nombre de consultants externes X 100 sur nombre total de la population couverte (29)

Bamako	: R_2	= 22 %
Sikasso	: R_2	= 23 %
Ségou-Markala	: R_2	= 57 %
Mopti	: R_2	= 17 %
Gao	: R_2	= 52 %

3°) La sélection des suspects par l'interrogatoire dans le cadre du dépistage a été selon le rapport R_3 = Nombre de tousseurs X 100 sur nombre total de consultants (29)

Pour Bamako	de 12 %
-"- Sikasso	9 %
-"- Ségou-Markala	19 %
-"- Mopti	10 %
-"- Gao	11 %

...../.....

4°) L'efficacité des laboratoires appréciée par le rendement de l'examen bactériologique (pourcentage du nombre de crachats positifs par rapport au nombre de crachats examinés) est satisfaisante d'après le rapport $R_4 = \text{Nombre de crachats positifs} \times 100 \text{ sur nombre totale de crachats examinés}$ (29) .

Banako $R_4 = 18 \%$

Sikasso $R_4 = 29 \%$

Ségou-Markala : $R_4 = 20 \%$

Mopti : $R_4 = 11 \%$

Gao : $R_4 = 34 \%$

5°) La microscopie préconisée par les directives nationales comme devant être l'examen prioritaire pour le dépistage de la tuberculose n'a été utilisée que dans 16,3 % de l'ensemble des cas dépistés à l'échelle nationale :

Sikasso 3,6 %

Ségou-Markala 33,3 %

Mopti 18,6 %

Gao 14,1 %

Au niveau du Dispensaire antituberculeux de Banako les suspects subissaient un dépistage mixte (Bactériologique et Radiologique) systématique

6°) La très grande majorité des malades dépistés l'ont été par des médecins (29) . La participation au dépistage de l'ensemble des infirmiers responsables des dispensaires antituberculeux (D.A.T.) et des dispensaires généraux a été de 29,9 % . Les autres (infirmiers des Grandes Endémies, personnel des P.M.I. , Sage-Femmes des Maternités) ont une participation presque inexistante.

Ces différentes constatations montrent une mauvaise intégration du dépistage de la tuberculose dans les activités de routine des formations sanitaires au niveau national. Celle-ci a pour conséquence directe une mauvaise appréciation de l'incidence de l'endémie tuberculeuse.

2°/ TRAITEMENT :

a) Les médicaments antibacillaires :

Il existe actuellement treize drogues pour le traitement de la tuberculose, d'inégale valeur.

Deux sont des thérapeutiques majeures

- . Rifampicine
- . Isoniazide

Quatre sont doués d'une bonne efficacité :

- . Streptomycine
- . Ethambutol
- . Ethionamide ~~et~~ Prothionamide

Les Sept autres sont des antituberculeux mineurs.

- . Acide para-amino-Salicylique (PAS)
- . Viomycine
- . Kanamycine
- . Cyclosérine
- . Pyrazinamide
- . Capréomycine
- . Thiosemicarbazone (thiacetazone ,TB₁)

La plupart de ces antibiotiques peuvent être bactéricides in vitro à l'exception toutefois du PAS et de la thiosemicarbazone. Mais leur hiérarchie est établie en tenant compte aussi des phénomènes de résistance du bacille tuberculeux, à ces divers produits ainsi que des propriétés pharmacocinétiques de ceux-ci.

b) Bases bactériologiques des traitements de la tuberculose (23)

- Les différentes populations bacillaires des lésions tuberculeuses.

La tuberculose est le modèle classique des maladies infectieuses à bactéries à multiplication intracellulaire. Il ne faut pas, pour autant, croire que les bacilles restent intracellulaires tout au long de la maladie.

Après avoir été phagocytés par les macrophages et s'être plus ou moins multipliés en leur sein, ils en sont en effet libérés par la nécrose caséuse. Dans la nécrose caséuse, en raison de la présence de substances toxiques d'origine tissulaire et d'une faible teneur en oxygène, ils ne trouvent pas de conditions favorables à leur multiplication. Celles-ci ne sont réunies que dans l'éventualité du ramollissement de la nécrose caséuse et de son évacuation par les bronches, qui conduit à la formation de la caverne tuberculeuse. Tapissée d'une mince couche de caséum liquéfié et bien oxygénée par l'intermédiaire de sa bronche de drainage, la caverne permet aux bacilles de se multiplier abondamment. Certains d'entre eux assainiront, seront phagocytés par les macrophages qui se caséifieront et à leur tour de nouvelles lésions tuberculeuses se forment.

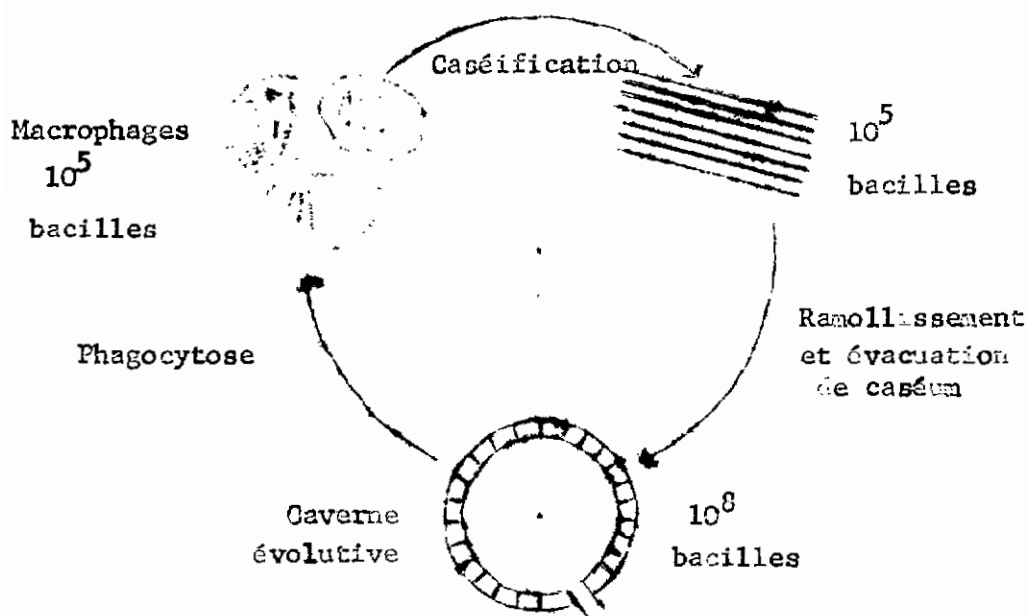


FIG.: I
Les populations bacillaires dans les lésions de la tuberculose humaine.

Au sein des lésions tuberculeuses on peut individualiser trois populations bacillaires distinctes :

- la première , est la population des bacilles qui se multiplient activement à pH neutre, dans les parois des lésions caseuses ramollies et évacuées, les cavernes. Cette population atteint couramment 100 millions (10^8) bacilles.

- la deuxième est la population des bacilles phagocytés par les macrophages. Etant dans un environnement acide et subissant l'effet de nombreuses enzymes, ces bacilles ont une multiplication ralentie. Leur nombre n'excède certainement pas 10^4 à 10^5 bacilles.

- la troisième population est constituée par les bacilles extracellulaires présents dans les foyers caseux solides. Bien qu'à pH neutre, ces bacilles ont une multiplication fortement ralentie, voire intermittente en raison notamment des mauvaises conditions d'oxygénation. Leur taux dépasse rarement 10^4 à 10^5 bacilles.

- Efficacité des principaux antibiotiques antituberculeux

in Vitro, dans un tube de milieu de culture on peut étudier le comportement de bacilles tuberculeux mis en présence de concentrations d'antibiotiques identiques à celles qui sont réalisées in Vivo. Ce comportement permet d'apprécier l'activité des différents antibiotiques. Certains antibiotiques tuent une grande partie des bacilles. On dit qu'ils sont bactéricides ; c'est le cas de la streptomycine, de l'Isoniazide et de la Rifampicine. D'autres qui sont dits bactériostatiques, ont surtout comme effet d'arrêter la multiplication des bacilles ; c'est le cas de l'ethambutol (Dexambutol, Myambutol) et du PAS. D'autres enfin n'ont pas d'effet dans un milieu de culture à pH neutre ; c'est le cas du Pyrazinamide (Piraldina). L'étude in vitro donne donc des renseignements précis sur l'activité respective des principaux antibiotiques antituberculeux.

Au cours de la tuberculose humaine, malheureusement, les bacilles ne se comportent pas tous comme dans un tube de milieu de culture. Seuls ceux qui forment l'importante population à multiplication active dans les parois cavitaires peuvent être assimilés aux bacilles cultivés *in vitro*. La streptomycine, l'isoniazide et la Rifampicine sont donc les antibiotiques les plus efficaces sur ces bacilles. Les autres qui forment les deux populations à multiplication ralentie, répondent très différemment aux antibiotiques, ainsi le pyrazinamide, l'isoniazide et la rifampicine sont les plus efficaces sur les bacilles qui sont dans un environnement acide à l'intérieur des macrophages tandis que seule^{la} rifampicine est efficace sur les bacilles à multiplication ralentie au sein des foyers caséux.

TABLEAU n° I
ACTIVITE DES PRINCIPAUX ANTIBIOTIQUES ANTITUBERCULEUX SELON
L'ETAT METABOLIQUE DES BACILLES (24)

ANTIBIOTIQUES	ACTIVITE SUR LES BACILLES		
	à Multipli- cation active	à Ph acide	à pH neutre
STREPTOMYCINE	+++	0	0
ISONIAZIDE	++	+	0
RIFAMPICINE	++	+	+
ETHAMBUTOL	±	±	0
PYRAZINAMIDE	0	++	0

+, ++, +++ = activité bactéricide d'intensité croissante

± = activité bactériostatique

0 = pas d'activité.

- La conduite du traitement antibiotique

Le traitement antituberculeux doit assurer la destruction la plus rapide et la plus totale possible de tous les bacilles présents dans les lésions.

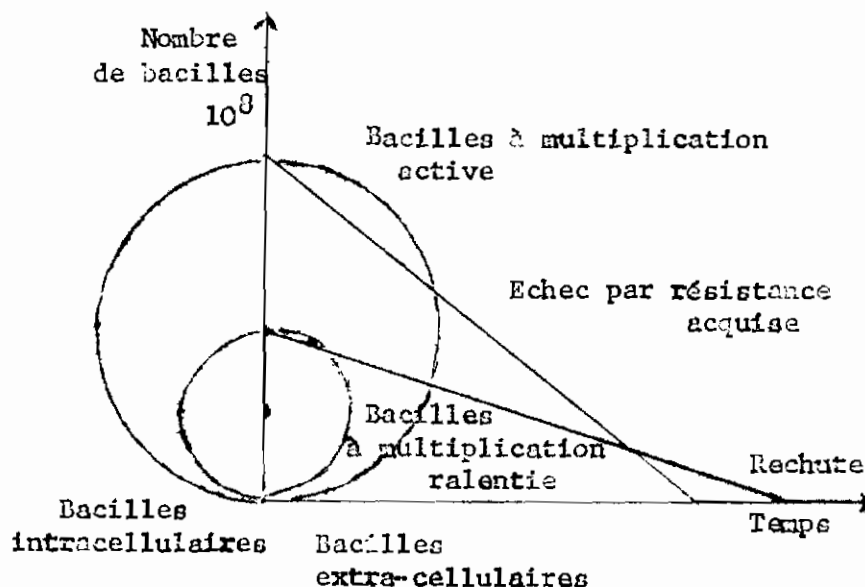


FIG.:2
Illustration du traitement de la tuberculose.

Les premiers à détruire sont ceux qui forment la population à multiplication active dans les parois caséuses des cavernes. En raison de sa richesse, cette population contient d'emblée des mutants résistant aux antibiotiques dont la sélection conduirait à l'échec thérapeutique par résistance acquise. Un des premiers objectifs du traitement doit donc être d'éviter la sélection des mutants résistants. On atteint ce objectif en administrant simultanément plusieurs antibiotiques auxquels les bacilles sont sensibles également en raison de sa richesse, mais aussi de sa situation dans la couche caséuse superficielle de la paroi cavitaire, la population bacillaire à multiplication active est responsable de la présence des bacilles dans l'expectoration des malades et par conséquent de la contagiosité des tuberculeux. Un autre objectif du traitement doit donc être de négativer au plus tôt l'expectoration des malades. On y parvient en administrant non seulement plusieurs antibiotiques, mais les antibiotiques les plus bactéricides sur les bacilles à multiplication active.

Comme la destruction des bacilles ne s'opère pas immédiatement et que le risque de sélection des mutants résistants dure tant que la taille de la population bacillaire n'est pas fortement réduite, l'antibiothérapie doit rester bactéricide et rigoureusement associée pendant plusieurs semaines en pratique jusqu'à la négativation de l'expectoration. Les bacilles à multiplication ralentie ne posent pas les mêmes problèmes thérapeutiques. Etant en nombre relativement limité, ils ne contiennent pas de mutants résistants et ne font donc courir aucun risque de résistance acquise aux antibiotiques. Mais comme ils se multiplient au ralenti ou d'une manière intermittente, la majorité des antibiotiques ont sur eux une activité bien moins puissante que sur les bacilles à multiplications active. Ils peuvent donc persister au sein des lésions et être à l'origine des rechutes (à bacilles sensibles). Pour éviter les rechutes, il faut donc administrer soit un traitement particulièrement actif sur les populations bacillaires à multiplication ralentie. Pour illustrer le mécanisme bactériologique des traitements de la tuberculose nous analyserons à la lumière des conceptions précédentes l'efficacité de deux types de traitement, le premier qui est le traitement classique à base d'isoniazide et de streptomycine et le second, le traitement moderne à base d'isoniazide et de rifampicine.

. Efficacité du traitement classique à base d'Isoniazide et de Streptomycine.

Chez un tuberculeux, traité par l'association isoniazido streptomycine on peut considérer (24) que les deux antibiotiques administrés sont bactéricides sur les bacilles à multiplication active. La négativation de l'expectoration doit donc être obtenue rapidement et régulièrement à condition que les deux antibiotiques soient administrés quotidiennement pendant les premiers mois du traitement. Mais sur les bacilles à multiplication ralentie, la streptomycine est totalement inactive et l'isoniazide partiellement. L'élimination des bacilles à multiplication ralentie sera donc principalement assurée par les défenses naturelles de l'organisme sous la protection d'un traitement prolongé par l'isoniazide.

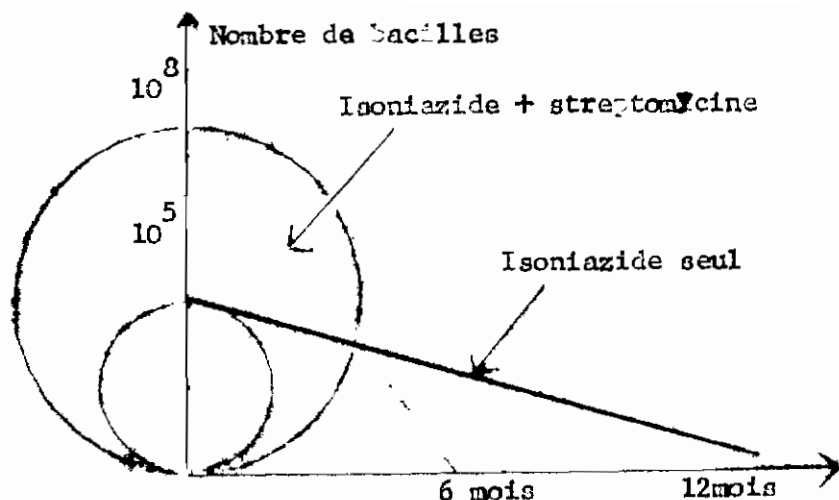


FIG. 3.

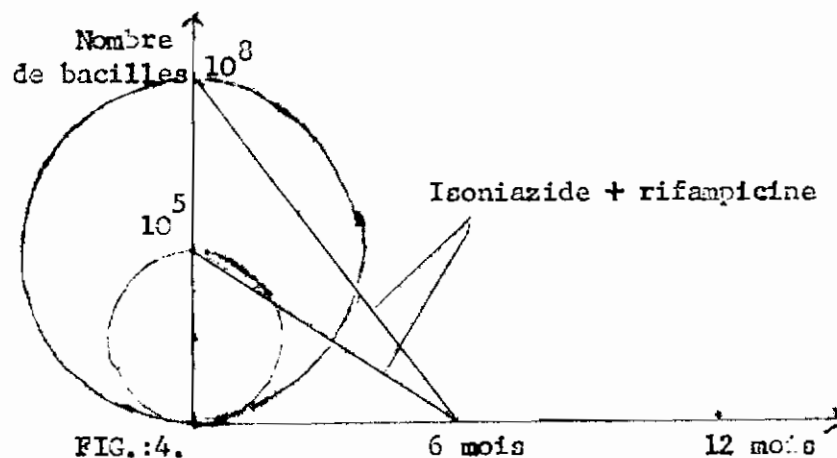
Traitement de la tuberculose par isoniazide plus streptomycine

L'expérience clinique confirme pleinement ces considérations théoriques. Par exemple, dans une enquête récente effectuée en Afrique orientale (24) un traitement de six mois par l'Association Isoniazide Streptomycine donne près de 100 % de négativations de l'expectoration, mais 30 % de rechutes. Si l'administration d'Isoniazide est poursuivie jusqu'au 18^{ème} mois, le pourcentage des rechutes tombe à 4 %.

Efficacité du traitement moderne à base d'Isoniazide et de Rifampicine.

L'Isoniazide et la Rifampicine sont bactéricides sur les bacilles à multiplication active. Tous deux sont également actifs, bien qu'à un moindre degré, sur les bacilles à multiplication ralentie à l'intérieur des macrophages. La rifampicine est, en plus, active sur les bacilles à multiplication ralentie à l'intérieur des foyers caséux. Sous traitement par l'Isoniazide et Rifampicine, les populations bacillaires doivent donc être détruites en un laps de temps beaucoup plus court que sous traitement par l'isoniazide et la streptomycine.

...../.....



Traitement de la tuberculose par isoniazide plus rifampicine

Les travaux récents (7,8) confirment parfaitement cette notion puisqu'ils montrent qu'un traitement de six mois par l'association Isoniazide plus rifampicine donne des résultats aussi bons qu'un traitement de 18 mois par l'association isoniazide plus streptomycine et qu'un traitement de 9 mois par les mêmes antibiotiques ne donne pratiquement jamais d'échecs ou de rechutes.

Bien qu'un traitement de 9 mois puisse être considéré comme un traitement de courte durée en comparaison des traitements qui avaient cours avant l'époque de la rifampicine, un tel traitement reste encore de longue durée du point de vue social, financier et opérationnel. Il est donc logique que des essais de raccourcissement supplémentaires soient actuellement en cours dans plusieurs pays (24). Ces essais reposent tous sur l'association au couple isoniazide rifampicine, des deux autres antibiotiques, la streptomycine et le pyrazinamide qui sont bactéricides, le premier sur les bacilles de multiplication active et le second sur les bacilles intracellulaires. Bien que très prometteurs pour l'avenir, les résultats de ces essais n'autorisent encore ni à modifier le schéma standard de traitement ni à réduire la durée d'administration des antibiotiques en dessous de 9 mois.

Un traitement efficace de la tuberculose a donc deux exigences :

1°) Éviter la sélection des mutants résistants aux antibiotiques: on y parvient par l'administration simultanée de plusieurs antibiotiques;

...../...

2°) Stériliser au plus vite les bacilles sensibles: on y parvient par l'administration des antibiotiques les plus bactéricides sur les différentes populations de bacilles présentes dans les lésions.

L'association de rifampicine et d'isoniazide qui répond le mieux à ces exigences est à la base du traitement moderne de la tuberculose.

c) Traitement de la tuberculose au Mali

Au Mali tout malade dépisté est théoriquement pris en charge pour le traitement. Les médicaments utilisés dépendent de leur disponibilité. En 1970 seuls la Streptomycine l'I N H le P A S étaient disponibles.

Le régime adopté consistait :

1°) une phase initiale de un mois de traitement comportant ces trois antituberculeux tous les jours .

2° une phase d'entretien de 11 à 18 mois comportant soit

- I N H Streptomycine 2/7 jours
- I N H P A S 7/7 jours.

Nous disposons au Mali de médication majeures (Rifampicine, I N H), efficaces (streptomycine , ethambutol) et mineures, TB₁ , Trecator contre la tuberculose. En général l'organisation du traitement dans le cadre de la lutte antituberculeuse réserve la Rifampicine et l'ethambutol pour les cas d'échec après 12 mois de traitement tandis que les autres antibacillaires sont utilisés chez les nouveaux malades dépistés. Dans ce dernier cas les régimes sont variables mais consistent toujours en une association triple pendant un mois ou deux et pendant 12 mois en une association double. Ces régimes sont donc bons dans leur principe mais les résultats obtenus sont décevants et cet échec tient d'une part à un manque de collaboration totale du corps médical d'autre part au manque de coopération d'un grand nombre de malades.

Il est donc nécessaire en vue d'améliorer ces résultats, d'obtenir une meilleure collaboration du personnel médical et une meilleure coopération des malades en les amenant à se connaître eux-mêmes par une éducation sanitaire appropriée en matière de tuberculose.

3°) PROPHYLAXIE

Deux méthodes de prévention sont employées en matière de lutte antituberculeuse :

- . la chimioprophylaxie
- . la vaccination B.C.G.

- La chimioprophylaxie : Consiste à administrer des médicaments antituberculeux aux sujets contacts. La chimioprévention ou chimioprophylaxie primaire est peu utilisée. Quant à la chimioprophylaxie secondaire appliquée à des sujets récemment infectés, elle réduit la morbidité de 3 à 5 fois pendant au moins 5 ans (36). Dans la pratique on donne au sujet à protéger la même dose de médicament pendant toute la durée de l'exposition au risque qu'à un tuberculeux à traiter.

- La vaccination par le B.C.G. : On sait que la vaccination par le B.C.G. correctement effectuée, entraîne le virage des réactions tuberculiques dans 95 % des cas, qu'elle confère une protection qui est de l'ordre de 90 % (36) pour les formes primaires 71 % pour les pleuresies, 78 % (36) pour l'ensemble des formes extrapulmonaires et que la durée de celle-ci s'étend sur dix ans (36) en moyenne. En matière de vaccination par le B.C.G., seule se pose la question du choix entre la vaccination indiscriminée et la vaccination discriminée. La vaccination B.C.G. directe (29) est la seule méthode à retenir actuellement.

IV. ETUDE BACTERIOLOGIQUE DU GENRE
MYCOBACTERIUM

I. EXAMEN MICROSCOPIQUE

1°)- Prélèvement : Un examen de laboratoire n'a de valeur que si le prélèvement est correctement effectué. Certains peuvent être réalisés par le biologiste d'autres (L.C.R. liquide pleural, écouvillonnages bronchiques ou laryngées etc...) le sont par le clinicien.

Deux éventualités sont à envisager selon que le malade est hospitalisé ou non :

- Sujet Hospitalisé

. Ceux qui crachent : Le malade tuberculeux et plus généralement les personnes atteintes de maladies pulmonaires expectorent le plus souvent le matin au réveil. Le mode de prélèvement le plus simple consiste donc à recueillir les crachats directement dans un flacon stérilisable ou dans un flacon à usage unique qui sera détruit après usage. On demande au malade de cracher c'est-à-dire que par un effort de toux profond il doit émettre des mucosités bronchiques. Il convient de rejeter les prélèvements de nature salivère ou constitués par des mucosités nasopharyngées. Le plus simple est de confier aux malades un récipient le soir et de le reprendre le lendemain matin.

. Ceux qui ne crachent pas : Certains malades ne crachent pas ou ne veulent pas cracher pour de multiples raisons. Dans tous les cas on doit s'assurer que le malade ne crache pas. On utilise dans ces conditions trois procédés pour recueillir les crachats.

a) L'expectoration provoquée : C'est une manoeuvre simple qui consiste à administrer au malade qui ne crache pas un produit expectorant sous forme d'aérosol de serum physiologique. L'aspiration bronchique au cours d'une bronchoscopie et le lavage bronchique sont deux techniques qu'on peut rapprocher de l'expectoration provoquée.

b) Le tube gastrique : C'est le mode de prélèvement le plus à conseiller pour recueillir les crachats chez un malade qui ne crache pas. Les mucosités bronchiques dégluties inconsciemment pendant le sommeil sont prélevées le plus tôt possible après le réveil, avant que les contractions de l'estomac n'en aient chassé le contenu. De préférence on utilise le tube de **KAUSCHER** stérile lubrifié à l'huile de paraffine stérile. On introduit le tube dans la cavité buccale latéralement, puis dans l'oesophage lors d'une déglutition. On pousse le tube dans l'oesophage, en **faisant** respirer le malade profondément. Le tube parvient à l'estomac entre les efforts de regurgitation. On branche l'entonnoir à l'extrémité libre du tube. Et ne le maintenant en position haute on introduit 200 ml. d'eau distillée stérile tiède dans l'estomac. Une fois l'écoulement terminé, on abaisse l'extrémité libre du tube, par effet de siphon, on recueille avec le liquide introduit les mucosités présentes dans l'estomac. Le liquide est recueilli dans un récipient stérile. Le matériel utilisé est ensuite rincé avec de l'eau distillée stérile et nettoyé de façon à éliminer tout reste bacillaire qui pourrait souiller les prélèvements ultérieurs. Certains préfèrent une respiration gastrique réalisée au moyen d'un tube en caoutchouc de petit calibre. Ce procédé bien que commode présente l'inconvénient de ne pas assurer totalement le prélèvement du contenu gastrique.

c) Écouvillonnage laryngé : Permet de recueillir les mucosités au niveau du larynx. C'est une technique qui apporte peu de matériel. Il est plus conseillé pour la culture que pour la microscopie. Pour ces différentes raisons il doit être fait en série.

...../.....

- Sujets non hospitalisés

. Ceux qui crachent : Deux éventualités s'offrent au biologiste.

Ou bien il confie au malade un récipient à prélèvement fermant hermétiquement, et le récupérer le lendemain matin, ou bien il fait cracher le malade sur place au laboratoire. La première de ces possibilités est la meilleure, mais elle nécessite deux déplacements du malade, ou d'un de ses proches. La 2ème, sans être moins rentable que la première si l'on a soin de répéter les examens est de loin préférable surtout pour les laboratoires spécialisés où un local est affecté à cet effet.

. Ceux qui ne crachent pas : Chez le sujet non hospitalisé qui ne crache pas la recherche des Bacilles Acido-Alcoolo Résistants (B.A.A.R.) est difficile. La la tubage gastrique est moins appréciable vu le fait que le contenu stomacal est déjà dégluti à moins que celui-ci ne soit fait à domicile sitôt après le réveil. Dans ce cas l'expectoration provoquée et l'écouvillonnage laryngé sont à conseiller.

2°) Conservation des expectorations :

Le lieu d'émission n'étant pas souvent le lieu d'examen il est nécessaire de conserver les expectorations dans des conditions les plus près possible de l'état frais.

A la température ambiante le pullulement des germes saprophytes entraînent une liquéfaction du mucus, sorte d'homogénéisation spontanée. Mais cette liquéfaction, d'une part gêne la mise en évidence microscopique des B.A.A.R. et nécessite de ce fait obligatoirement une concentration, et d'autre part elle a une influence désagréable sur la culture des bacilles en diminuant leur viabilité par l'action néfaste des enzymes bactériennes et les variations de pH. Pour ces différentes raisons les expectorations ne pouvant être examinées sur leur lieu et heure d'émission doivent être :

...../.....

placées au froid à $+4^{\circ}$ C. Pour les liquides gastriques qui sont acides (Hcl.) une neutralisation par la soude ou le bicarbonate en présence d'indicateur de pH est nécessaire . On réduit autant que possible le temps du transport. On peut également s'opposer au pullulement des germes saprophytes en ajoutant aux expectorations du phosphate trisodique à 10 % (23 % de $PO_4 Na_3 \cdot 10 H_2O$) (10) ou du bromure de cétyle piridinium à 1 % (10) en quantité égale. La viabilité des bacilles n'est pas altérée et on peut pour sa culture faire une simple centrifugation sans qu'il soit nécessaire de faire une autre décontamination. L'emploi d'antibiotiques (pénicilline , auréomycine etc....) introduit par ABBOT (1) à de forte concentration exerce un effet défavorable sur le bacille tuberculeux, sans pour autant empêcher la multiplication des germes saprophytes le plus souvent résistants aux antibiotiques utilisés. L'utilisation de froid paraît être le meilleur moyen de conservation des expectorations.

3°) TRANSPORT

Le transport des expectorations présente en plus grand, les mêmes difficultés que leur conservation (10)

Le transport à distance doit se faire en tenant compte de 2 impératifs.

- La protection du personnel de laboratoire amené à les manipuler. Les expectorations doivent être placées dans un récipient fermant hermétiquement.

- La conservation qui est fonction de la rapidité du transport et de la température . Le problème posé par le transport n'est pas encore complètement résolu.

...../.....

2 4°) PREPARATION DES FROTTIS D'EXPECTORATION POUR EXAMEN DIRECT :

- Étalement : Il se fait à partir d'une parcelle purulente ou du culot de centrifugation du crachat après homogénéisation. Il est indispensable d'utiliser des lames microscopiques neuves et bien dégraisées car l'utilisation de lames anciennes expose à des risques d'erreurs. Le prélèvement se fait à l'aide d'une anse de platine préalablement flambée et refroidie. Ce prélèvement conditionne en grande partie le résultat de l'examen microscopique. Il est reporté sur la lame et étalé par un mouvement de va et vient permettant de dissocier les éléments. Il convient d'éviter l'étalement par écrasement entre 2 lames qui non seulement serait de mauvaise qualité mais exposerait à des dangers de contamination. Une fois le frottis réalisé l'anse de platine est stérilisée par flamage au rouge. Un bon étalement garantit la qualité de la coloration et l'efficacité de la recherche; un frottis trop épais sera opaque et par conséquent non lisible, tandis qu'un frottis trop pauvre ou irrégulier annulerait les chances de voir des mycobactéries.

- Séchage : Le séchage rapide à la flamme entraîne une coagulation brutale. Les frottis seront séchés soit à l'air libre pendant un laps de temps soit de préférence sur une plaque chauffante à une température douce (Platine chauffante d'histopathologie) (60)

- Fixation : La meilleure technique de fixation des frottis consiste à recouvrir les lames avec de l'alcool sur le support chauffant. L'alcool s'évapore en quelques minutes.

5°) COLORATION :

La richesse des mycobactéries en lipides les rend peu perméables aux colorants habituels. Cette proportion élevée de lipides (23%) ANDERSON 1931 (10) est à l'origine de l'utilisation de techniques de coloration particulières. La coloration initiale de KOCH (1832) faisait intervenir le bleu de méthylène potassique pendant 24 heures à la température ordinaire (une heure à 40°C) suivie de la contre coloration au brun BISMARCK,

...../.....

Les bacilles se présentaient comme de fins batonnets bleus sur le fond brun de la préparation. KOCH remarquait également que seuls les bacilles de HANSEN présentaient les mêmes caractères tinctoriaux. BISHOP et NEUMANN (4) à partir de cette description notèrent trois facteurs importants :

- . l'adjonction au bleu de méthylène d'un mordant : Potasse
- . l'utilisation de la chaleur qui permet une réduction considérable du temps de coloration.
- . la contre coloration par le brun BISMARK

ERLICH en juin 1882 (60) utilise la fuschine comme colorant, comme mordant l'aniline et met en exergue l'acido-résistance des bacilles tuberculeux. Il conseille une contre coloration bleue du fond de la préparation . Les bacilles apparaissant rouges sur le fond bleu.

ZIEHL en Août 1882 (60) utilise le phénol à la place de l'aniline. Deux mois après RINDFLEISH (60) préconise le chauffage de la solution colorante La même année NIELSEN (60) apporte les derniers perfectionnements à la méthode de coloration des bacilles acido alcool résistants dont le principe fondamental comporte trois temps :

- Coloration des bacilles par la fuchine phéniquée
- Décoloration du fond de la préparation par action d'un acide dilué.
- Recoloration du fond de la préparation pour mieux faire apparaître la teinte rouge des bacilles.

Cette technique restera longtemps sans modification. C'est en 1946 qu'HALLBERG (25) décrit une méthode originale permettant la coloration du bacille par un phényl méthane: le Bleu de nuit. La décoloration se fait par l'acide chlorhydrique. En 1962 TAN THIAM HOK (55) met au point une technique simplifiée utilisant les solutions de KINYOUN (32) et de FRANKEL GABBET (20).

...../.....

La première à base de fuchine donne au bacille sa coloration et la deuxième permet la décoloration et la recoloration simultanée du fond de la préparation par une solution saturée de bleu de méthylène dans l'acide-alcool. La rapidité d'action et la reproductibilité des résultats sont les avantages de cette méthode. Mais les bacilles apparaissent pâles sur une préparation en défaut de contraste.

DEVULDER (15) prolonge le temps de contact entre le frottis et les colorants. Ce qui donne des résultats nettement meilleurs que ceux de la méthode de TAN THIAM HOK (55).

Méthode de ZIEHL-NEESEN selon L'U. I. C. T. (39)

Reactifs :

. Fuchsine Pheniquée de ZIEHL

1. Solution alcoolique saturée de fuchsine

. Fuchsine basique 3,0g.
 . Alcool méthylique à 95 %; 100,0ml.

2. Solution de travail

. Cristaux de Phénol.....5,0g.

on chauffe doucement dans un Erlen pour faire fondre les cristaux et on amène le volume à 90 ml en ajoutant de l'eau.

. on ajoute 10ml de la solution de Fuchsine

. Acide sulfurique à 25 %

H_2SO_4 100 ml.

eau distillée.... 300 ml.

on verse toujours l'acide très lentement dans l'eau.

3. Contre colorant au bleu de méthylène

. Chlorure de bleu de méthylène ou

bleu de méthylène hydrosoluble.....0,3 g.

eau distillée.....100,0 ml.

...../.....

Technique :

On recouvre la frottis de fuchsine phéniquée de ZIEHL. On chauffe très doucement jusqu'à émission de vapeur en aucun cas le colorant ne doit bouillir ou se dessécher sur la lame.

On laisse agir le colorant pendant cinq minutes . On rince la lame à l'aide d'un filet d'eau du Robinet . On recouvre la lame avec de l'acide sulfurique à 25 % pendant trois minutes. On rince avec de l'eau . On recouvre le frottis avec le bleu de méthylène à 0,3 % . On laisse agir le colorant pendant une à deux minutes. On rince avec de l'eau . On laisse sécher à l'air libre.

Coloration à Froid : KINYOUN modifié (39)Ractifs :

. Fuchsine Phéniquée de KINYOUN

On fait dissoudre 4,0g de Fuchsine basique dans 20,0ml. d'éthanol à 90 - 95 % et on additionne 100,0ml. d'une solution aqueuse de phénol à 8 %

. Acide-Alcool

On additionne lentement 3,0ml. d'acide chlorhydrique dans 97,0ml d'éthanol.

. Contra colorant au bleu de méthylène .

On fait dissoudre 0,3g. de bleu de méthylène dans 100,0ml d'eau distillée.

Le mordantage de la fuchsine est assurée non plus par la chaleur mais l'addition de quelques gouttes de corps tensio-actifs (Teepol, Tween 80, Lauryl Sulfate.)

Technique :

On recouvre la frottis par la fuchscine phéniquée de KINYOUN . On laisse agir le colorant pendant cinq minutes.

On rince la laine à l'aide d'un filet d'eau du Robinet . On recouvre la laine avec la solution .acide-alcool pendant trois minutes. On rince à l'eau de Robinet . On recouvre le frottis avec le bleu de méthylène à 0,3 %. On laisse agir le colorant pendant un à deux minutes. On rince avec de l'eau. On laisse sécher à l'aire libre.

Coloration par fluorescence :

La technique de coloration des mycobactéries par la méthode de ZIEHL NEELSEN a été pendant longtemps la seule technique employée. C'est en 1937 que HAGEMANN (10) décrit pour la première fois la coloration par fluorescence.

La technique consiste à colorer les mycobactéries par des fluorochromes qui sont des substances organiques excitées par une lumière de longueur d'onde déterminée. Après excitation ces substances émettent une lumière de longueur d'onde plus élevée. Les colorants les plus utilisés sont excités par les lumières rouge verte et bleue . Plusieurs techniques ont été décrites (10)

1°) Coloration de HULST MITCHISON et RADHAKRISHNA (10)

C'est une coloration fluorescente simple faisant apparaître les mycobactéries colorées en jaune.

Ractifs :

- Auramine Phéniquée :

- . Acide phéniqué pur 30 g.
- . Eau distillée.....1000 ml.

On chauffe à 40 °C. On ajoute

- . Auramine..... 3 g.

On agite constamment .On filtre .On conserve dans un flacon opaque bien bouché .

- Acide-Alcool.

- . Chlorure de sodium20g.
- . Acide chlorhydrique.....20ml.
- . Eau distillée.....500ml.
- . Alcool à 75°.....1500ml.
- Permanganate de Potassium à 0,1% dans l'eau distillée.
-/.....

Technique :

Les frottis séchés et fixés sont recouverts avec la solution auramine phéniquée . On laisse 10 mn. . On lave , on décolore par la solution acide alcool pendant 4 mn. . On lave. Ensuite avec la solution de permanganate à 0,1%. On fait la contre coloration pendant 30 mn. On laisse sécher.

La lampe du microscope doit être allumée 15 mn. avant la lecture. Les bacilles se distinguent, comme de petits batonnets fins colorés en jaune sur la fond bleu noir au microscope.

2°) Coloration de DEGONNILLER (10)

Elle est plus élaborée et consiste en une double coloration fluorescente . Elle communique la fluorescence jaune de l'auramine aux bacilles et la fluorescence rouge de la thiazine au reste des éléments. Cette deuxième fluorescence est destinée à supprimer la fluorescence spontanée des produits naturellement fluorescents.

Réactifs :

- Alcool méthylique
- Acide trichloracétique à 1 %
- Auramine phéniquée
 - . Auramine 1g.
 - ..Eau distillée 850 ml.
 - . Chlorure de Magnésium à 2%..... 100 ml.
 - . Acide phénique aqueux 50 ml.
- Acide Alcool
 - . Alcool à 90°.....1000 ml.
 - . Acide chlorhydrique..... 5 ml.
 - . Chlorure de sodium..... 5 g.
- Thiazine phéniquée
 - . Rouge thiazine..... 1 g.
 - . Eau distillée.....850 ml.
 - . Sulfate de Magnésium à 2%.....1000 ml.
 - . Acide phénique aqueux..... 50 ml.

...../.....

Technique :

Les frottis sont fixés par l'alcool méthylique puis traités par l'acide trichloroacétique à 1% pendant 30 mn. On lave à l'eau. On colore pendant 15mn. par l'auramine phéniquée sans chauffer. On lave à l'eau. On décolore pendant 5 mn. par l'acide alcool. On lave à l'eau. On colore pendant une minute et demie par la thiazine phéniquée sans chauffer. On lave à l'eau. On décolore pendant 3 mn. par l'acide alcool. On lave et on laisse sécher. A l'examen microscopique les bacilles se détachent en jaune pâle sur fond rouge sombre.

3° Coloration de SMITHWICK modifié (39)Colorant :

- Auramine phéniquée

On fait dissoudre 0,1g. d'auramine dans 10,0ml. d'éthanol à 90-95 % puis on additionne à une solution à 3,0g. de phénol 87,0ml. d'eau distillée.

Acide-Alcool :

On additionne 0,5ml. d'acide chlorhydrique dans 100,0ml. d'alcool à 70 %.

Contre Colorant :

On fait dissoudre 0,01g. d'orange d'acridine ou 0,1g. de rouge thiazine dans 100,0ml. d'une solution aqueuse à 0,1 % de phosphate disodique anhydre ($\text{Na}_2 \text{H PO}_4$).

Technique :

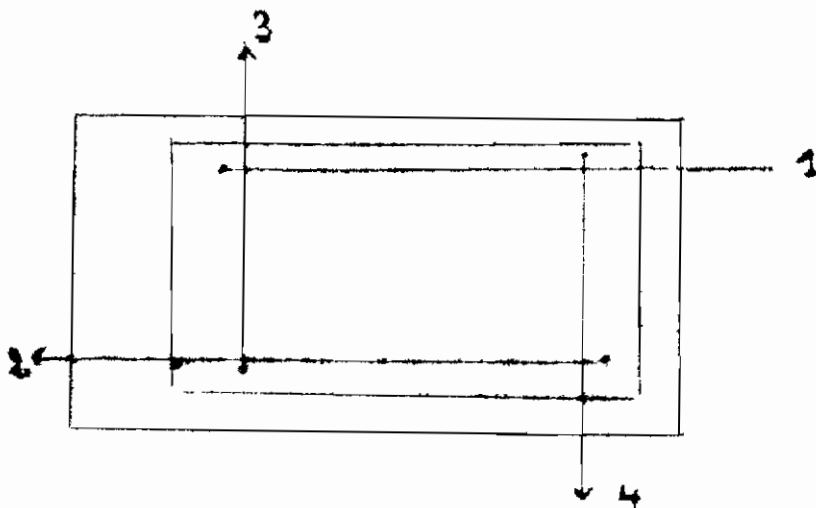
On recouvre le frottis avec la solution d'auramine phéniquée et on laisse colorer pendant 15 mn. . On rince avec l'eau de robinet. On recouvre le frottis avec le contre colorant pendant 2 mn. . On rince et on laisse sécher à l'air.

..../....

6°/ LECTURE :a) Technique :

- Après coloration par la méthode de ZIEHL NEELSEN

La recherche efficace des B.A.A.R. en microscopie exige beaucoup de temps mais aussi l'utilisation d'un bon microscope . Il est préférable d'utiliser un objectif à immersion (X 100) et des oculaires de 10. L'objectif ne doit pas rentrer en contact avec l'étalonnage de crainte d'éventuelles souillures des lames suivantes, qui pourrait être une cause d'erreur. L'examen systématique de la lame se fera en allers-retours successifs sur toute la hauteur de l'établement. L'observation convenable d'un champ microscopique réclame de deux à cinq secondes selon l'entraînement de l'observateur et son degré de fatigue. L'ensemble correspond à 400 champs microscopiques et sa lecture prend vingt à trente minutes pour un bon microscopiste

SCHEMA DE LA LECTURE D'UN FROTTEIS

...../.....

- Après coloration en fluorescence

La lecture en fluorescence se fait après accommodation en cabinet noir ou très sombre avec ou sans objectif à immersion.

. Sans objectif à immersion (10) objectif (X20) oculaire (X6 ou X8) les bâcilles lumineux sont plus facilement décelés mais apparaissent plus petits sans morphologie nette. On peut par ce procédé éliminer vite les frottis négatifs et repérer ceux qui sont très riches en bâcilles.

. Avec un objectif à immersion (60) objectif (X100) oculaire (X10) le passage à l'immersion permet une étude très détaillée de la morphologie bacillaire.

b) Aspect microscopique des mycobactéries

- Après coloration par la méthode de ZIEHL, NEELSEN.

Cette méthode de coloration basée sur l'acido-alcool résistante est spécifique des mycobactéries. Seules les B.A.A.R. apparaissent comme de fins batonnets rouges francs longs de 0,5 à 4 micron et large de 0,3 à 0,6 micron. Ils sont droits ou légèrement incurvés, isolés ou en amas. Avec des extrémités arrondies. Ces cellules ne présentent pas de ramifications dans les conditions habituelles de culture. Cependant M. AVIUM en croissance dans les cellules de HELA (39) présente des ramifications rudimentaires. Les cellules de mycobacterium tuberculosis ont tendance à se ranger parallèlement et à constituer des cordons ou serpentines. Cette propriété est associée à la présence d'un glycolipide toxique: "Cord factor" (39.)

- Après coloration en fluorescence

La coloration en fluorescence fait apparaître les B.A.A.R. colorés en jaune pâle avec un contraste de fond variant avec les méthodes.

...../.....

7°/ EXPRESSION DES RESULTATS (39)

Quel que soit le procédé de lecture utilisé, les résultats des examens microscopiques doivent donner une idée de la richesse en B.A.R. des produits pathologiques examinés; ceci pour deux raisons:

. d'une part épidémiologique : les malades à bacilloscopie positive sont la principale source de transmission de la maladie qu'il faut chercher à tarir le plus rapidement possible.

. d'autre part thérapeutique: pour suivre l'évolution de la thérapeutique antituberculeuse. Il est nécessaire d'avoir une notion quantitative de la concentration bacillaire. Pour ces raisons le laboratoire ^{doit} standardiser ses méthodes de préparation de coloration et d'observation des frottis.

TABLEAU 11.

NOMBRE DE BACILLES ACIDO-ALCOOLO RESISTANTS	N O T E R	REPOUDRE	CONCENTRATION BACILLAIRE PAR CRACHAT
0/300 champs	Négative	(-)	(-) de 1000
1-2/300 champs	Nombre observé	± ou ?	environ 5 000
1-10 /100 champs	Nombre par 100 champs.	+	à 10 000
1-10/10 champs	Nombre par 10 champs.	++	environ 50 000
1-10/ champs	Nombre par champ	+++	environ 100 000
10 ou plus par champ	Supérieur à 10 par champ.	++++	500 000 ou plus.

...../.....

COMPARAISON ENTRE MICROSCOPIE PAR LUMIERE TRANSMISE ET MICROSCOPIE
EN FLUORESCENCE

<u>C O N D I T I O N S</u>	<u>FLUORESCENCE</u>	<u>LUMIERE TRANSMISE</u>
Diamètre	250 X	1000 X
Nombre maximum de champs	30	300
Temps par frottis	1,5mn.	15,0mn.
Temps entre frottis	0,25mn.	0,25mn.
Temps pour un frottis	1,75mn.	15,25mn.
Temps pour 50 frottis	1 h.28mn.	12h.42mn.
Nombre de frottis par 8 heures de travail	137	16

La microscopie par fluorescence trouve donc sa justification dans un laboratoire spécialisé où l'on affectue en moyenne 30 à 50 examens microscopiques par jour. C'est une méthode qui a certes des avantages telles que sa rapidité d'action et sa grande sensibilité. Mais le coût, l'entretien de l'appareillage et l'utilisation d'un personnel bien entraîné font que la microscopie par fluorescence est peu recommandable à l'heure actuelle dans les pays en développement. La méthode par lumière transmise après coloration de ZIEHL NEELSEN du fait de sa simplicité correspond tout à fait au besoin de la lutte antituberculeuse dans ces pays.

8°/ CONCLUSION

Si l'on ne peut contester la valeur sémiologique certaine de la bacilloscopie, il faut savoir aussi qu'une réponse négative est sujette à caution étant entendu qu'il existe des cas de tuberculose sans bacille dans les expectorations. Elle ne doit en aucun cas être formelle sur le diagnostic de la tuberculose, d'une part parce qu'elle ne permet pas de grouver, partant des seuls critères morphologiques, la nature tuberculeuse certaine des bacilles examinés et des lésions en cause hormis des cas bien particuliers.

C'est pourquoi le deuxième temps du diagnostic, c'est-à-dire la mise en culture du produit suspect, est si les conditions économiques le permettent d'un intérêt primordial. Elle permet d'isoler la souche, de l'identifier et de tester sa sensibilité aux drogues antibacillaires. Malheureusement pour des raisons économiques elle n'est pas encore systématiquement utilisable dans les pays en développement.

II. CULTURE

Les Mycobactéries se différencient de la plupart des autres genres par leurs exigences métaboliques qui nécessitent pour ^{la} mise en culture l'emploi de milieux spéciaux. Elles sont aérobies strictes, cultivent à une température optimale de 35 - 37° et à un pH optimum de 6,7 - 6,9. L'aspect des colonies de mycobactéries est caractéristique sur milieu LOWENSTEIN JENSEN. La lenteur de multiplication explique l'apparition tardive des colonies.

A/- MILIEUX DE CULTURE

La première culture du Bacille tuberculeux a été obtenue par ROBERT KOCH en 1882 à partir du sérum de boeuf coagulé. En 1887 NOCARD et ROUX obtiennent une croissance satisfaisante du bacille par l'adjonction de glycérine en proportions convenables (5 à 8 %). Depuis lors de nombreux milieux ont été étudiés. On distingue 2 groupes :

1°) Les Milieux Liquides :

En 1884 PROSKAUER et BECK (46) mettent au point une formule simple constituée d'une solution tampon dans laquelle le carbonate d'ammonium est la source d'azote et la glycérine celle du carbone. SAUTON et 1912 (60) ajoutent un acide aminé et du fer. YOUNG (65) en 1947 réalise un milieu semi-synthétique en additionnant au milieu de PROSKAUER et BECK 10 % de sérum de boeuf stérile.

Trois années plus tard DUBOS (17) remplace le sérum de boeuf par la fraction V d'albumine bovine. Le Tween 80 ajouté au milieu permet une homogénéisation bacillaire afin d'obtenir une culture uniforme. MIDDELBROOK (40) en 1954 et 1968 met au point les milieux 7H₉, 7H₁₀, 7H₁₁. On observe dans la préparation enrichie par la pyridoxine, la biotine, l'albumine bovine et la catalase. La présence du vert malachite qui a un léger pouvoir antiseptique. La différence entre les trois milieux réside dans la composition de la solution minérale, et par l'absence dans le 7H₉ de l'acide oléique et par la présence dans le 7H₁₁ d'Hydrolysat de caséine.

Le milieu de LOCKEMAN (60) enrichi en pyruvate de sodium et en glucose est conseillé pour le dosage de l'acide nicotinique. Le milieu de SULA (54) enrichi en Alanine, le seul d'ailleurs, contient du vert malachite et de l'hydrolysat de caséine. Ce milieu peut être employé à la place du milieu de LOWENSTEIN-JENSEN lorsque les circonstances ne permettent pas de préparer le milieu à l'oeuf.

2°) Milieux solides :

L'isolement des mycobactéries à partir des produits pathologiques se fait habituellement sur milieu solide.

Le milieu solide à l'oeuf coagulé de DORSET a subi de nombreuses modifications par LUBENAU, PETROFF et PETRAGNANI. A l'heure actuelle le milieu solide le plus couramment utilisé est le milieu de LOWENSTEIN JENSEN (37) à base d'oeuf et de glycérine. COLETOS (12) en 1960 met au point trois milieux particulièrement adaptés à la primoculture.

- Le milieu COLESTOS base, est enrichi avec des oligo éléments, du pyruvate, du glutamate et d'oséine. Il permet une croissance rapide des Mycobactéries et est particulièrement indiqué pour la culture de M. Bovis et M. africanum.

Le Milieu de base enrichi d'oséine (20 %) sur lequel la culture se fait sous cape (60).

Le Milieu de base additionné d'oséine ~~caudée~~ et d'une suspension d'extraits d'organes de singe.

Ces deux derniers milieux sont particulièrement indiqués pour la culture des bacilles peu viables et quiescents.

3°) Emploi des Milieux de Culture

a) Milieu de diagnostic

- Milieu de LOWENSTEIN JENSEN

Composition

. Solution 1

Phosphate monopotassique.....	2,4g.
Sulfate de Magnesium.....	0,24g.
Citrate de Magnesium.....	0,60g.
L Asparagine.....	3,60g.
Glycérine.....	12 ml.
Eau distillée.....	600 ml.

On chauffe jusqu'à dissolution. On stérilise à l'autoclave à 120°C pendant 20 mn. On ajoute 30g. de fécule de pomme de terre (stérile) à la solution 1 et on chauffe à 100°C pendant 15 mn. puis on maintient à 56°C. On mélange à cette solution 1 litre d'oeufs (cassés stérilement) et 20 ml. de vert malsch à 2% (oxalate).

Remarque : Les oeufs sont délicatement brossés à l'eau savonneuse pendant une demi heure et rincés à l'eau courante. Ils sont ensuite mis dans une solution alcoolique à 90 %. Chaque oeuf est ensuite essuyé avec une compresse stérile, cassé stérilement et son contenu versé dans un récipient stéril. Des précautions rigoureuses pour maintenir les éléments stérils sont nécessaires pour ne pas souiller le milieu, car terminé il ne sera pas stérilisé.

...../.....

. Préparation à partir de la poudre

Le milieu de base déshydraté permet de simplifier les opérations.

On ajoute 37,4g. de poudre à 600 ml. d'eau contenant 12 ml. de glycérine . On chauffe au bain Marie bouillant jusqu'à ébullition pendant 2mn.

On obtient une solution à consistance pâteuse. On stérilise à l'autoclave pendant 20 mn. à 120°C. On maintient à 56°C et on mélange à cette solution 1 litre d'oeuf et coaguler comme ~~ci-dessous~~ indiqué.

. Répartition et coagulation

Répartir le milieu homogène à raison de 6 ml. par tube avec les précautions d'usage (flambage du col du tube avant et après remplissage).

Coaguler 50 minutes à 30-85°C dans les appareils chauffés au préalable. Les tubes étant disposés selon une inclinaison satisfaisante.

Dans certains cas non encore bien codifiés (60) (en particulier pour l'isolement du bacille tuberculeux de certaines lésions extra-pulmonaires, il est intéressant d'ensemencer d'autres milieux de culture tels que le milieu de COLETSOS base. Sa composition et son mode de fabrication sont très voisins de ceux du milieu de LOWENSTEIN JENSEN. Il donne en pratique courante (60) d'excellents résultats aussi bien pour l'isolement de M. Tuberculosis, M. Bovis que pour celui de M. africanum (22) . Les colonies y apparaissent plus précocement mais ont tendance à être lisses , d'où une identification parfois difficile à partir des caractères cultureux.

Le milieu semi synthétique de MIDDLEBROOK qui est un peu plus sensible est fréquemment employé aux U.S.A. mais son prix de revient est un peu plus élevé.

Le milieu de SULA bien que liquide peut valablement remplacer le milieu de LOWENSTEIN si les circonstances ne permettent pas de préparer le milieu à l'oeuf coagulé.

...../.....

b) Milieux d'étude

Si les milieux d'usage courant sont utilisés pour l'isolement des mycobactéries par primoculture, pour le repiquage des souches ou pour la réalisation des tests biochimiques usuels, les milieux d'études comme leur nom l'indique sont utilisés pour les tests biochimiques ou biologiques. L'emploi de ces milieux est surtout réservé aux laboratoires spécialisés.

4°) Ensemencement des Produits pathologiquesa) Produits non contaminés

Les produits pathologiques non contaminés provenant de cavités naturelles n'ayant aucune communication avec le milieu extérieur (L.C.R. , pleuresies serofibrineuses pus ganglionnaires etc...) peuvent être ensemencés directement sur les milieux de culture sans traitement préalable. Cependant les liquides purulents seront dilués au 1/5ème (60) avec de l'eau distillée stérile.

b) Produits contaminés

L'isolement des mycobactéries à partir de produits pathologiques dans lesquels la flore associée est abondante (pathogène ou commensale) nécessite une décontamination énergique qui se fait en deux temps.

- Un premier temps de liquéfaction du mucus qui permet à la substance toxique d'atteindre les bactéries à détruire.

- Un deuxième temps de destruction proprement dite des bactéries.

Ces deux temps qui sont simultanés représentent le traitement du crachat appelé improprement homogénéisation : terme trop restrictif.

+ Décontamination :

. Méthode au Formol

En 1900 SPENGLER (52) préconise pour la décontamination, l'utilisation des antiseptiques en vapeur.

On utilise une boîte de pétri dont le fond est recouvert par du papier filtre, et fermant hermétiquement à l'aide du frottement d'un autre papier filtre qui déborde le couvercle. Après stérilisation, le crachat est étalé sur le fond de la boîte et recouvert d'une couche fine de pancréatine. On laisse quelques heures à 37°C. pour permettre la mucolyse. Ensuite on verse une dizaine de gouttes de formol sur le filtre du couvercle et l'on referme. Après 2 heures de contact à la température du laboratoire, on ensemence sur des milieux de culture. Cette méthode recherche en plus de la purification, la fluidification par l'emploi de la pancréatine.

PLATOWSKI en 1904 (45) met directement en contact le formol et le produit . NATTAN LARHIER (41) préconise un chauffage discontinu pendant quelques minutes à 54°C.

UHLENHUT en 1908 (61) utilise l'antiformine à 30 % pendant une heure ou deux avec agitation temporaire.

. Méthode à la soude

En 1915 PETROFF (44) par sa méthode à la soude fait faire de grands progrès à la culture des mycobactéries. C'est cette méthode qui a fait entrer dans la routine la culture du bacille tuberculeux. Elle est sous de multiples variantes la plus répandue.

- Technique à la Soude avec centrifugation

Méthode de PETROFFRéactifs

Solution 1,0N de soude . On dissout 4,0g. de soude dans 100,0ml. d'eau distillée . On stérilise à l'autoclave.

Solution à 4,0 % de H_2SO_4 . On ajoute lentement l'acide dans l'eau.

Solution aqueuse de bleu de tournesol ou de bleu de bromothymol.

Matériels

Tube à centrifuger à vis de 50,0ml. type "OAK RIDGE"

Agitateur mécanique type "VORTEX"

Centrifugeuse, avec accessoire de protection contre la nébulisation ("Aerosol Free").

Pipettes de 1,0ml., 5,0ml. et pipettes PASTEUR, propipettes.

Technique

Les crachats placés dans le tube à centrifuger fermant hermétiquement sont mis en contact avec 2 à 4 fois leur volume de soude à 4 % selon leur viscosité. Après agitation, on met à l'étuve pendant une demi heure au maximum, ensuite on centrifuge à 3000 tours par minute pendant 15 à 20 mn. . On neutralise le culot de centrifugation par quelques gouttes de H_2SO_4 ou chlorhydrique à 4 % en présence d'un indicateur de pH. Le produit neutralisé est ensuiteensemencé à raison de quelques gouttes par tube de milieu de culture.

Méthode de PETROFF MODIFIEE (60)

Deux ml. de crachat sont placés dans un tube à centrifuger . On ajoute 3 ml. d'une solution 1 N de soude. On agite pendant 30 mn. sur agitateur de KAHN ensuite on ajoute une solution d'acide phosphorique à 0,6 % en présence de 2ml. de bleu de bromocrésol au 1/250ème jusqu'à apparition de nuages jaunes persistant au sein de la coloration bleu.

On centrifuge pendant une heure à 3000 tours par minute. On ensemence le culot de centrifugation à raison de quelques gouttes par tube de milieu de culture . Cette méthode est un peu plus sensible (60).

...../.....

Technique à la Soude sans centrifugation

Trois à quatre ml. de crachats purulents sont placés dans un mortier ou tout autre récipient stérile permettant une bonne homogénéisation du mélange crachat plus Soude. On y ajoute une quantité égale de soude à 6 % stérile et trois gouttes d'indicateur de pH (teinture de tournesol ou bleu de bromothymol etc...). Le mélange est broyé au pilon pendant 1 à 2 minutes, puis enveloppés d'un papier stérile et placé à l'étuve à 37°C pendant 50 mn..A la sortie on ajoute quelques gouttes de H_2SO_4 à 15 % stérile jusqu'à neutralisation. Le produit final est ensemencé à raison de quelques gouttes par tube de milieu de culture.

Remarque : Dans la technique sans centrifugation, la concentration finale de soude est de 3 % elle est du même ordre que la concentration finale obtenue dans la technique avec centrifugation où l'on traite le crachat par deux ou trois fois son volume de soude à 4 % . Aucune des deux techniques n'est donc sensiblement plus toxique que l'autre. La non centrifugation dans la technique de la soude à 6 % représente un gain de temps et une simplification technique appréciable. La soude à 6 % peut être remplacée par la soude à 4 % si les crachats sont traités immédiatement après leur émission. La technique sans centrifugation doit être préférée chaque fois que le crachat montre des bacilles à l'examen direct. Elle permet de pratiquer un titrage de résistance direct sans manipulation supplémentaire.

Le temps de contact entre le crachat et la soude à 37°C ne doit pas dépasser une heure. Au delà la viabilité est considérablement diminuée.

. Méthode à l'acide sulfurique

LOWENSTEIN et SUMIYOSHI préconise l'emploi de l'acide sulfurique à 15 %. Ils laissent agir pendant 15 mn. et ils ensemencent après centrifugation le culot lavé à l'eau physiologique. En 1926 HOHN (28) emploie l'acide sulfurique à 10 % pendant 20 minutes. Le culot est ensemencé sans neutralisation ni lavage.

Ce procédé de décontamination a été codifié par SAENZ et COSTEL en 1932 (49).

Technique

A 2 ml. de crachats purulents placés dans un mortier stéril et bien dissociés à l'aide d'un pilon après addition d'un peu de sable stéril, on ajoute 2 ml. de H_2SO_4 à 15 %. Le mélange bien homogénéisé au pilon est neutralisé par la soude à 30 % en présence d'un indicateur de pH, après un délai de 30 minutes à la température du laboratoire.

Remarque : La décontamination à la soude doit être préférée à celle par l'acide sulfurique, du fait de la mauvaise liquéfaction du mucus par H_2SO_4 . Il en résulte une mauvaise dissociation des crachats. Le procédé à l'acide sulfurique doit donc être réservé aux produits pathologiques ne contenant pas de mucus, les urines en particulier.

CORPER et UYEL (60) emploient l'acide oxalique à la place de l'acide sulfurique tandis que MAC NABB (60) utilise l'acide chlorhydrique à 3 %.

. Méthode au Phosphate Trisodique

CORPER et STONER (13) préconisent l'utilisation du phosphate trisodique à 10 %.

Technique :

Les expectorations purulentes sont traitées par un volume égal de phosphate trisodique (23 % de $PO_4 Na_3 \cdot 12H_2O$) à 10 % pendant 24 heures à 37° C. Le mélange est ensuite centrifugé et le culot neutralisé par l'acide chlorhydrique à 4 %.

Remarque : On utilise la technique au phosphate trisodique pour la conservation des expectorations. Les crachats sont placés dans un récipient contenant 10 ml. de phosphate trisodique à 10 %.

Après réception, on procède à une centrifugation à 3000 tours par minute pendant 30 minutes. Le liquide surnageant est décanté aseptiquement et le culot est repris par 10 à 15 ml. d'eau distillée stérile. Le culot est ensemené après une seconde centrifugation.

GOLDIE utilise le carbonate d'ammonium à la place du phosphate trisodique.

. Méthode au Teepol-Soude (60)

Le teepol commercial alcalinisé, dilué au quart possède une action bactéricide puissante. LOZE (60) a montré que, mis en contact les germes banals (flore associée) présents dans un crachat ayant séjourné 12 heures à l'étuve ne survivent pas 15 minutes. Le pouvoir fluidifiant du teepol est médiocre mais associé à la soude c'est un excellent homogénéisant. On agite pendant 30 minutes. Le mélange crachat teepol alcalin est neutralisé par une solution d'acide sulfurique à 1 pour 1000 en présence d'un indicateur de pH: le bleu de bromocrésol pourpre. On centrifuge et le culot est ensemené.

. Procédé au Leuryl Sulfate de Sodium TACQUET et TISON (60)

La composition chimique du teepol commercial variant d'un pays à un autre et selon les lots de fabrication, TACQUET ET TISON en 1961 modifient la technique originale en utilisant le lauryl sulfate de sodium pur, et en remplaçant par l'acide phosphorique, l'acide sulfurique de la solution neutralisante. Cette méthode présente un triple avantage :

- la stabilité de l'acide phosphorique permet l'autoclavage de la solution neutralisante à 120°C.
- la formation de dérivés sulfonés toxiques pour le bacille est évitée.
- le sulfate de sodium formé lors de la neutralisation est remplacé par le phosphate mieux toléré par le bacille.

Réactifs :

1.- Produits décontaminants

- . lauryl sulfate de sodium pur..... 30 g.
- . hydroxyde de sodium pur en pastille... 10 g.
- . eau distillée Q.S.F.....1000 ml.

On dissout le lauryl sulfate de sodium dans l'eau chaude et on ajoute seulement ensuite l'hydroxyde de sodium. Le flacon est gardé à l'étuve à 37°C.

2.- Solution de neutralisation

- . Poudre de bromocrésol à 1/250è..... 2ml.
- . Acide phosphorique pur..... 1,5ml.
- . Eau distillée Q.S.F.....

On répartit à raison de 30 ml. dans des flacons de 50 ml. On stérilise à l'autoclave.

Technique

1.- Fluidification-neutralisation

A deux ml. de produit pathologique, on ajoute 3 ml. de la solution mouillante alcaline. Le mélange peut être fait directement dans un tube à centrifuger conique stérile de 45-50ml. bouché. On agite une demi heure sur un agitateur de KAHN au minimum.

2. Lavage neutralisation

On verse dans le tube les 30 ml. de la solution neutralisante (cette solution jaune vire au bleu au contact de la solution alcaline. La neutralisation est obtenue lors du retour à la coloration jaune.

3. Centrifugation

On centrifuge pendant 30 minutes à 3000 tours par minute . On jette le surnageant.

4. Ensemencement

On ensemece l'ensemble du culot sur plusieurs tubes.

Remarques : L'avantage de la technique au lauryl sulfate est de produire une excellente homogénéisation du crachat donc de permettre une bonne décontamination (d'où un nombre moindre de cultures perdues par surinfection) et de concentrer après centrifugation le produit pathologique en un culot de faible volume facile à ensemenecer en totalité.

L'inconvénient de la technique est de nécessiter un matériel et des manipulations plus complexes que ceux qui sont nécessaires avec la technique de PETROFF.

PATTERSON (1956) (42) préconise dans un premier temps le phosphate trisodique et détruit ensuite les pyogènes par le Zephiran: (Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride).

KUBICA en 1963 (33) utilise non plus un détergent mais un réducteur comme fluidifiant (N Acetyl cysteine): en association avec un décontaminant qui est l'hydroxyde de sodium à 4 %.

KRASNOW (60) utilise le même fluidifiant mais avec le Zephiran.

SHAH (51) remplace la N. acetyl cysteine par le dithiothréitol qui provoque une rupture complète des ponts disulfure. Ce qui fait de cette substance un excellent agent mucolytique.

SULA (53) utilise l'acide chlorhydrique à 10 % qui est ensuite neutralisé par la soude.

QUISNO (47) en 1946 préconise la méthode au chlorure de cetyl pyridinium

. Méthode au chlorure de cetyl pyridinium

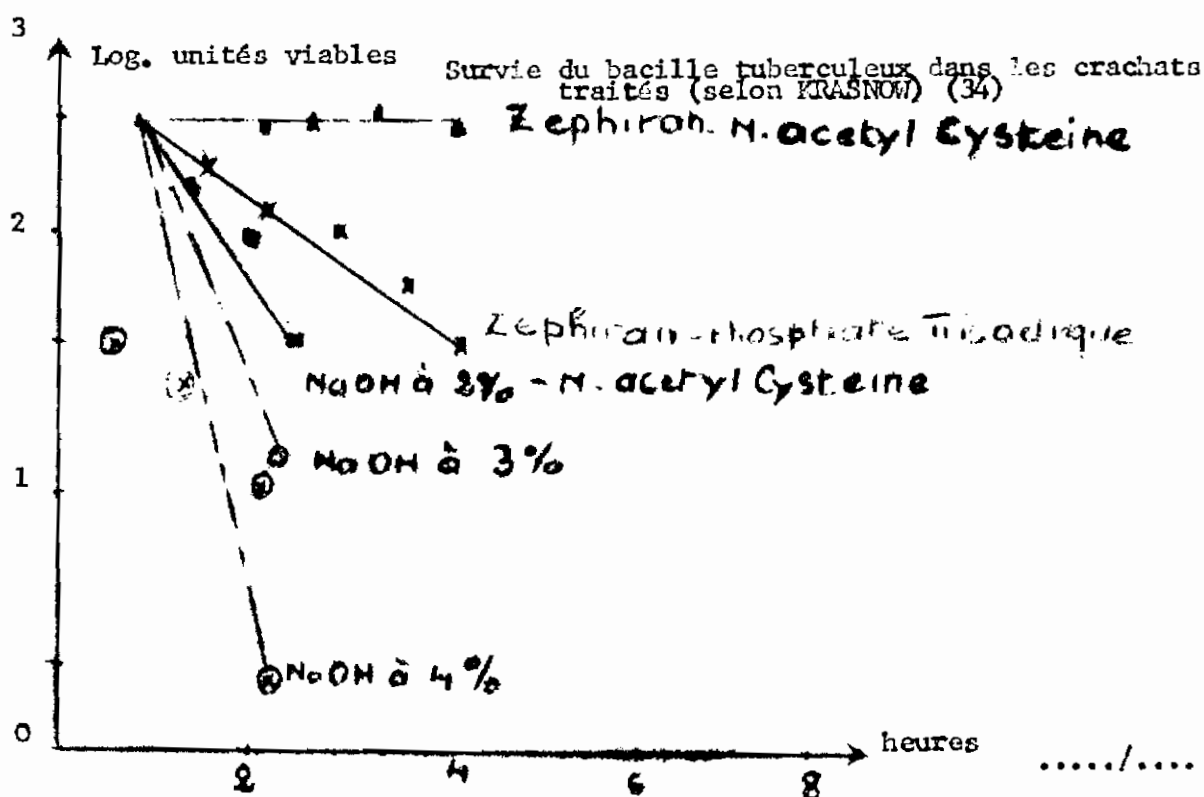
Technique :

Les crachats sont traités pendant 24 heures à l'étuve à 37°C par quatre fois leur volume de cetyl pyridinium à 1 % en eau distillée. Pour renforcer l'homogénéisation on procède à 5 ou 6 agitations manuelles durant l'incubation.

On centrifuge le mélange, on jette le liquide surnageant et le culot est repris par un faible volume d'eau distillée stérile. On ensemeince le produit final dans des tubes de milieu de culture à raison de quelques gouttes par tube.

Cette liste bien que longue demeure cependant incomplète. Les différentes méthodes énumérées ne répondent pas d'une manière satisfaisante au double impératif qu'exige une technique idéale à savoir détruire complètement la flore associée sans pour autant altérer la viabilité des mycobactéries. De nombreux auteurs ont essayé par des études comparatives de déterminer la méthode la moins toxique pour le bacille tuberculeux, mais ayant un pouvoir bactéricide élevé sur la flore associée.

KRASNOW (34) montre que la technique de PETROFF est la plus toxique pour le bacille tuberculeux. Pour cet auteur la survie du bacille tuberculeux varie en raison inverse de la concentration de soude employée. La technique la moins néfaste est la méthode par la N. acétyl cystéine associée au zéphiran.



TACQUET et TILSON (56) montrent la supériorité de la technique au lauryl sulfate après essais de 4 détergents différents.

L. SULA (50) arrive à la même conclusion.

LANGEROVA (35) après une étude comparative de 8 techniques différentes montre la supériorité de la méthode au lauryl sulfate. Il rappelle en outre que la technique doit être adaptée au milieu utilisé.

+ Incubation

Les tubes ensemencés sont mis à l'étuve à 37°C . Chaque tube porte une étiquette sur laquelle est mentionné le numéro distinctif et la date de mise en culture. Les tubes à vis sont légèrement desserrés , ou bouchés au coton et placés en position légèrement inclinée pour permettre l'évaporation de l'excès de liquide pendant 3 à 4 jours.

On ferme à fond les tubes après ce délai. On élimine les tubes contaminés et on regarde s'il y a croissance rapide de bactéries.

+ Lecture :

Les cultures maintenues à l'étuve sont examinées régulièrement tous les 15 jours . Il n'est pas nécessaire de le faire sortir trop souvent car leur végétation risque d'être troublée. On laisse incuber au moins pendant 6 semaines avant de les considérer comme négatives. L'incubation pendant 8 semaines est préférable (*M. africanum*)

+ Aspects cultureux des colonies :

Les mycobactéries excepté *M. leprae* donnent sur les milieux de culture des colonies dont l'aspect est caractéristique et variable d'un milieu à un autre. 15 jours à 30 jours après l'ensemencement parfois plus précocement on assiste à l'apparition de petites colonies lisses ou opaques et de couleur crème. L'étude systématique des types de colonies de mycobactéries a commencé à la suite d'un rapport de FREGNAN , SMITH et RANDALL (39) qui ont utilisé un milieu gélosé transparent (milieu de DUBOS acide oléique albumine gelose).

Peu de temps après FREGMAN et SITH (39) ont proposé une classification systématique des types de colonies en soulignant l'importance du choix des milieux. Ils ont employé les mots Smooth (lisse) et Rough (rugueux) suivis de symbole pour décrire les colonies.

Exemple " Rough CS" désigne une colonie rugueuse ayant une structure en corde. "Smooth S" désigne une colonie lisse avec un cône central qui devient graduellement plat vers la périphérie.

KUBICA et ALL (33) ont décrit la morphologie des colonies de mycobactéries sur milieux gelés à base de farine de maïs (Corn meal agar) et sur milieu gelé 7H₁₀ de MIDDLEBROOK. Les colonies de M. tuberculosis sur tous ces milieux ont les caractères suivants: elles sont sèches, rugueuses, friables, et se distinguent des colonies rugueuses des autres espèces, sans pour autant qu'il soit permis de faire un diagnostic de certitude.

.....

...../.....

III. INOCULATION AUX ANIMAUX DE LABORATOIRE

En 1865 VILLEMEN démontre chez le lapin et le cobaye, par inoculation du broyat de lésions tuberculeuses de l'homme sous la peau, que la tuberculose est inoculable provoquant chez ces animaux, l'apparition de tuberculose pulmonaire.

Dès 1884 à la suite des travaux de ROBERT KOCH, plusieurs tuberculoses spontanées d'animaux (presque toute les espèces animales à sang chaud) sont décrites. La réceptivité varie suivant les espèces animales. L'étude systématique des voies d'inoculation permet de définir trois modalités évolutives de la tuberculose expérimentale de l'animal.

- La tuberculose de type VILLEMEN qui évolue progressivement d'une seule tenue. On inocule le produit pathologique principalement par voie sous cutanée. La tuberculose se manifeste par l'apparition de nombreux tubercules dans les ganglions lymphatiques et les viscères de l'animal. L'exemple type de ce mode d'infection est la tuberculose expérimentale du cobaye par M. Tuberculosis.

- La tuberculose du lapin infecté par le bacille bovin, On assiste à une évolution par poussée progressive.

- L'inoculation par voie intra-veineuse du bacille aviaire cause la mort du lapin assez rapidement avec essaimage des germes dans tous les organes, sans tubercules apparents; c'est la tuberculose de type YERSIN.

1°) Inoculation au Cobaye

Le Cobaye est l'animal de laboratoire le plus sensible à l'infection tuberculeuse. Pour le diagnostic, deux animaux sont utilisés pour chaque produit pathologique. L'injection est sous cutanée, à la face interne de la cuisse droite.

a) Produits non contaminés

Un à deux ml. de produit sont inoculés sans autre traitement que la centrifugation si le produit est un peu fluide, ou la dilution par l'eau physiologique stérile s'il est trop épais (pus d'abcès froid).

b) Produits contaminés : (50)

Deux ml. de produit ou son culot de centrifugation, dilués si c'est nécessaire dans de l'eau physiologique, sont mis en présence de 1 cg. (maximum) d'auréomycine en poudre prélevée avec une spatule de platine.

On mélange à l'aide de la seringue destinée à l'inoculation par aspiration et refoulements.

Après 20 à 30 minutes de contact, par séjour dans la seringue, on inocule.

c) Inoculation avec addition de Quartz Micronisé (55)

Cette méthode augmente la sensibilité de l'animal aux produits paucibacillaires, aux mycobactéries peu pathogènes ou de virulence atténuée.

L'inoculation est pratiquée après contact avec l'auréomycine et avec addition de 1 ml. d'une suspension à 10 % dans l'eau stérile de quartz porphyrisé en particules inférieures à 3 microns.

d) Observation de l'animal

On doit observer les animaux pendant les premiers jours après l'inoculation.

- Intrademo-Réaction à la Tuberculine

Cette réaction est nécessaire pour s'assurer avant l'autopsie d'une éventuelle tuberculisation de l'animal, vu le long délai de mise en observation.

Technique :

On épile une partie du flanc de l'animal. On choisit une région bien propice qui permet une lecture facile. L'animal étant maintenu par un aide on pince la peau entre le pouce et l'index. Cette surface ferme et bien maintenue est prête pour l'injection intradermique. On utilise une seringue au 1/20^e de centimètre cube dite à "Tuberculine" et une aiguille de 6/10^e la plus courte possible n'ayant pas tendance à se courber.

...../.....

L'aiguille est enfoncée sous le derme de façon à avoir une papule bien visible. On injecte lentement 1/10^{ème} de ml. de tuberculine brute humanobovine diluée au 1/10^{ème}.

Lecture :

La lecture se fait après 24 à 48 heures. La positivité ne peut être déclarée que s'il y a escarre, c'est-à-dire une zone d'induration s'affirmant le 2^{ème} jour. Une Intra-Dermo-Réaction douteuse est considérée comme négative.

- Evolution de l'infection expérimentale

On distingue deux types d'infections selon la virulence des souches.

. Infection expérimentale à bacille tuberculeux de virulence normale

Infectés par exemple par voie sous cutanée, les Cobayes meurent en 4 ou 6 semaines, 10 à 14 jours après l'injection de bacilles vivants, un nodule puis une ulcération se développent au point d'inoculation. L'ulcère reste ouvert jusqu'à la mort de l'animal. A l'autopsie les ganglions tracheo-bronchiques, les ganglions régionaux et les ganglions lombo-aortiques sont hypertrophiés. A la coupe, on voit qu'ils sont remplis d'une substance nécrotique qui à l'apparence du fromage. A cause de cette apparence ce tissu nécrotique est appelé caséum. Des lésions petites, nodulaires d'une couleur gris-jaunâtre se trouvent dans les poumons, le foie et la rate. La rate est généralement très grosse.

. Infection expérimentale à bacilles tuberculeux de virulence diminuée

Deux éventualités se présentent :

+ Tuberculose généralisée mais spontanément régressive. De nombreuses variantes sont possibles: la mort peut survenir au cours de la phase d'excèsion initiale (premier mois) . La régression peut être partielle, une lésion viscérale unique évoluant à son propre compte. La régression enfin peut être complète .

+ Tuberculose non extensive : c'est-à-dire atteinte ganglionnaire locale à tendance régressive.

- Autopsie

L'autopsie permettra le diagnostic de l'infection intercurrente, responsable de la mort spontanée des animaux.

Technique de l'autopsie

L'Animal mort est couché sur le dos sur un plateau à autopsie dont les bords sont perforés. On attache les pattes en extension à l'aide de ficelles passées dans les trous. A l'aide de ciseaux, du pubis au cou on pratique quatre incisions radiales dans l'axe des pattes. En reclinant latéralement les fragments de peau, on dégage toute la face ventrale ainsi que la racine des membres. On examine les paquets ganglionnaires inguinaux, cruraux axillaires et on recherche l'existence d'un abcès au point d'inoculation. On procède ensuite à l'ouverture de la cavité abdominale en incisant la paroi musculaire suivant une ligne médiane allant du pubis à la pointe du thorax. Puis on coupe le diaphragme en suivant le bord antérieur du thorax et on ouvre le thorax en sectionnant de chaque côté du grill costal. Le plastron costal est finalement rabattu sur le cou de l'animal. On examine les plèvres, le péricarde, les poumons et les ganglions trachéo-bronchiques. On prélève la lésion la plus caséifiée pour faire un frottis qui sera coloré par la méthode de ZIEHL NEELSEN.

Conduite à tenir en pratique

- Avant l'inoculation : On effectue une intradermoréaction à la tuberculine chez les Gabayes neufs, pour s'assurer qu'ils ne sont pas déjà tuberculeux.

- Trois semaines après inoculation : On effectue une intradermoréaction à la tuberculine :

...../.....

. Intrademo Réaction positive : La tuberculisation est certaine. On sacrifie les animaux et on fait l'autopsie. Un frottis à partir du caséum est pratiqué pour s'assurer de la présence des B.A.A.R.

. Intrademo Réaction négative : On remet les animaux en observation pendant un délai de 1 mois.

+ Intrademo Réaction positive la tuberculisation est certaine. On sacrifie les animaux et on fait l'autopsie. On recherche la présence des B.A.A.R. sur un frottis du caséum ganglionnaire.

+ Intrademo Réaction négative la tuberculisation est très improbable. On sacrifie et on effectue l'autopsie des animaux qui seront habituellement trouvés indemnes de tuberculose .

Remarque :

La mort spontanée des animaux ne peut signifier une tuberculisation que si elle est confirmée par une adénopathie régionale caséuse et la présence de bacilles acido alcool résistants sur le frottis du caséum.

L'isolement de la souche du Cobaye devient inutile si la culture faite simultanément est positive, la souche sera dans le cas contraire isolée des ganglions locaux ou de la rate pour subir un titrage de résistance. L'ensemencement à partir de la rate ou des ganglions se fera après traitement de 30 minutes par H_2SO_4 à 4 % puis neutralisation par la soude à 6 % (60).

La tuberculose spontanée du Cobaye est rare. Elle est la conséquence d'une contamination accidentelle de l'animal. Son diagnostic est fait à partir de 2 éléments :

- l'absence de toute lésion au point d'inoculation et dans les ganglions satellites.

- la constatation de lésion au point de pénétration des bacilles et dans les ganglions satellites.

Dans le cas d'une contamination aérienne, on constate un chancre pulmonaire et une volumineuse adénopathie satellite trachéo-bronchique.

Dans le cas d'une contamination digestive, plus rare, on observe une adénopathie mésentérique (la lésion de pénétration intestinale peut être absente : par guérison rapide).

De pareils accidents peuvent être évités en plaçant les animaux dans des cages métalliques à parois pleines.

2°) Inoculation aux autres animaux de Laboratoire

Elle n'est intéressante que pour des études expérimentales et pour différencier mycobactérium tuberculosis des autres mycobactéries, en particulier mycobactérium bovis et de mycobactérium avium.

a) Le Lapin :

L'inoculation au lapin permet de différencier M. Tuberculosis avec une tuberculose spontanément régressive de M. bovis qui provoque une tuberculose d'évolution mortelle. On injecte 0,01 mg. sous 1 volume de 1 ml. (10) dans la veine marginale de l'oreille. Deux mois après l'inoculation, les animaux sont sacrifiés. A l'autopsie on note l'absence de toute lésion viscérale ou la présence dans les poumons de rares granulations non caséuses pour M. Tuberculosis. Inoculés avec des souches M. bovis les animaux meurent spontanément avant la fin du 2ème mois ou sont sacrifiés passé ce délai. A l'autopsie on note des lésions pulmonaires étendues caséuses. Les reins, le foie et la rate contiennent des granulations plus ou moins nombreuses souvent caséifiées.

Remarques : On inoculera 2 lapins afin de s'assurer que la virulence est normale. Si la virulence est atténuée l'inoculation au lapin ne représente plus un test discriminatif entre les souches de M. Tuberculosis et les souches de M. bovis.

Mycobacterium avium, inoculé par voie intraveineuse à la dose de 1 mg. provoque la mort du lapin en 10 à 25 jours dans un tableau de tuberculose de type YERSIN. A la dose de 0,001 mg. (10) il entraîne une tuberculose généralisée dont le tableau est proche de celui de l'infection à *mycobacterium bovis*.

b) Souris :

La souris est l'animal de choix pour l'étude de la chimiothérapie antituberculeuse. Son inoculation permet l'identification de *mycobacterium KANSASII*, *M. marinum* et *M. Ulcerans*.

On inocule 0,1 à 1 mg. sous un volume de 0,2ml dans l'une des veines marginales de la queue.

La rapidité d'évolution de la maladie est variable selon la race de souris, la dose inoculée et la virulence de la souche. Avec une souche de *M. tuberculosis* de virulence normale la mort survient habituellement avant un mois. A l'autopsie les lésions pulmonaires dominent. Sur les deux poumons on observe des granulations plus ou moins confluentes très riches en bacilles. La rate est hypertrophiée sans lésions habituellement visibles. Les autres viscères sont sensiblement normaux. Les lésions sont localisées au rein avec *M. Kansasii* ou aux pattes, et à la queue avec *M. marinum* et *M. ulcerans*.

c) La Poule :

L'inoculation à la poule permet l'identification de *M. avium*. On injecte avec une aiguille fine 0,1 mg. de bacilles sous un volume de 1ml. dans la veine humérale, au niveau de l'articulation huméro-radio-cubitale à la face interne de l'aile. On aura soin d'arracher les plumes de cette région. La mort de la poule survient en 10 à 25 jours avec un tableau de tuberculose généralisée type YERSIN.

Remarque : L'inoculation intraveineuse de doses plus faibles de bacilles ^{aviaires} entraîne l'apparition d'une tuberculose d'évolution chronique avec lésions viscérales multiples.

3°) Conclusion :

L'inoculation au Cobaye, longtemps considérée comme le moyen le plus sensible pour l'isolement du bacille tuberculeux n'est plus de nos jours la méthode de choix pour le diagnostic de la tuberculose, depuis la découverte des antibiotiques comme l'I.N.H., et la mise en évidence de souches I.N.H. résistantes ayant un pouvoir pathogène atténué pour le Cobaye. Pour cette raison la culture est préférable à l'inoculation au Cobaye. Mais elle n'est pas inutile et complète heureusement la culture. Elle est indiquée dans les cas de tuberculose très pauci bacillaire L.C.R. (meningites) et liquide de suffusion des cavités pleurales (pleuresies) et abdominales (péritonites) où les souches I.N.H. résistantes sont rares, dans tous les cas où l'on craint de ne pouvoir isoler facilement la souche (souche très dysgonique, souche mixte: mélange de bacille tuberculeux et de mycobactéries atypiques etc...) , dans le cas des produits pathologiques où la surinfection est particulièrement forte (pseudomonas, protéus) (39); ce qui se rencontre dans les centres hospitaliers spécialisés dans le traitement de la pathologie bronchopulmonaire chronique, et pour l'étude de la virulence.

...../.....

IV. CARACTERES BIOCHIMIQUES

Cinq caractères principaux sont à recherche :

- Présence de la catalase à 22° et 70° C.
- Présence de la peroxydase
- Production d'Acide nicotinique
- Réduction des nitrates
- Transformation du citrate de fer Ammoniacal .

A) Recherche de la Catalase à 22° et 70° C.

Toutes les mycobactéries présentent une activité catalasique qui peut être mise en évidence par simple addition d'une goutte d'un mélange à parties égales (V/V) de Tween 80 à 10 % dans l'eau et d'eau oxygénée à 110 vol. à une culture. Cette recherche doit se faire sur des cultures jeunes de moins de un mois. Les catalases sont des enzymes solubles, intracellulaires. Il existe différents types de catalase que l'on peut distinguer par leur sensibilité thermique.

- Test

. Matériel :

Pipettes PASTEUR ou pipettes de 1 et 5 ml. stériles.

Tube à essai à vis

Bain Marie ou bloc sec de température

Anse de platine.

. Réactifs :

Solution à 30 % (ou 110 v.) d'eau oxygénée (Superoxol)
(perhydrol). (Conserver au Frigidaire)

Solution à 10 % de tween 80. Stériliser à 120 °C pendant 10 mn.
et conserver au frigidaire .

...../.....

. Substrat :

On mélange extemporanément 1^l eau oxygénée et la solution de tween 80 à volume égal.

. Tampon phosphate M/15 pH 7

On mélange 61,1 ml. de M/15 phosphate disodique (9,47g. de $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$) dans 1000 ml. d'eau distillée avec 38,9 ml. de M/15 phosphate monopotassique (9,07g. de $\text{K H}_2\text{PO}_4$ dans 1000 ml. d'eau distillée)

- Techniques:

. Test qualitatif à la température de la pièce.

A la culture sur milieu solide on ajoute une à 2 gouttes du mélange de tween 80 eau oxygénée. On doit observer la formation de bulles au bout de 5 minutes.

. Test à pH 7 70°C et à la température du laboratoire

A l'aide d'une pipette stérile on met 0,5 ml. de Tampon phosphate M/15 pH 7 dans 2 tubes à essais à vis.

Avec une anse prélever les colonies du milieu de LOWENSTEIN-JENSEN et faire une suspension dans le tampon.

Ensuite placer un des tubes au bain marie chauffé à 68°-70°C pendant 20 mn. (le temps et la température sont importants). On laisse le 2ème tube à la température de la pièce.

Retirer le tube du bain marie et laisser refroidir à la température du laboratoire. On ajoute 0,5ml. du mélange tween 80 eau oxygénée, dans chaque tube.

On doit observer la formation de bulles à la surface du liquide.

- Lecture:

Le test semi quantitatif de WAYNE (39) basé sur la hauteur de la colonne de mousse produite au cours de l'activité catalasique permet une distinction entre les différentes espèces de mycobactéries.

Pas de mousse : Catalase 0
 Hauteur inférieur à 4 cm. : Catalase +
 Hauteur de plus de 4 cm. : Catalase +

b) Recherche de la Peroxydase :

La peroxydase est un enzyme qui catalyse des oxydations à partir de l'eau oxygénée . L'activité enzymatique se manifeste par un noircissement des colonies si elles sont mises en contact avec l'eau oxygénée et d'un substrat oxydable (Catéchol, benzidine etc...)

. Matériel :

Pipettes PASTEUR ou Pipettes de 1 et 5 ml. stériles.
 Anse de platine.

. Réactifs :

Solution de benzidine à 1 % dans l'acide acétique normal(6%)
 Eau oxygénée à 1 % (0,5 ml. de H_2O_2 à 110 v. dans 14,5 ml.
 d'eau distillée)

Tampon acétate à 0,2 M à pH 4 50 ml.
 Acide acétique pur ... 1 ml.
 Eau distillée.....85 ml.
 Acétate de soude.....29,72ml.
 Eau Distillée.....100 ml.

41 ml. de la solution sont ajoutés à 9 ml. de :

Catéchol à 2 %..... 10 ml.
 Eau oxygénée à 1 % 5 ml.

- Méthode de la Benzidine

Technique :

On dépose à la surface d'une culture jeune sur LOWENSTEIN JENSEN
 0,5 ml. de la solution de Binzidine et 0,5 ml. d'eau oxygénée.

La lecture se fait après 10 mn. de contact.

+ Colonies bleu-noires: Peroxydase +
 + Colonies incolores : Peroxydase 0

...../.....

- Méthode au Catéchol

Technique :

A la surface d'une culture jeune sur ~~LEWENTZON~~ JENSEN . On dépose 1 ml. de mélange des 3 derniers réactifs préparé extemporanément.

La lecture se fait après 24 h. de contact.

- + Colonies noires : Péroxydase +
- + Colonies incolores : Péroxydase 0.

Remarque :

La recherche simultanée des activités catalasique et peroxydasique se fait avec le réactif de BOGEN.

Technique :

Dans 2 tubes à hémolyse contenant 0,1ml. d'eau distillée stérile on introduit une anse plane de colonies jeunes. Porter l'un des tubes au bain marie à 70°C pendant 15 mn. et le refroidir aussitôt . Introduire dans chaque tube 1ml. de la solution de BOGEN.

Pyrocatechine..... 0,1g.
 Eau oxygénée 110 v..... 0,5ml.
 Eau distillée.....100 ml.
 Tween 8C..... 1,25 ml.

La solution se conserve 2 semaines au frigidaire . Les tubes sont laissés à la température du laboratoire. Après une heure de contact noter la hauteur de mousse.

- Pas de mousse : Catalase 0
- Simple couronne de mousse catalase +
- Hauteur de mousse de 1 à 5 mm. : Catalase +

La coloration du culot bacillaire

- Culot brun-rouge : Péroxydase +
- Culot incolore ou légèrement rosé : Péroxydase 0.

Examiner le culot une seconde fois vu que certaines souches sont tardives à manifester leur activité peroxydasique.

C) Test de la Niacine (Réaction de KONNO)

POPE et SMITH (30) ont remarqué au cours des recherches sur la biosynthèse des vitamines du Groupe B que la quantité d'acide nicotinique qui s'accumule dans les filtrats de culture de M. Tuberculosis est supérieure à la quantité obtenue avec M. bovis. Par d'autres études on s'est rendu compte que M. Tuberculosis produisait de la niacine en quantité supérieure à celle produite par les autres mycobactéries. Cette accumulation de Niacine a été adoptée comme test diagnostique pour l'identification de M. Tuberculosis. Actuellement le test à la Niacine est le test de routine le plus utilisé en mycobactériologie.

Méthode I

. Matériel :

Tubes à essai à vis stériles.

. Réactifs

Eau distillée stérile , ou solution saline physiologique

Solution à 4 % d'aniline .

Ajouter 40 ml. d'aniline incolore à 960 ml. d'Alcool éthylique à 95 °C.

Solution à 10 % de bromure de cyanogène

Dissoudre 5 g. de bromure de cyanogène dans 50 ml. d'eau distillée.

Conserver dans un flacon, au frigidaire . Si un précipité se forme au refroidissement, chauffer à la température de la pièce pour le remettre en solution

. Technique :

Contrairement à la recherche de la catalase et de la peroxydase le test à la niacine se fait sur des cultures d'au moins 4 semaines sur milieu de LOWENSTEIN-JENSEN . Ajouter à la culture 1 ml. d'eau distillée ou de solution saline physiologique stérile. Briser la masse cellulaire en cas de colonies confluentes

...../.....

.....pour faciliter l'extraction de la Niacine qui est extracellulaire .
 Incliner le tube afin que le liquide couvre toute la surface de la culture.
 Laisser se faire l'extraction pendant au moins 60 mn. Prélever 0,5 ml. de l'ex-
 trait et transférer dans un tube à essai à vis.

Ajouter 0,5 ml de la solution d'aniline. Celle-ci doit être incolore.
 Ensuite ajouter 0,5 ml. de la solution de Bromure de cyanogène. La formation d'u
 couleur jaune est révélatrice.

Méthode II.

Méthode avec les bandelettes réactives.

Procéder comme pour la méthode I : Introduire dans le tube à essai
 contenant l'extrait de culture et la solution d'aniline la bandelette avec la
 flèche dessous. Visser immédiatement le tube . La coloration du liquide en
 jaune signe une réaction positive.

SCHEMA DE LA REACTION DE MISE EN EVIDENCE DE LA NIACINE

avec les bandelettes réactives le bromure de cyanogène est remplacé par le
 chlorure de cyanogène. (Chloramine T + thiocyanate de K. chlorure de cyanogène)

④ Réduction des nitrates :

Les bactéries possédant une nitrate réductase réduisent les nitrates en
 nitrites (NO_3 NO_2) .

...../.....

VIRTANEN (10) a étudié la capacité des mycobactéries à réduire les nitrates en nitrites. D'après ses observations les mycobactéries présentent des différences sur le plan quantitatif dans leur pouvoir de réduction. Ce qui pourrait être utilisé pour leur identification en particulier M. Tuberculosis réduit fortement le nitrate alors que M. bovis donne une réaction négative ou très faible.

. Matériel

- Tubes à essai à vis :
- Pipettes PASTEUR stériles, ou pipettes de 1 et 5 ml. stériles.
- Anse de platine
- Bain-Marie à 37°C ou bloc sec à température constante.

. Réactifs :

- Substrat : 0,01 M nitrate de sodium dans 1/45^M tampon phosphate
pH 7.

Na NO₃ 0,85 g.
 KH₂ PO₄ 0,117 g.
 Na₂ HPO₄, 12H₂O 0,485 g.
 Eau distillée..... 1,000 ml.

- Réactif n°1. une dilution à 1/2 d'acide chlorhydrique dans l'eau (10 ml. Hcl, + 10 ml. d'eau)
- Réactif n° 2. 0,2mg. de sulfanilamide dans 100 ml. d'eau distillée.
- Réactif n°3 . 0,1g. de bichlorhydrate de N-(1-naphtyl éthylène-diamine dans 100 ml. d'eau distillée)

Conserver le substrat et les réactifs à l'obscurité au frigidaire .

Si un précipité se forme ou s'il y a changement de couleur , jeter.

. Technique :

La recherche de la nitrate-reductase se fait sur des cultures jeunes de moins de un mois.

Dans un tube à essai stérile contenant 2 à 3 gouttes d'eau, on introduit une anse pleine de culture (10mg.) prélevée à la surface du milieu de culture solide. On ajoute 1ml. de la solution de Na NO_3 stérilisée à l'autoclave.

On agite pour bien mélanger et ensuite on porte à l'étuve pendant 2 heures.

On ajoute une goutte de HCl, 2 gouttes de sulfanilamide . 2 gouttes de bichlorhydrate de N-alpha naphthyl éthylène diamine.

On doit observer un virage à la couleur rouge. S'il y a virage au rouge le test est positif. L'intensité de la coloration peut aller du rose (+) au rouge foncé (5+) comparativement à un étalon.

Si aucun changement de couleur ne se produit, ou bien le test est négatif ou bien il y a réduction des nitrites. Pour confirmation on ajoute un peu de poudre de Zinc au mélange de la réaction. Le Zinc réduit chimiquement le nitrate en nitrite. On observe une réaction vraiment négative qui se manifeste par un virage au rouge dès que le réducteur est ajouté.

e) Transformation du citrate de Fer Ammoniacal (C.F.A.)

Certaines Mycobactéries ont la propriété d'accumuler les sels de fer et de les transformer en oxydes de fer de couleur brune.

. Technique :

On place au fond d'un tube de milieu LOWENSTEIN-JENSEN ensemené au préalable avec 0,1mg. de la souche à tester, 1 ml. d'une solution de citrate de fer ammoniacal à 40 mg./ml., stérilisée à l'autoclave. Ensuite incubé à 37°C en position verticale.

. Lecture :

Test positif : après un délai de une à 3 semaines on observe une coloration brune d'environ 10 mm. qui s'étend sur le milieu de culture au dessus du niveau liquide.

f) Aryl Sulfatase

Les arylsulfatases sont des enzymes qui hydrolysent les composés de formule générale $R-C-SO_3H$ dans lesquels le radical R a une structure aromatique.

. Substrat

- Solution à 0,08 M. de disulfate de phénolphthaléine tripotassique filtrée . Conserver au frigidaire .

. Milieu :

- 200 ml. de milieu de DUBOX

Pour le test à 3 jours ajouter 2,5 ml. de la solution 0,08 M de substrat à 200 ml. de milieu.

Pour le test à 2 semaines, ajouter 7,7 ml. de la solution 0,08 M. de substrat à 200 ml. de milieu .

Répartir stérilement à raison de 2 ml. par tube à essai stérile.

. Réactif :

- Carbonate de sodium 2 N.

. Technique

Ensemencer un tube de chaque milieu avec une anse pleine de culture jeune en milieu solide. Incuber à l'étuve à 37° C. Après 3 jours à l'étuve ajouter au tube du test à 3 jours seulement 6 gouttes de la solution de carbonate de sodium.

Après 2 semaines opérer de même pour l'autre culture.

. Résultats :

L'apparition d'une couleur rose (1+) ou rouge (5+) indique une réaction positive. Comparer l'intensité de la couleur à l'étalon.

g) Hydrolyse du tween 80 :

DAVIS et DUBOS (60) ont montré que les mycobactéries possèdent des enzymes capables de libérer, par hydrolyse de l'acide oléique à partir du dérivé polyoxyéthylénique du monooleate de sorbitan (Tween 80)

. Substrat :

Solution de M/15 tampon phosphate , à pH 7 de Tween 80 et 0,1 % de rouge neutre dans les proportions respectives 100 ml, 0,5ml. et 2ml.

Le tween 80 doit être dilué dans le tampon avant d'ajouter la solution de rouge neutre.

Distribuer 2 ml. dans des tubes à essai à vis ~~scoriles~~. Stériliser à l'autoclave pendant 10 mn. à 120 ° C. Le liquide doit être d'une couleur ambre.

Conservation du substrat: 2 semaines à l'obscurité et au frigidaire.

. Technique :

Ajouter une anse pleine de culture au substrat et ~~emulsionner~~ . Incuber à l'étuve à 37°C.

. Résultats :

Une couleur rose à rouge , indique une réaction positive.

Lecture à 24 h, 5 jours et 10 jours. Ne pas secouer les tubes pendant la lecture.

h) Phosphatase Acide (KAPPLER)

. Tampon

0,2 M. Acide acétique (1)

0,2 M. Acétate de sodium (2)

à 14,5 ml. de (1) ajouter 85 ml. de (2) . pH. 5,4. On stérilise à l'autoclave pendant 30 minutes.

. Substrat :

Pour 100 ml. de tampon ajouter 100 mg. de phosphate de colamine phénolphtaleïne. Conservation : 6 semaines à + 4° C.

. Réactif :

- Carbonate de sodium à 10 % (Na_2CO_3)

. Technique :

Dans 0,5 ml. de substrat on introduit 10 mg. de germes et on porte à l'étuve 2 heures à 37° C.

Ajouter 0,5 ml. de la solution de carbonate de sodium.

. Résultats

L'apparition d'une couleur rouge indique une réaction positive.

i) Uréase en Milieu Urée-indole. Substrat

Solution urée-indole

. Technique :

Dans un tube stérile renfermant 0,2 ml. de la solution urée-indole on ajoute environ 10 mg. de cultures. Incuber à 37° C pendant 2 heures, et 18 heures.

. Résultat :

Le développement d'une couleur rouge indique une réaction positive.

j) Béta - Glucosidase. Substrat :

On fait dissoudre 300 mg. de P- nitrophényl Béta-D Glucoside dans 100 ml. de Tampon . pH 7,0. Conservation : 2 Semaines à + 4°C.

. Technique :

On met 0,5 ml. de Substrat dans un tube à essai , on mélange ensuite 10 mg. de culture prélevé à la surface du milieu solide à l'aide d'une anse à platine calibrée. On met à l'étuve à 37° C pendant 3 heures.

. Résultats

Le Développement d'une couleur jaune indique une réaction positive.
Comparer l'intensité de la couleur avec l'échelon.

V. CLASSIFICATION

A/ NOMENCLATURE :

Les Mycobactéries appartiennent à la famille des mycobactériaceae, ordre des actinomycétales, classe des schizomycètes. La famille contient un seul genre: le genre mycobactérium qui comprend de nombreuses espèces. L'espèce type est mycobactérium tuberculosis (LEHMAN et NEWMAN . Holotype M.Tuberculosis Souche H₃₇ RV déposé à l'américan type culture collection.N° ATCC 27294) (39)

B/ HISTORIQUE

Lorsqu'en 1832 R. KOCH décrivit le bacille qu'il venait d'observer dans les lésions d'origine humaine, bovine, aviaire, il attribuait au même agent étiologique les trois formes de la maladie. L'amélioration des méthodes de coloration a permis de mettre en évidence le caractère ubiquitaire des B.A.A.R. . ZAHN en 1834 (66) fut le 1er à attirer l'attention sur la présence dans les crachats d'un sujet non phthisique d'éléments microbiens ayant le même aspect que le bacille tuberculeux et résistant comme lui à l'action des acides . RIVOLTA en 1809, MAFUCCI en 1890 démontrent la spécificité de l'infection aviaire et R. KOCH déclare en 1890 au congrès international de Médecine de Berlin :

" Je n'hésite pas à considérer les bacilles de ^{la} tuberculose des poules comme une espèce à part, quoique très rapprochée des vrais bacilles de la tuberculose".

En 1896 THEOBALD SMITH différencie le bacille humain du bacille bovin en raison des divergences existant entre les propriétés culturales et le pouvoir pathogène expérimental des 2 micro-organismes.

MOELLER (60) au cours d'études épidémiologiques systématiques, isole en l'espace de trois années plusieurs mycobactéries. Donc 20 ans après la découverte du bacille tuberculeux de nombreuses espèces ont été décrites et le genre mycobactérium créé par NEWMANN en 1896 compte d'une part les bacilles responsables des tuberculoses humaine, bovine, aviaire, et d'autre part de nombreux bacilles acido alcool résistants ubiquitaires. Si certains d'entre eux sont naturellement pathogènes pour l'animal, aucune des espèces repertoriées jusqu'alors, ne se montre capable de provoquer chez les mammifères une maladie tuberculeuse progressive. Sur la base de ces différences, MARCOWITZ (60) propose en 1901 au congrès international de Londres, de distinguer les bacilles tuberculeux (humain bovin, aviaire) des bacilles paratuberculeux habituellement saprophytes. Ce dernier groupe de 1900 à 1950 va s'enrichir de nouvelles espèces et devenir comme l'écrivait HAUDUROY (26) " une sorte de dépôt dans lequel on rejette tout ce qui ne répond pas aux normes classiques, tout ce qui n'est pas le bacille de KOCH authentique". Cependant au cours de cette période, de nombreuses observations cliniques démontreront que la présence de ces germes dans des produits pathologiques ne doit pas être systématiquement considérée comme une souillure. Ainsi va se dégager la notion de pathogénicité pour l'homme. De nombreux travaux, FELDMAN en 1943 (19) DIETRICH en 1899 (60) LAPORTE en 1940 (60) etc...) ont signalé la présence de tels micro-organismes dans de nombreux prélèvements. Une étape importante est franchie quand en 1946 HAUDUROY (60) au terme d'un inventaire conclut " il est possible d'affirmer que quelques rares bacilles paratuberculeux sont virulents pour l'homme, provoquant chez lui des infections diverses de gravité minime dans l'ensemble".

BUHLER et POLLAK (6) en 1953 à Kansas city ont été les premiers à prouver de façon indubitable le rôle pathogène certain des bacilles paratuberculeux.

..../.....

Ils ont montré qu'il existait des mycobactéries différentes des bacilles tuberculeux humain et bovin non pathogènes pour le Cobaye (60) mais susceptibles de déterminer chez l'homme des maladies qu'on ne pouvait sur le plan clinique radiologique et anatomopathologique différencier de la maladie tuberculeuse classique.

AGIUS (2) rapporte en 1956 les premières observations d'adenites à "mycobactéries atypiques". KAPLAN (60) en signale deux cas en 1956, puis NOUFLARD (60) en diagnostique 21. Des ostéites chroniques récidivantes, provoquées par des bacilles distincts de *M. Tuberculosis* et de *M. bovis* sont décrites par WEED en 1956 (63). Dès lors le pouvoir pathogène des bacilles paratuberculeux se trouve clairement démontré et les observations cliniques dans lesquelles ils sont reconnus comme étant les seuls agents étiologiques, se multiplient. Tous les organes peuvent être atteints et PENCO (63) en 1956, au colloque international d'Anvers, propose de regrouper les formes cliniques observées sous le terme de Mycobactérioses. A partir de cette époque les recherches sont orientées de telle sorte que, au moyen de test biologique on puisse obtenir une identification précise des différents micro-organismes et par là avoir le moyen de les faire entrer dans le cadre de la taxonomie bactérienne.

En 1950 PENCO propose une classification qui du fait de sa complexité n'a pas reçu d'applications pratiques.

ZELLER et OWEN (67) une année après étudient de façon systématique les systèmes enzymologiques des mycobactéries.

YOUNANG de 1953 à 1956 étudie le métabolisme du bacille tuberculeux. DREA et ANDRESJEW (18) en 1953 font la synthèse des connaissances acquises depuis 30 ans sur le métabolisme du bacille tuberculeux. La même année WHITE HEAD (64) met au point la technique de recherche de l'activité arylsulfatase des mycobactéries. En 1956 KONNO (31) décrit le Niacin Test. BONICCE (5) en 1958 met en évidence les différences d'activité de l'acide thiophene 2-carboxylique (T.C.H) sur les souches de bacilles tuberculeux bovin et humain.

En 1959 RUNYON regroupe les différents cas d'infections humaines indubitables et propose une classification simple. Il distingue quatre groupes de mycobactéries qu'il appelle atypiques ou anonymes. Cette classification établie sur des critères souvent subjectifs, parfois inconstants ou variables ne répond pas aux exigences de la taxonomie internationale. Elle a eu cependant malgré ces imperfections, le mérite d'être la première classification simple ou suffisamment exacte pour canaliser les recherches biologiques. BONICIE décrit en 1960 (60) le spectre antidasique des mycobactéries, et VIRTANEN (60) étudie la même année leur aptitude à utiliser et à transformer les nitrates. En même temps ANDREJEV (60) montre d'importantes variations de l'activité lipasique au sein des différentes espèces. Il étudie également l'activité peroxydasique des mycobactéries.

C.- CLASSIFICATION

Les mycobactéries les plus fréquemment rencontrées dans les produits pathologiques peuvent être classées en deux grands groupes excepté *M. Laprae* qui ne cultive sur aucun milieu synthétique.

a) Mycobactéries tuberculeuses :

Elles sont responsables de la tuberculose humaine

- *M. Tuberculosis* ou bacille tuberculeux humain

- *M. Bovis* ou bacille bovin il a un pouvoir pathogène égal à celui de *M. Tuberculosis*;

- *M. africanum*.

CASPERIS, BOISVERT, GRUMBACH, BRUNGL et RIST en 1968 (11) attire l'attention sur un type de bacille tuberculeux. Trouvé en Afrique qui pourrait être intermédiaire entre *M. Tuberculosis* et *M. Bovis*. Il s'agit de souches donnant sur milieu de LOWENSTEIN-JENSEN des cultures très dysgoniques, faites de colonies mates, très plates, non pigmentées. Elles sont niacine (-), nitrate (-), sensibles au T.C.H., ce qui joint à la dysgonie, les rapproche de *M. Bovis*.

Mais elles sont sensibles au pyrazinamide, ce qui joint à leur aspect net, les rapproche de *M. Tuberculosis*. Elles sont de virulence très diminuée, tant pour le lapin que pour la Cobaye. Ces souches ont été isolées de cas de tuberculose pulmonaire sans caractères particuliers. Elles sont fréquentes au Sénégal (25 à 45 %) à Yaoundé (74 % en 1973) à Accra (8 sur 10 en 1967) à Kigali (66%) à Butave 32 % au Mali 33% en 1974 (22)

- Le B.C.G. (Bacille de CALMETTE ET GUERIN) : il est souvent isolé d'adénopathies et d'abcès après vaccination par le B.C.G.

- Les souches de *M. Tuberculosis* et *M. Bovis* I.N.H. résistantes dont les caractères diffèrent de ceux des souches normales dites "souches sauvages".

b) Mycobactéries non Tuberculeuses

Ce sont des mycobactéries saprophytes qui sont occasionnellement pathogènes pour l'homme. Ces bacilles ne sont considérés comme responsables de l'affection en cause que s'ils sont isolés à plus d'une fois et en grand nombre.

TABLEAU n° : CLASSIFICATION DES DIFFERENTES ESPECES DE MYCOBACTERIES

MYCOBACTERIE TUBERCULEUSES	MYCOBACTERIES NON TUBERCULEUSES DITES " ATYPIQUES "	
Responsables de la Tuberculose de l'homme	Peuvent être responsables d'affections viscérales ou Ganglionnaires.	Pouvant être respon- sables d'ulcérations cutanées .
- M. TUBERCULOSIS	- M. KANSASII	- M. MARINUM DU BALNEI
- M. BOVIS	- M. SCROFULACEUM	- M. ULCERANS
- M. AFRGANUM	- M. XENOPI	Pratiquement jamais pathogène.
	- M. AVIUM	
	- M. INTRACELLULAIRE OU RATTEY	- M. AQUAE
	- M. FORUITUM OU MINETTI	- M. TERRAE ou "RADISH"

Selon les affections qu'elles provoquent chez l'homme on distingue :

- les Mycobactéries atypiques responsables d'affections viscérales et ganglionnaires.

- les Mycobactéries atypiques responsables d'ulcérations cutanées.

Cette distinction purement étiologique permet l'orientation du diagnostic bactériologique.

1^o) Mycobactéries atypiques responsables d'affections profondes et Ganglionnaire

RUNYON les a classés en quatre groupes :

. Groupe I : PHOTOCHROMOGENES

La pigmentation des Mycobactéries photochromogènes n'apparaît qu'après exposition à la lumière. L'espèce type de ce groupe est mycobactérium Kansasii responsables d'affections pulmonaires (poumons silicotiques) et parfois ganglionnaires.

. Groupe II: SCOTOCHROMOGENES

Ce sont des Mycobactéries qui donnent des colonies dont la pigmentation apparaît même à l'abri de la lumière.

Dans ce groupe on range :

- Mycobactérium scrofulaceum, responsable d'adénites de l'enfant
- Mycobactérium aquae contaminant de laboratoire banal qui n'est pratiquement jamais pathogène quelques cas d'atteinte pulmonaire ont cependant été signalés (10)

Groupe III : NON CHROMOGENES :

Les Mycobactéries atypiques non chromogènes donnent des colonies non pigmentées aussi bien à l'obscurité qu'après exposition à la lumière.

Dans ce groupe on range

- M. Avium ou bacille tuberculeux aviaire
- M. intracellulare ou Battey.

...../...

Ces 2 espèces, très voisines, sont responsables d'affections pulmonaires ganglionnaires et parfois osseuses.

- M. TERRAE : espèce non pathogène, est très fréquemment rencontrée. On tend aussi à ranger dans ce groupe une Mycobactérie scotochromogène qui a par ailleurs les caractères des bacilles du groupe des non chromogènes.

- M. Xenopi : responsable d'affections pulmonaires.

Groupe IV à CROISSANCE RAPIDE

Ce sont des mycobactéries dont la croissance à 37° C est très rapide. Elles donnent des colonies très nettes en 4 à 7 jours. Ce groupe est représenté principalement par :

- M. Fortuitum ou minetti responsable d'abcès profonds et parfois d'affections ganglionnaires.

2°) Mycobactéries "atypiques" responsables d'ulcération cutanée.

Ces mycobactéries ont comme caractère essentiel de ne pas cultiver à 37° C mais entre 20° et 30°C.. Les mycobactéries de ce groupe sont :

- M. Marinum: Photochromogène, à croissance rapide saprophyte des eaux, responsable dans les pays tempérés d'ulcérations cutanées superficielles contractées après baignade dans certaines piscines.

- M. Ulcerans : Scotochromogène, ou non chromogène, à croissance lente, responsable d'ulcérations cutanées profondes à tendance phagadenique dans les pays tropicaux.

...../.....

TABLEAU n° 3 : CLASSIFICATION DE RUNYON

G R O U P E	D E S C R I P T I O N
I ou des PHOTOCHROMOGENES	Croissance lente. La masse cellulaire est non pigmentée. Si la culture a été faite à l'obscurité, elle devient jaune orange en 6h. à 24h. Si la culture jeune est illuminée avec de la lumière visible.
II ou des SCOTOCHROMOGENES	Croissance lente. La masse cellulaire est pigmentée en jaune ou orange même si la croissance a lieu à l'obscurité.
III ou des NON CHROMOGENES	Croissance lente en général absence de pigmentation possibilité d'accumulation lente de pigment avec certaines cultures anciennes.
IV ou des " CROISSANCE RAPIDE "	Croissance en moins de 7 jours

TABIEAU n° 1 : PRINCIPAUX CARACTÈRES D'IDENTIFICATION DES MYCOPLASMES

ESPECES	C F M	Groupe de RUMYON	Niacine	Nitrate-réduct.	Catalase (°C)		Uréase	Hydrolyse du Tween 80	β-Désoxy- glucosidase	Croissance en présence de T C H	Signifi- cation clinique
					22°	58°					
M. Tuberculosis	-	Méant	+	3 +	+	-	+	±	±	+	+
M. Jovis	-	Méant	-	-	+	-	+	-	-	-	+
M. africanum	-	Méant	±	-/+	+	-	±	±	±	±	+
M. parium	-	I	+	-	+	-	+	+	+	+	+
M. kansasii	-	I	-	3 +	+	+	-	+	-	+	+
M. Scrofulaceum	-	II	-	±	+	+	+	-	±	+	+
M. Gordonae	-	II	-	-	+	+	-	+	-	+	-
M. Flavescens	-	II	-	3 +	+	+	-	+	+	+	-
M. szulgai	-	II	-	3 +	+	+	+	-	+	+	+
M. avium-intra- cellulaire	-	III	-	-	+	+	-	+	-	+	+
M. gastri	-	III	-	-	+	-	+	+	-	+	-
M. terrae	-	III	-	3 +	+	+	-	+	+	+	-
M. triviale	-	III	-	3 +	+	+	±	+	±	+	-
M. xenopi	-	III	-	-	+	+	-	-	-	+	+
M. fortuitum	+	IV	-	3 +	+	+	±	±	±	+	+
M. chelonae	-	IV	±	-	+	+	+	-	-	+	+
M. ulcerans	-	Méant	±	-	+	+	-	-	-	-	+

V. TESTS DE SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

La méthode utilisée est la méthode des proportions décrite par CANETTI RIST et GROSSET (9) . C'est une méthode simple bien codifiée et facile à manier pour peu que certaines conditions techniques soient respectées. Elle a 2 variantes ; l'une rapide se fait sur les produits pathologiques riches en bacilles (permet un gain de 3 à 4 semaines) l'autre, lente, nécessite au préalable une primo culture. Le principe du test, le milieu de culture utilisé et l'interprétation des résultats sont les mêmes dans les deux cas.

A.- PRINCIPE DE LA METHODE

Elle consiste à mesurer la proportion de bacilles résistants qui existent au sein d'une souche de mycobactéries. La méthode indique le nombre total de bacilles ensemencés et le nombre de bacilles résistants présents parmi la population bacillaire. On ensemence trois dilutions bacillaires 10^{-1} , 10^{-3} , et 10^{-5} sur milieu de LOWENSTEIN-JENSEN avec antibiotiques incorporés avant coagulation. Les tubes contiennent 7 ml. de milieu. Ces dilutions sont choisies de manière que l'une d'entre elles donne naissance à des colonies en nombre comptable. Une comparaison entre le nombre de colonies apparues sur les milieux avec antibiotiques (bacilles résistants) et le nombre de colonies obtenu sur le milieu sans antibiotique (population bacillaire totale) donne la proportion de bacilles résistants qui existe dans la souche testée. En deçà d'une certaine proportion dite proportion critique, la souche est classée comme sensible, au delà, elle est considérée comme résistante.

B) CHOIX DU TEST

Le choix du test dépend de la richesse en bacilles des expectorations examinées au microscope. Les produits pauci bacillaires sont mis en culture, et à partir de cette primo culture se fera le test indirect. Les produits montrant plus d'un bacille par champ feront l'objet d'un test direct après décontamination.

...../.....

C/ PREPARATION DES DILUTIONS BACILLAIRES - ENSEMENCEMENT

- Antibiogramme indirect

1°) Préparation des dilutions bacillaires :

On prélève avec un spatule en platine de 12 X 6 mm. des parcelles d'un grand nombre de colonies de cette culture. Le prélèvement bacillaire est mis dans un ballon stérile de 5 cm. de diamètre contenant une trentaine de bille de verre de 3 à 5 mm. de diamètre. On agite le ballon pendant 20 à 30 secondes puis on ajoute 5 ml. d'eau distillée ~~est~~ stérile. On agite encore. La suspension bactérienne est prélevée et placée dans un tube de 22 mm. de diamètre. L'opacité de la suspension est ajustée par addition d'eau distillée, à l'opacité d'une suspension bacillaire à 1mg./ml. L'étalon est une suspension de B.C.G. à 1mg./ml. et placé dans un tube scellé de 22 mm. de diamètre. L'étalon est conservé à + 4°C mais doit être remplacé à la température du laboratoire 15mn. avant l'emploi.

A partir de cette suspension-mère on procède à des dilutions par échelon décimétrique 10^{-1} , 10^{-2} jusqu'à 10^{-6}

Les dilutions à ensemercer sur milieu sans antibiotique et sur milieu avec antibiotique sont 10^{-1} , 10^{-3} et 10^{-5} mg./ml.

2°) Ensemencement des milieux

2 tubes témoins et 1 tube par concentration d'antibiotique sont ensemencés avec 0,2 ml. des différentes dilutions bactériennes. Après ensemencement, les tubes sont bouchés au coton mais non capuchonnés et placés à l'étuve à 37°C légèrement inclinés. Après évaporation du liquide, les tubes sont remis d'un capuchon en caoutchouc puis remis à l'étuve.

...../.....

- Test direct.

Le produit pathologique est décontaminé par la méthode à la soude sans centrifugation . Le produit final obtenu constitue la dilution I (suspension-mère) Les dilutions futures à partir de cette suspension-mère dépendent du nombre de bacilles visibles sur le frottis à l'examen microscopique.

Le mode de préparation des dilutions, le nombre de tubes de milieu à ensemercer par dilution, le volume de la sainece (0,2 ml.) enfin la manipulation des tubes après ensemençement sont en tout point les mêmes que lors d'un test indirect.

TABLEAU N° 5 : TITRAGE DIRECT: DILUTIONS A ENSEMENCER EN FONCTION DU NOMBRE DE BACILLES VISIBLES A L'EXAMEN MICROSCOPIQUE (10)

NOMBRE DE BACILLES VISIBLES A L'EXAMEN MICROSCOPIQUE (Objectif à Immersion)	DILUTIONS A ENSEMENCER	
	Sur les tubes Témoins	Sur les tubes avec Antibiotiques
Moins de 1 bacille par champ	Pas de titrage direct	
De 1 à 10 bacilles par champ	$1, 10^{-2}$ et 10^{-3}	1 et 10^{-2}
Plus de 10 bacilles par champ	10^{-1} et 10^{-3}	10^{-1} et 10^{-3}

D. LECTURE DES RESULTATS INTERPRETATION

La lecture est effectuée au 28ème jour et au 40ème jour. Dans la majorité des cas les résultats sont donnés au 28ème jour.

La lecture consiste à

- Compter le nombre de colonies apparues dans les différents tubes
- A partir de là déduire la proportion de bacilles résistants qui existe dans la souche .

- Confronter cette proportion avec la proportion critique adoptée pour l'antibiotique correspondant, afin de voir si elle se situe en deçà (souche sensible ou au delà (souche résistante)

1°) Numération des Colonies:

Les dilutions adoptées par la méthode des proportions sont telles que l'une d'entre elles donne une culture à colonies comptables (moins de 100 colonies). Dans le cas d'un test indirect, cette dilution est habituellement la dilution 10^{-6} pour les tubes témoins. Pour les tubes avec antibiotique c'est soit la dilution 10^{-3} , soit la dilution 10^{-5} . Au cas où les 2 dilutions donnent une culture positive le décompte sera effectué pour la dilution la plus faible. Même les très petites colonies sont incluses dans le compte.

2°) Calcul de la proportion de Bacilles résistants contenus dans la sou

• Ce calcul est très simple

Exemple I : TEST INDIRECT POUR L'I N H OO = INCOMPTABLE

DILUTION	TUBES TEMOINS	TUBES I N H CONCENTRATION- Mcg./ml.		
		0,1	0,2	1
10^{-3}	OO OO	OO	OO	80
10^{-5}	30 36	34	4	1

La population totale de bacilles viables contenus dans 0,2ml. de la dilution 10^{-5} est indiqué par le nombre de colonies trouvé sur chaque tube témoin ensemencé avec cette même dilution. La moyenne des deux tubes donne

$$\frac{30 + 36}{2} = 33 \text{ colonies}$$

En conséquence chaque tube (avec ou sans I N H) a reçu 33 bacilles viables. Sur les 33 bacilles viables reçus par les tubes avec I N H, combien ont donné des colonies? Combien sont résistants?

• Avec la concentration 0,1 mcg./ml. on trouve 34 colonies.

Donc $\frac{34}{33} = 100\%$ des bacilles de la souche sont résistants à l'I N H à la concentration 0,1 mcg./ml. ou encore la souche renferme 100% d bacilles résistants à 0,1mcg./ml. d'I N H.

- Avec la concentration 0,2mcg/ml. on trouve 4 colonies

Donc $\frac{4}{33} = 12\%$ des bacilles de la souche se sont montrés résistants à 0,2mcg/ml. d'I.N.H. ou encore la souche contient 12 % de bacilles I N H résistants à 0,2 mcg./ml.

- Avec la concentration 1mcg/ml. 1 colonie.

Donc $\frac{1}{33} = 3\%$ de bacilles résistants à 1 I N H à 1mcg/ml.

Exemple II : TEST DIRECT POUR LA STREPTOMYCINE A DONNE LES RESULTATS SUIVANTS

DILUTION	TUBES TEMOINS		TUBES STEPTOMYCINE CONCENTRATION EN mcg/ml.		
			2	4	10
1	00	00	00	8	1
10^{-2}	18	26	4	0	0

Le nombre de bacilles viables contenus dans 0,2 ml. de la dilution 10^{-2} est de $\frac{18+26}{2} = 22$.

Les tubes avec ou sans streptomycine ont reçu le même nombre de germes avec la dilution 10^{-2} . Combien de bacilles ont donné des colonies ?

- Sur le tube 2mcg/ml. on trouve 4 colonies.

Donc $\frac{4}{22} = 20\%$ de bacilles de la souche ont été résistants à 2 mcg./ml. de streptomycine.

Sur le tube 4mcg/ml. ensemencé avec la dilution 10^{-2} on ne trouve aucune colonie. Par contre sur le tube 4mcg/ml. ensemencé avec la dilution 1, on trouve 8 colonies. On calcule donc d'abord le nombre de bacilles viables contenus dans chaque tube ensemencé avec dilution 1.

Chaque tube ensemencé avec la dilution 10^{-2} ayant reçu 22 bacilles viables, on déduit facilement le nombre de bacilles viables reçus par chaque tube ensemencé avec la dilution 1.

$$22 \times 100 = 2200 \text{ bacilles viables}$$

Dans le tube 4 mcg./ml. ensemencé avec la dilution 1 8 bacilles ont donné des colonies. La souche contient donc $\frac{8}{2200} = 0,4 \%$ de bacilles résistants à 4mcg/ml. de Streptomycine.

De même la souche contient $\frac{1}{2200} = (- 0,1 \%)$ de bacilles résistants à 10mcg/ml. de streptomycine.

E/- CRITERES DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES (19)

Une souche de mycobactéries est déclarée sensible à un antibiotique quand la proportion de bacilles résistants trouvée dans la souche testée est inférieure à la proportion-critique correspondante. En revanche si la proportion de bacilles résistants trouvée dans la souche testée est égale ou supérieure à la proportion-critique correspondante la souche est déclarée résistante.

TABLEAU N° 15

ANTIBIOTIQUES	CONCENTRATIONS CRITIQUES mcg./ml.	PROPORTION CRITIQUE
ISONLAZIDE	0,2	1 %
RIFAMPICINE	40	1 %
ETHAMBUTOL	2	1 %
STREPTOMYCINE	4	1 %
ETHIONAMIDE	20	10 %
P A S	0,5	1 %
KANAMYCINE	20	10 %
D. CYCLOSERINE	30	10 %
VIOMYCINE	30	10 %
PYRAZINAMIDE	200	10 %
THIOSEMICARBAZONE (TB ₁)	2	10 %
CAPREOMYCINE	20	10 %

...../.....

Dans l'exemple I ci-dessus cité, la souche testée présentait 12 % de bacilles résistants à 0,2mcg./ml. d'I.N.H.. Conformément à la proportion critique pour l'isoniazide la souche testée est résistante à l'isoniazide.

Dans l'exemple II la souche contenait 0,4 % de bacilles résistants à 4mcg./ml. de streptomycine. Conformément à la proportion critique pour la streptomycine, la souche testée est sensible à la Streptomycine.

F/ TEST D'INHIBITION PAR L'HYDRAZIDE DE L'ACIDE THIOPHEN 2-CARBOXYLIQUE
(T . C . H .)

On ensemence des milieux de LOWENSTEIN-JENSEN contenant 2 mcg./ml. de T C H en suivant la même technique que pour l'étude de la résistance aux antibiotiques.

G/ RESULTATS DES TESTS DE SENSIBILITE

Une souche normale de bacille tuberculeux est sensible aux principaux antibiotiques antituberculeux Isoniazide, Rifampicine, Ethambutol, Streptomycine, Ethionamide P A S . Les souches B.C.G. sont naturellement résistantes à la D.Cycloserine.

Les mycobactéries atypiques sont résistantes au P A S .

M. Bovis a une résistance naturelle partielle au P A S et au T B₁, totale au pyrazinamide.

H/ RESISTANCE DU BACILLE TUBERCULEUX ET SES CONSEQUENCES

Comme les autres bactéries, le bacille tuberculeux est capable d'acquiescence une résistance aux différentes drogues antibacillaires. Ces phénomènes sont fondamentaux pour la conduite des traitements.

1°) Caractères :

On distingue :

- la résistance secondaire; acquise, chez un malade donné, en cours de traitement : la population résistante a été sélectionnée par le traitement mal prescrit, ou mal suivi.

- la résistance primaire : constatée avant tout traitement, lors d'une première atteinte. Elle est due à la contamination du sujet par une souche préalablement en contact avec les drogues antibacillaires, provenant d'un tuberculeux mal traité et chronique; cette souche est faite alors d'une population sélectionnée, entièrement résistante. La fréquence de cette résistance primaire varie selon les pays, selon les modalités de traitement.

La résistance du bacille tuberculeux est actuellement considérée comme de nature toujours chromosomique.

Aucune résistance plasmidique n'a été jusqu'ici démontrée ni suspectée.

Mais ce qui différencie cette résistance des résistances chromosomiques de autres bactéries, c'est le taux élevé des mutants résistants présent dans les populations bacillaires normales qui, joint au grand nombre de bacilles présents dans certaines localisations, explique la fréquence d'apparition de ces résistances en cours de traitement (résistance secondaire).

Ainsi, la proportion des mutants résistants dans une population bacillaire normale est d'environ :

- 1 p. 10^5 bacilles pour l'isoniazide,
- 1 p. 10^5 bacilles pour la streptomycine,
- 1 p. 10^3 bacilles pour l'éthionamide,
- 1 p. 10^6 bacilles pour l'éthambutol,

mais seulement de 1 p. 10^3 pour la rifampicine.

Cette mutation-sélection est le seul mécanisme actuellement connu d'apparition de souches résistantes en clinique.

- Points particuliers :

La résistance à l'isoniazide s'accompagne souvent de modification de diverses propriétés de la souche: caractères métaboliques mais surtout diminution ou perte de son pouvoir pathogène pour le cobaye.

...../.....

On en distingue trois types :

. une résistance de très faible niveau (à 0,1-0,2 mcg/ml) avec résistance croisée à de fortes concentrations d'éthionamide, virulence pour le cobaye conservée;

. une résistance forte (à 5 mcg/ml et plus), sans résistance croisée avec l'éthionamide, et virulence nulle pour le cobaye;

. une résistance intermédiaire, avec pouvoir pathogène pour le cobaye diminué.

. La résistance à la streptomycine peut être de haut niveau (1.000 mcg/ml), ou plus souvent de niveau faible (4 à 10 mcg/ml). La souche ne montre habituellement aucune autre modification.

- Une résistance croisée est fréquente entre kanamycine, viomycine et capréomycine.

- La résistance à la rifampicine est de niveau élevé; elle peut survenir aussi très rapidement.

- Indépendamment de ces résistances vraies, l'effet des antibiotiques peut être considérablement diminué, dans des lésions mal oxygénées, sur des bacilles au métabolisme ralenti.

2°) Dépistage In Vitro

L'étude in vitro de la souche du malade est donc essentiellement dans chaque cas, aussi bien chez un tuberculeux ancien ayant suivi de nombreux traitements, ou chez un malade au cours d'une rechute, afin de dépister une éventuelle résistance secondaire, qu'au cours d'une première atteinte, afin de reconnaître une possible résistance primaire.

La meilleure technique de dépistage est la méthode dite "des proportions". Des méthodes plus rapides, basées sur la mesure du dégagement de CO_2 produit par le germe en culture, en présence d'antibiotique, sont actuellement à l'étude.

...../.....

3°) Conséquence pour la prescription des antibiotiques

L'émergence de souches résistantes étant la conséquence directe de la sélection par les antibiotiques des mutants présents dans les populations bacillaires, il importe de respecter scrupuleusement dans la prescription de ces drogues certaines règles permettant d'éviter cette sélection : la résistance peut en effet être prévenue, son développement est la conséquence d'erreurs thérapeutiques.

Dans une lésion riche en bacilles, une monothérapie sera suivie inélectablement de la sélection d'une souche résistante. Par contre, la prescription de deux antibiotiques réduit considérablement cette possibilité, si du moins la souche infectante est normale.

Dans une telle souche, nous l'avons vu, la proportion de mutants résistants à l'isoniazide ou à la streptomycine est, pour chaque antibiotique de $1/10^5$; la proportion de mutants résistants à ces deux antibiotiques est donc de $1/10^{10}$, en raison de l'indépendance des mutations; dans une caverne contenant 10^7 à 10^9 bacilles, il est donc peu probable qu'il existe un mutant double.

Il est évident toutefois que ce mode de prévention n'est efficace que si la souche est "normale"; si au contraire, elle comporte un nombre plus élevé de mutants, la prescription de deux antibiotiques peut être insuffisante. D'où la nécessité de pratiquer les tests de sensibilité in vitro et, dans leur attente, de prescrire de préférence trois antibiotiques. Pour les antibiotiques mineurs dont le taux de mutation est plus élevé, il est impératif d'administrer même vis-à-vis d'une souche normale, trois antibiotiques simultanément pour éviter la sélection.

Deux règles fondamentales se dégagent donc de la conséquence de ces phénomènes de résistance :

- L'importance de l'antibiogramme,
- la nécessité aussi de prescrire une association médicamenteuse, comportant au moins deux antibiotiques majeurs, et plutôt trois au début de

VI. MATERIELS ET METHODES

A/- MATERIELS1°) Procédure générale

Ce travail donne les résultats d'une enquête menée au Dispensaire Antituberculeux de Bamako (D.A.T.) où un frottis pour examen direct est effectué sur les expectorations des malades suspects de tuberculose . Les crachats positifs à la bacilloscopie sont transportés à l'Institut National de Biologie Humaine (I.N.B.H.) où chaque échantillon est décontaminé par la soude à 4 %. Le culot de centrifugation est ensemençé en totalité sur deux tubes de milieu de LOWENSTEIN-JENSEN ordinaire. Les tubes sont placés à l'étude à 37°C et on note la date d'apparition des colonies . Les souches isolées ont été identifiées, et leur sensibilité testée aux principales drogues antibacillaires dans le Service de la Tuberculose à l'Institut PASTEUR de PARIS et au Laboratoire Central du Groupe Hospitalier PitiéSalpêtrière . Son but est de déterminer la fréquence des différentes espèces de mycobactéries responsables des lésions tuberculeuses et leur sensibilité aux antibiotiques.

2°) Répartition des Souches en fonction du Sexe

Comme le montre le Tableau n° la fréquence des souches isolées chez les malades masculins est plus élevée.

TABLEAU n° 2 : REPARTITION DES SOUCHES EN FONCTION DU SEXE DES MALADES

SOUCHES SEXE	NOMBRE DE SOUCHES	POURCENTAGE %
MASCULIN	71	68 %
FEMININ	34	32 %

Cette répartition des souches entre les deux sexes n'est pas tellement éloignée de celle obtenue par LOTTE et PERDRIZET en France en 1964 (33) 75%.

...../.....

3°) Répartition des souches en fonction de l'âge

Bien qu'incorrecte cette répartition des souches donne une idée sur la fréquence élevée de la Tuberculose chez les sujets de 20 à 40 ans.

TABLEAU n° : 5

A G E S	NOMBRE DE SOUCHES	POURCENTAGE
0 - 20 ans	4	4 %
20 - 30 ans	10	10 %
30 - 40 ans	9	9 %
40 - 50 ans	6	6 %
50 - 60 ans	5	5 %
+ de 60 ans	1	1 %
Age non précisé	70	65 %

B/. METHODES BACTERIOLOGIQUES. Examen microscopique :

Au Dispensaire Antituberculeux de Bamako l'examen direct des frottis se fait par la microscopie par lumière transmise après coloration par la méthode de ZIEHL-NEELSEN.

. Culture

Les échantillons positifs à la bacilloscopie sont mis en culture après traitement par la soude à 4 %. Le culot de centrifugation estensemencé sur 2 tubes de milieu de LOWENSTEIN-JENSEN ordinaire. On met à l'étuve à 37°C et on note dans la première semaine les croissances rapides. Les cultures contaminées sont éliminées.

...../.....

• Identification Biochimique

Les tests biochimiques utilisés sont :

- le test à la Niacine (31)
- la recherche de la nitrate réductase par la technique de VIRTANEN.
- la recherche de la réduction des nitrates par des cellules en croissance
- la recherche de la catalase à 22°C et à 60°C
- la recherche de la bêta glucosidase en suspension de bacille tuberculeux humain.

• Test de Résistance aux principales drogues antibacillaires

La méthode choisie pour l'étude de la sensibilité des souches est la méthode des proportions décrite par CANETTI, RIST et GROSSET (9). Le milieu de culture est le milieu de LOWENSTEIN-JENSEN avec antibiotique incorporé avant coagulation. Le test de sensibilité comporte également l'étude de la sensibilité à 5 mcg./ml. de T C H .

Conformément à cette méthode (9) une suspension bacillaire en eau distillée, ajustée opacimétriquement à 1mg/ml. est préparée à partir de la primoculture. Cette suspension est diluée par échelons déc métriques (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-6} mg/ml.).

Les suspensions 10^{-1} , 10^{-3} , et 10^{-5} sont ensemencés à raison de 0,2ml. par tube sur les deux témoins et sur les tubes contenant des antibiotiques. La dilution 10^{-6} est ensemencée sur 2 tubes témoins.

TABLEAU n° 9 ANTIBIOGRAMME

DILUTIONS mg./ml.	NOMBRE DE TUBES ENSEMENCES												
	TEMOINS		CONCENTRATIONS EN mcg/ml.										
	L.J.	PYR.	I N H			STREPTO		P.A.S		1314	ETHAM	RIF.	TB ₁
		0,1	0,2	1	10	2	4	0,5	20	2	40	2	5
10 ⁻¹	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10 ⁻³	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10 ⁻⁵	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10 ⁻⁶	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ Dans certains l'I.N.H. a été testé seulement à 0,2 mcg./ml., la streptomycine à 4 mcg./ml., l'éthionamide n'a pas été testé.

- Légendes : L.J. = LOWENSTEIN-JENSEN; PYR. = PYRUVATE.

...../.....

VII. R E S U L T A T S

Cette enquête qui s'est déroulée sur une période de quatre mois (du 1er Août 1980 au 15 Novembre 1980) présente les résultats suivants :

- Sur 178 crachats positifs à la bacilloscopie 105 ont donné lieu à des cultures positives sur milieu de LOWENSTEIN-JENSEN ordinaire préparé par nous mêmes à l'Institut National de Biologie Humaine (I.N.B.H.) . 29 ont été contaminés et ces tubes ont été jetés . Soit un pourcentage de culture positive égal à 60 %. Ce pourcentage est dû à plusieurs facteurs.

1°) Nous n'avons pas utilisé le milieu de COLETOS base et le milieu de LOWENSTEIN-JENSEN additionné de pyruvate qui favorisent la culture des bacilles tuberculeux déficients ou de culture difficile comme M. africanum et M. bovis.

2°) L'irrégularité de la fourniture d'électricité qui fait que la température à l'intérieur de l'étuve n'était pas toujours de 37°C.

3°) Il est possible que certains bacilles vus à l'examen direct étaient une population de bacilles morts.

- Sur les 105 cultures positives, 56 ont pu donner lieu à une identification biochimique .

TABLEAU n° 10 : ESPECES DE MYCOBACTERIES IDENTIFIEES

ESPECES IDENTIFIEES	NOMBRE DE SOUCHES
M. TUBERCULOSIS	52
M. "ATYPIQUES "	4

.../

L'absence de M. africanum est dû comme nous l'avons signalé précédemment au fait que nous n'avons pas pu utiliser le milieu de COLETSCOS base ou de LOWENSTEIN-JENSEN enrichi avec du Pyruvate (22) . Les souches isolées correspondent donc à des mycobactéries poussant relativement bien sur milieu de LOWENSTEIN-JENSEN ordinaire.

- Sur les 105 cultures positives seules 25 ont pu donner lieu à un antibiogramme interprétable pendant notre séjour à l'Institut Pasteur et au Centre Hospitalo-Universitaire Fitié Salpêtrière à Paris.

TABLEAU n° 11 : RESULTATS DES TESTS DE SENSIBILITE

A.T.B.	I N H	STREPTO.	P A S	T B ₁	RIFAMP	ETHAM	IDENTIF.	TRAITE
SOUCHE								
1. S. Dia.	S	S	S	S	S	S	M. Tubercu- losis	-
2. Y. Cou.	S	S	S	S	S	S	"	-
3. F. Maï.	S	S	S	S	S	S	"	-
4. G. Den.	S	S	S	S	S	S	"	-
5. D. Dol.	S	S	S	S	S	S	"	-
6. B. Ba.	S	S	S	S	S	S	"	-
7. O. Koï.	S	S	S	S	S	S	"	-
8. K. Tra.	S	S	S	S	S	S	"	-
9. N. Can.	S	S	S	S	S	S	"	-
10. D. Tra.	S	S	S	S	S	S	"	-
11. S. Keï.	S	S	S	S	S	S	"	-
12. M. Thi.	R	S	S	S	S	S	"	-
13. L. Keï.	R	S	S	S	S	S	"	-
14. M. Tou.	S	R	S	S	S	S	"	-
15. M. Sac.	S	R	S	S	S	S	"	+
16. M. Dia.	R	R	S	S	S	S	"	+
17. B. Cou.	R	R	S	S	S	S	"	+
18. I. Tra.	R	R	S	S	S	S	"	+
19. F. Keï.	R	R	S	R	S	S	"	+
20. T. Dia.	R	R	S	R	S	S	"	+
21. B. Dia.	R	R	S	R	R	S	"	+
22. C. Dia.	R	R	R	R	S	S	M. Atypi- ques	+
23. O. Dog.	R	R	R	R	R	S	"	+
24. A. Dia.	R	R	R	R	R	R	"	-
25. Y. Bal.	R	R	R	R	R	R	"	+

les : A.T.B. = Antibiotiques; S = Sensible; R. = Résistant
- = Malades non traités ; + = Malades déjà traités

VIII. DISCUSSION

Nous avons voulu par ce travail apporter notre contribution à la lutte antituberculeuse au Mali en abordant les aspects bactériologiques de la Tuberculose. Deux travaux similaires ont déjà été faits sur ce sujet. Le premier en 1974 par GROSSET, SANGARE et Coll. (22). Dans ce cas les crachats positifs à la bacilloscopie étaient collectés à Bamako et expédiés au Centre Hospitalo-Universitaire Pitié Salpêtrière à Paris pour la culture et l'identification sur la base des caractères biochimiques. Le Second a été fait en 1979-1980 par I. TOURE et SANGARE. Dans ce cas également les crachats positifs à la bacilloscopie étaient recueillis à Bamako et envoyés au Centre Muraz à Bobo-Dioulasso où son faits la culture, l'identification et les tests de sensibilité aux antibiotiques.

Nous avons voulu réaliser nous-mêmes la culture des bacilles tuberculeux à Bamako à l'Institut National de Biologie Humaine (I.N.B.H.). Ceci nécessitait sur place la préparation des milieux de culture, le traitement des expectorations, leur ensemencement et la lecture des cultures positives. Une fois cette étape réalisée à Bamako, les cultures positives ont été transportées à Paris au Centre Hospitalo-Universitaire Pitié Salpêtrière et au Service de la Tuberculose de l'Institut Pasteur où nous avons procédé à leur identification biochimique et au test de sensibilité aux antibiotiques. Seuls sont disponibles pour l'instant, les résultats que nous avons obtenus pendant la durée de notre séjour. Ces résultats permettent de faire un certain nombre de commentaires.

- La nature des espèces isolées : Nous avons trouvé sur 56 souches 52 M. Tuberculosis et 4 Mycobactéries atypiques.

La présence de Mycobactéries atypiques (7,2 % des isollements) confirme ce que l'on sait déjà sur la fréquence de portage de M. atypiques dans la flore buccopharyngée chez les africains. D'où la nécessité de procéder non seulement à la culture des mycobactéries dans notre pays, mais aussi à leur identification dans la mesure où, parmi ces mycobactéries atypiques, certaines sont toujours saprophytes et d'autres responsables de mycobactérioses dont les pronostics sont souvent sévères.

...../.....

- La sensibilité des espèces isolées aux antibiotiques : Bien que le nombre total de souches étudiées ne nous permette pas d'établir de, statistique réellement valable, il est important de signaler que 11 souches sur 25 étudiées sont sensibles à tous les antibiotiques. 14 sont résistants mais à des degrés divers. Les deux antibiotiques les plus touchés par la résistance sont l'I.N.H. et la streptomycine (12 souches sur 25): la résistance à ces deux antibiotiques peut être séparée ou associée. Le troisième antibiotique le plus touché est le TB₁ (7 sur 25 souches) . La Rifampicine et l'ethambutol demeurent les antibiotiques les plus actifs.

- Sur les 14 malades non encore traités, trois portent des bacilles d'emblée résistantes à l'I.N.H. ou à la streptomycine . Ces nombre très faible ne nous permet pas d'établir un rapport très valable mais permet de souligner le problème de la résistance primaire au Mali. Ce problème mérite qu'on y porte le plus grand intérêt d'autant qu'il conditionne directement l'échec du traitement,

- Chez tous les malades anciennement traités(7 sur 25) nous retrouvons des bacilles résistants à un ou plusieurs antibiotiques. Ce qui dénote qu'il s'agit réellement d'échec thérapeutique . Les causes de ces échecs sont multiples . A côté de la résistance primaire, l'irrégularité des malades joue un grand rôle. Ces constatations montrent que l'intégration de la culture avec identification et test de sensibilité aux antibiotiques dans le programme de lutte antituberculeuse au niveau central est nécessaire en République du Mali.

Ceci permettra de faire des études semblables au niveau des chefs-lieu de Région afin d'établir une carte de la répartition des différentes espèces de Mycobactéries dans notre pays. La réalisation des Antibiogrammes au niveau central permettra de déterminer le taux de résistance primaire et d'en suivre l'évolution avec le temps, étant entendu que l'augmentation ou la diminution de ce taux permet de juger de l'efficacité de la lutte antituberculeuse dans un pays.

Enfin l'identification des espèces isolées permettra de déterminer le pourcentage de *M. africanum* et le rôle des *M. "atypiques* dans la tuberculose au Mali.

...../.....

IX. CONCLUSION

A l'issue de cette étude sur la tuberculose pulmonaire à Danako, un certain nombre de points peuvent être retenus :

1°) A côté du bacille tuberculeux humain, nous avons isolé dans 7,2 % des cas des mycobactéries dites "atypiques". Ces mycobactéries peuvent être soit des contaminations, soit responsables de mycobactérioses. Seule la culture avec identification permettra de préciser leur rôle.

2°) Les résultats des tests de sensibilité montrent la présence de souches résistantes aux différentes drogues antibacillaires étudiées. Les antibiotiques les plus touchés par ce phénomène de résistance sont l'INH et la streptomycine c'est-à-dire les deux antibiotiques les plus utilisés. Vient ensuite le TB₁, enfin la rifampicine et l'éthambutol pour lesquels on enregistre les taux de résistance les plus bas.

Ce travail qui a commencé au mois d'Août 1980 et que nous espérons poursuivre permet de noter d'ores et déjà la nécessité d'introduire dans notre Arsenal de lutte antituberculeuse, la culture et l'antibiogramme au niveau central en vue d'un contrôle épidémiologique plus sûr et d'une maîtrise des phénomènes de résistance à l'échelle nationale.

X. BIBLIOGRAPHIE

- 1.- ABBOT (J.N.) : Effective use of Penicillin to reduce contamination in sputum concentrates to be examined for tubercle bacilli. Amer. J. Publ. Health. 1951 41 287-291.
- 2.- AGIUS (E.) : An uncommon pathogenic mycobacterium . Arch. Inst. past. Tunis. 1956 . 33 245-257.
- 3.- ANDERSON : Cultural methods of isolation of Tubercle bacilli Am. J. Publ. Hlth. 1936 26 619-624.
- 4.- BISHOP (P.) : Newman(G.): The history of the Ziehl Neelsen stain Tubercle 1970 51 196-207.
- 5.- BONICKE (R.) : Die Differenzierung humaner und boviner tuberkel bakterien mit Hilfe Von thiophen 2-Carbonsäure Hydrazid. Natur wissen schaften 1958 - 45 392-393.
- 6.- BUHLEK (V.B.), POLLAK (A.) : Human infection with atypical Acid fast organisms report of two case with pathological findings. Amer. J. clin. Patho. 1953 - 23 362-374.
- 7.- BRITISH Thoracic and tuberculosis association : short-course chemotherapy in pulmonary tuberculosis . Lancet, 1976, II 1102-1104.
- 8.- BROUET (G), et ROUSSEL (G.) : Essai 6-9-12; Traitements de courte durée par l'association isoniazide-rifampicine en tuberculose pulmonaire Rev. Fr. Mal. Resp. 1977. 5 Suppl. I.
- 9.- CANETTI (G), RIST (N.) et GROSSET (J.): Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthodes des proportions. Méthodologie, critères de résistance, résultats, interprétations. Rev. de Tuberc. (Paris) 1963 27 217-272.
- 10.- CANETTI (G.), GROSSET (J.) : Techniques et indications des examens bactériologiques en tuberculose. Tourelle Edit. 1968 13-176.
- 11.- CASTETS (M.), BOISVERT (H.), GRUMBACH (F.) BRUNEL (M.) et RIST(N.) : Les bacilles tuberculeux de type africain. Rev. Tuberc. Pneumol. 1968. 32 - 179-184.
- 12.- COLETOS (R.J.): Milieu et modalités de culture adaptés à la réanimation et à la multiplication in Vitro de mycobactérium tuberculosis vitalité réduite de viabilité éphémère ou en état de quiescence Ann. Inst. Past. 1960. 99 475-495.
- 13.- CORPER (H.J.), STONER : An improved procedure for the diagnostic culture of mammalian tubercle bacilli. J. Lab. clin. Med. 1946 31 1364-1371.
- 14.- DEGOMMIER (J.): Nouvelle technique de coloration des bacilles tuberculeux pour la recherche en fluorescence . Ann. Inst. Pasteur 1959 . 96 . 723.

- 15.- DEVULDER (B.) : Coloration des bacilles Acido-Alcoolo résistants par la technique de TAN THIAM HOK, modifiée .
Ann. Inst. Pasteur, Lille 1963 14 229-231.
16. DOUMBIA (S.) : Organisation de la chimiothérapie antituberculeuse à l'échelle nationale au Mali (à l'exclusion de la région de Kayes)
Thèse , Med. Bamako 1978.
17. DUBOS (R.) , MIDDLEBROOK (G.): Media for tubercle bacilli .
Amer. Rev. Tuberc. 1948 54 204-212.
18. DREA (W.) et ANDREJEW (A.): The metabolism of the tubercle bacilli
Ch. C. Thoms. Publisher spring field 1953.
19. ~~FELDMAN~~ (W.H.) , DAVIES (R.) MOSES (H.E.), ANDBERG (W.): An unusual Mycobacterium isolated from sputum of a man suffering, from pulmonary disease of long duration.
Amer. Rev. Tub. 1943 - 48 83-93.
- 20.- FRANKEL (G.) : L'infection bacillaire et la tuberculose .
Masson et Cie. Ed, 1936 16.
- 21.- GOLDIE : Use of Dubos medium for culture of M. Tuberculosis from sputum concentrates to be examined for tubercle bacilli.
Am. J. Publ. Health. 1951 41 237-291.
22. GROSSET (J.) SANGARE (S.) , RIST(N.) MEYER (L.): Caractères culturaux et biochimiques des bacilles tuberculeux isolés chez 230 tuberculeux pulmonaires du Mali.
Bull. U. I. C. T. 1974 49 n°2 190-198.
- 23.- GROSSET (J.) : ~~Les principes bactériologiques des traitements de la tuberculose~~
Revue du Praticien. Tome XXIX 33 1979 2645-2650
- 24.- GROSSET (J.): New microbial aspects of the treatment of tuberculosis 1977
Int. Cong. Series n°437 I-II Excerpta Medica ed.
- 25.- HALLBERG (V.) New method for staining tubercle bacilli applicable also to micro-organisms of leprosy and other acid-fast germs.
Act. Med.Scand. 1946 Suppl. 180 1-37.
- 26.- HAUDUROY (P.): Inventaire et description des bacilles paratuberculeux.
Masson et Cie. Ed. 1946 Paris.
- 27.- HOHN : Die kultur des tuberkle bacillits Zur diagnose der Tuberkulose
Zent für Bkt. I. Origin. 1926 98 460-477.
- 29.- KEITA (B.): Organisation du dépistage de la tuberculose pulmonaire à l'échelle nationale au Mali (à l'exclusion des Régions Kayes et Tombouctou).
Thèse Méd, Bamako 1979.
- 30.- KOCH (R.) : Recherche isolement et étude du bacille tuberculeux et des autres mycobactéries en pratique courante.

31. KONNO (K.), KURZMANN (R.) BIRD (K.T.) : Differentiation of human tubercle bacilli from atypical acid fast bacilli. I niacin Production
Clinical application: Am. Rev. Resp. Dis. 1958 II 660-680.
32. KINYOUN (J.J.) : A note on uhlenhuth's method for sputum examination for tubercle bacilli .
Amer. J. Publ. Hlth. 1915 5 867-870.
- 33.- ~~WELICA~~ (G.P.), DYE (W.E.), COHN (M.L.): Middlebrook (G.): Sputum digestion and decontamination With N. acetyl cystein sodium hydroxyde for culture of mycobactéria ;
Amer. Rev. Resp. Dis. 1963, 87 775-779
- 34.- KRASNOW (I.) WAYNE (L.G.) : The mortality rate of tubercle bacilli in various digestion systems.
Am. J. Clin. Patho. 1966 45 352-358.
- 35.- LANGEROVA , RACQUET (A.): Comparaison de différentes méthodes d'homogénéisation et de purification des produits pathologiques en fonction du milieu de culture solide ou liquide .
Bull. Org. Mond. Santé 1963 39 663-680.
- 36.- LEPETIT : Tuberculose 1 8-151.
- 38.- MYER (L.): Evolution, caractères et signification épidémiologique de la résistance primaire du bacille tuberculeux en France de 1962 à 1972
Thèse Med. Paris. 1974.
- 39.- MEYER (L.) et HUGO (D.): Mycobactériologie en Santé Publique .
Inst. Past. Paris 1960.
- 40.- MIDDLEBROOK (G.), COHN (M.L.): Bacteriology of tuberculosis. Laboratory method
Amer. J. Publ. Hlth. 1958 , 48 844.
- 41.- NATIAN , LARRIER : Traité de Microbiologie .
Doin. Ed. Paris 1931.
- 42.- PATTERSON (R.A.), THOMSON (A.J.), LARSEN (D.H.): The use of Zephiran in the isolation of Mycobacterium tuberculosis.
Amer. Rev. Tuberc. 1956 74 284.
- 43.- PENSO (G.): Premier colloque international sur les Mycobactéries .
P.G. Janssens edit. Anvers. 1959 p. 52-70.
- 44.- PETROFF (S.A.): Some cultural studies on the tubercle bacilli
Bull. Johns. Hopkins. Hosp. 1915 276-279.
- 45.- PIATOWSKI (S.): Uber eine neue Eigenschaft der tuberkel und anderer saurefesten bakillen.
Deut. Med. Woch 30 878.
- 46.- PROSKAUER et BECK : Beitrage Zur Ernährungs. Physiologie der tuberkel bazillus.
Ztsch. F. Hyg. 1894. 13 128-152.
- 47.- QUISNO (R.) FOTER (M.J.) Cetyl pyridinium chloride Gemicidal.
Properties , J. bact. 1946 52 111-117.

- 48.- RUYON (E.H.) : Anonymous mycobacteria in pulmonary disease.
Med. clin. N. Amer. 1959 43 273-290.
- 49.- SAENZ (A.) et COSTIL (L.) : Diagnostic bactériologique de la tuberculose
Masson Cie . Edit. Paris 1936.
- 50.- SEMEGA (C.) : Problèmes de la lutte antituberculeuse dans les zones rurales
du Mali. Etude critique du Projet Pilote de Kayes.
Thèse Med. Bamako 1977.
- 51.- SHAH (R.K.) DYE (W.E.) : Use of Dithiothreitol to replace N. acetyl cystein
for routine sputum digestion de contamination for the culture of
mycobacteria .
Am. Rev. Resp. Dis. 1966 94 454.
- 52.- SPENGLER (K.) : ~~Fest~~ Festkrating ver darrung des sputums Zum sedimentiren des
tuberkel bacillen .
Deutsch. Med. Woch. 1935 21 244.
- 53.- SULA (L.) WHO. : Cooperative studies on a simple culture. Technique for the
isolation of Mycobactéria II. Comparaison of the efficacy of
lyophilised liquid medium with that of Lowenstein-Jenson medium .
Bull. WHO 1963 29 607-625.
- 54.- SULA (G.) : Comparative trials With different decontaminating agents for
Growing Mycobactérium tuberculosis from sputum specimens
Bull. O.M.S. 1968 30 647-655.
- 55.- TACQUET (A.) TISON (F.) CLAYES (G.) QUINOT (E.) : Intérêt de l'inoculation
avec quatta pour l'isolement des mycobactéries .
Rev. Tuberc. 1963 27 533-540.
- 56.- TACQUET (A.) et TISON (F.) : Nouvelle technique d'isolement des mycobactérie
par le lauryl Sulfate de Na.
Ann. Inst. Past. 1961 100 676-680.
- 57.- TAN THIAM (H.) : a simple and rapid cool staining method for acid fast
bacteria .
Amer. Rev. Resp. Dis. 1962 85 753-754.
- 58.- TISON (F.) : Elimination des germes banaux dans les crachats destinés à
la culture du bacille de Koch.
Applications et perfectionnement .
Ann. Inst. Past. 1951 80 659-664.
- 59.- TISON (F.) ; AUDRIN (J.) : Recherche, isolement et étude du bacille
tuberculeux.
Masson et Cie édit. 1956 1 vol. 104.
- 60.- TISON (F.), CARBONNELLE (B.) : Recherche, isolement et étude du bacille
tuberculeux et des autres mycobactéries en pratique courante,
1972 . Page 66.
- 62.- VILLEMIN (J.A.) : Cause et nature de la tuberculose .
Bull. Acad. Nat. Med. 5 Décembre 1865.