

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT  
SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

acterium tube  
, du district de

REPUBLIQUE DU MALI

Un Peuple-Un But-Une Foi

UNIVERSITE DES SCIENCES DES TECHNIQUES  
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO

FACULTE DE PHARMACIE



Année universitaire 2021 -2022



N°...../

## THESE

**ETUDE DE LA RESISTANCE PRIMAIRE DU  
COMPLEXE *Mycobacterium tuberculosis* AUX  
ANTITUBERCULEUX CHEZ LES PATIENTS DES  
COMMUNES III et VI DU DISTRICT DE BAMAKO,  
MALI.**

Présentée et soutenue publiquement le : 02/06/2022 devant la  
Faculté de Pharmacie

**Pour obtenir le grade de docteur en Pharmacie  
(DIPLOME D'ETAT)**

**Par : Mr. Dramane SAMAKE**

### JURY

**Président : Professeur Titulaire Yacouba TOLOBA**

**Membres : Docteur Ibrehima GUINDO**

**Docteur Bassirou DIARRA**

**Co-directeur : Docteur Bréhima TRAORE**

**Directeur de thèse : Professeur Agrégé Bourèma KOURIBA**

## LISTE DES ENSEIGNANT

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



REPUBLIQUE DU MALI  
Un Peuple-Un But-Une Foi

# FACULTE DE PHARMACIE

## LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE ANNEE UNIVERSITAIRE 2020-2021

### ADMINISTRATION

Doyen : Boubacar TRAORE, Professeur

Vice-doyen : Sékou BAH, Maître de Conférences

Secrétaire principal : Seydou COULIBALY, Administrateur Civil

Agent comptable : Ismaël CISSE, Contrôleur des Finances.

### PROFESSEURS HONORAIRES

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
2	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
3	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
4	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
5	Souleymane	DIALLO	Bactériologie - Virologie
6	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
7	Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
8	Boukassoum	HAÏDARA	Législation
9	Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
10	Alou A.	KEÏTA	Galénique
11	Mamadou	KONE	Physiologie
12	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
13	Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
14	Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
15	Saïbou	MAÏGA	Législation
16	Elimane	MARIKO	Pharmacologie
17	Mahamadou	TRAORE	Génétique
18	Sékou Fantamady	TRAORE	Zoologie

### PROFESSEURS DECEDES

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
2	Mahamadou	CISSE	Biologie

**DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES**

**1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mounirou	BABY	Hématologie
2	Abdoulaye	DABO	Biologie/Parasitologie
3	Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
4	Alassane	DICKO	Santé Publique
5	Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie-Mycologie
6	Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
7	Akory Ag	IKNANE	Santé Publique/Nutrition
8	Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
9	Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

**2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Aldjouma	GUINDO	Hématologie
2	Kassoum	KAYENTAO	Santé publique/ Bio-statistique
3	Bourèma	KOURIBA	Immunologie <b>Chef de DER</b>
4	Issaka	SAGARA	Bio-statistique
5	Mahamadou Soumana	SISSOKO	Bio-statistique
6	Ousmane	TOURE	Santé Publiq/Santé environnement

**3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-virologie
2	Charles	ARAMA	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biologie clinique
4	Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie clinique
5	Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie Clinique
6	Antoine	DARA	Biologie Moléculaire
7	Souleymane	DAMA	Parasitologie -Mycologie
8	Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie moléculaire
9	Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
10	Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
11	Seydina S. A.	DIAKITE	Immunologie
12	Yaya	GOÏTA	Biochimie Clinique
13	Ibrahima	GUINDO	Bactériologie virologie
14	Aminatou	KONE	Biologie moléculaire
15	Birama Apho	LY	Santé publique
16	Almoustapha Issiaka	MAÏGA	Bactériologie-Virologie
17	Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie Cellulaire
18	Fanta	SANGHO	Santé Publique/Santé communautaire
19	Oumar	SANGHO	Epidémiologie

**4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
2	Issa	DIARRA	Immunologie
3	Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
4	Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
5	Falaye	KEÏTA	Santé publique/Santé Environnement
6	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
7	Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
8	Djakaridia	TRAORE	Hématologie

**DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

**1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Rokia	SANOGO	Pharmacognosie <b>Chef de DER</b>

**2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
-	Néant	-	-

**3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Loséni	BENGALY	Pharmacie hospitalière
2	Bakary Moussa	CISSE	Galénique
3	Yaya	COULIBALY	Législation
4	Issa	COULIBALY	Gestion
5	Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie hospitalière
6	Mahamane	HAÏDARA	Pharmacognosie
7	Hamma Boubacar	MAÏGA	Galénique
8	Moussa	SANOGO	Gestion
9	Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

**4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion pharmaceutique
2	Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
3	Adama	DENOU	Pharmacognosie
4	Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
5	Assitan	KALOGA	Législation
6	Ahmed	MAÏGA	Législation
7	Aïchata Ben Adam	MARIKO	Galénique

8	Aboubacar	SANGHO	Législation
9	Bourama	TRAORE	Législation
10	Karim	TRAORE	Sciences pharmaceutiques
11	Sylvestre	TRAORE	Gestion pharmaceutique
12	Aminata Tiéba	TRAORE	Pharmacie hospitalière
13	Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie hospitalière

**DER : SCIENCES DU MEDICAMENT**

**1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique <b>Chef de DER</b>
2	Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

**2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Pharmacologie

**3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie chimique
2	Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
3	Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
4	Tidiane	DIALLO	Toxicologie
5	Madani	MARIKO	Chimie Analytique
6	Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

**4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
2	Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie analytique
3	Blaise	DACKOUO	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
5	Abdourahamane	DIARA	Toxicologie
6	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
7	Mohamed El Béchir	NACO	Chimie analytique
8	Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
9	Dougoutigui	TANGARA	Chimie analytique

**DER : SCIENCES FONDAMENTALES**

**1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mouctar	DIALLO	Biologie/ Chef de DER

**2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Lassana	DOUMBIA	Chimie appliquée

**3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
2	Abdoulaye	KANTE	Anatomie
3	Boureima	KELLY	Physiologie médicale

**4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie organique
2	Modibo	DIALLO	Génétique
3	Moussa	KONE	Chimie Organique
4	Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

**CHARGES DE COURS (VACATAIRES)**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
4	Yacouba	COULIBALY	Droit commercial
5	Bouba	DIARRA	Bactériologie
6	Moussa I	DIARRA	Biophysique
7	Babacar	DIOP	Chimie organique
8	Aboubakary	MAÏGA	Chimie organique
9	Modibo	SANGARE	Anglais
10	Satigui	SIDIBE	Pharmacie vétérinaire
11	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-embryologie

12	Fana	TANGARA	Mathématiques
13	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie médicale
14	Mamadou B	TRAORE	Physiologie
15	Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

Bamako, le 26 juillet 2021



**P/Le Doyen PO**  
**Le Secrétaire Principal**

**Seydou COULIBALY**  
*Administrateur Civil*

## **DEDICACES**

### **A Mon Père Konimba SAMAKE**

Cher Papa, vous avez été pour nous un exemple de courage, de persévérance, de franchise dans l'accomplissement du travail bien fait. Vous nous avez appris le sens de l'honneur, de la dignité, de la justice et le respect de soi. Puisse cette thèse soit un témoin de tes conseils, de ton estime et de ta confiance. Que le tout Puissant t'accorde longue vie et te comble du bonheur. Amine.

### **A Ma Mère Fatoumata COULIBALY**

Il n'existe pas de mots Maman pour te dire ce que je ressens en ce moment. Tu es la personne la plus importante de ma vie. Ce travail est le résultat de tes sacrifices, de tes prières, de tes conseils inlassables et quotidiens dans le seul but de voir tes enfants devenir des personnes respectueuses et respectables. Aucune dédicace n'est de taille pour exprimer l'amour, le respect, la considération que j'ai pour toi. Tu n'as jamais manqué à ton devoir de mère. Merci d'avoir su me transmettre tes valeurs de combattivité, de patience et de persévérance sans lesquelles je ne serais peut-être pas arrivée où j'en suis. Puisse Dieu t'accorder santé, longévité. J'espère réaliser en ce jour un de tes rêves, et être digne, toute ma vie personnelle et professionnelle, de ton éducation et de ta confiance.

### **A ma Mère Kadidiatou Doumbia**

Merci mère pour ton amour, j'ai toujours bénéficié de ton soutien. Les conseils et encouragements que tu m'as prodigués prouvent juste le genre de mère exceptionnelle que tu es. Je voudrais t'exprimer toute ma profonde gratitude. Qu'ALLAH le tout puissant t'accorde une longue vie garnie de bonheur remercie pour toutes les valeurs morales que tu m'as inculquées et pour l'éducation que tu m'as donnée.

### **A mes frères et sœurs.**

La fraternité n'a pas de prix dit-on. J'espère qu'elle restera toujours un lien sacré entre nous. Trouvez tous ici l'expression de mon fraternel amour. Ce travail est le vôtre.



## REMERCIEMENTS

La rédaction de ce manuscrit venant clore l'aventure que constitue une thèse, je tiens donc à exprimer mes sincères remerciements à tous ceux qui ont joué un rôle dans sa concrétisation.

- Tout d'abord, Je rends grâce à ALLAH, le Tout Puissant, le Tout miséricordieux, le Très miséricordieux, le Clément, la gloire de l'espoir, le protecteur de celui qui cherche la protection, pour m'avoir guidé et donné la force nécessaire à la réalisation de ce travail.
- Au prophète Mohamed S.A.W, Que les bénédictions et la paix de Dieu soient sur lui.
- A Monsieur le Doyen de la Faculté de pharmacie **Pr Boubacar Traoré** pour son engagement à la formation des étudiants.
- A tout le corps professoral, pour leurs amours de transmettre leurs savoir aux fils du Pays.
- Au Directeur du CICM, **Prof. Ag. Bourèma KOURIBA**, de m'avoir accepté dans votre Centre et dirigé cette thèse. Cher professeur, depuis la faculté, vous étiez un modèle, une source de motivation pour moi, car votre amour pour le travail bien fait, votre engagement pour la formation étaient des modèles pour nous. C'est un honneur pour moi de compter parmi vos élèves. Qu'Allah vous donne santé et la longévité.
- Au, **Dr Bréhima TRAORE** de m'avoir accordé sa confiance et co-dirigé ce travail. Bien plus qu'un Co-directeur de thèse, vous aviez toujours été disponible et à l'écoute pour moi. J'ai appris qu'il est possible de faire les choses bien et avec une touche d'humour en plus. Chercheur et pédagogue exemplaire, j'ai beaucoup appris à vos côtés, tout en prenant un très grand plaisir à être ton thésard. Longue vie à vous.
- Un remerciement aussi à l'endroit du Directeur technique du laboratoire Rodolphe Mérioux du CICM, à l'occurrence **Docteur Lassina Gadi TIMBINE**, qui a bien accepté la réalisation de cette thèse au sein de son laboratoire. Je vous remercie davantage pour le soutien, les orientations et votre disponibilité.
- Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à **Dr Abou Coulibaly** pour son encadrement, ses précieux conseils et ses remarques toujours intéressantes. Qu'Allah fasse de vous un professeur dans les jours à venir. Longue vie à vous.
- Je remercie l'ensemble des personnels de l'unité de la recherche à savoir **Dr Elisabeth SOGODOGO, Dr Abdoul Karim Sangaré, Mr Judicaël Ouédraogo** pour leurs disponibilités et leurs motivations.

- Je remercie tous les personnels du CICM, en particulier **Mr Issa SOUMARE, Mr Oumar Baba Haidara, Mme Diombéra Asmao Soumaré, Tante Nana** pour leurs conseils.
- Un spécial remerciement à une personne qui compte énormément pour moi et pour qui j'éprouve beaucoup de respect et d'admiration, à l'occurrence **Mademoiselle FANE Mariam Gniré**. Autant de phrases aussi expressives soient elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu as été une source de motivation. Longue vie à toi.
- Un merci tout particulier à mes amis, **Kalifa Diabaté, Dr Gaoussou Sylla, Dr Abdoul Ghany Dicko, Mohamed N'Diaye, Dr Seydou Lalama Traoré, Abdoul Karim SAMAKE, Fatoumata Inna TRAORE**. Merci pour votre courtoisie.
- Je tiens à faire un remerciement tout particulier aussi à vous deux : **Seydou DEMBELE et Backoroba DIARRA**. Il n'y a pas un adjectif qualificatif qui me conviendra pour vous qualifier, car vous êtes spéciales pour moi, vous êtes un Diamant que j'ai eu dans cette faculté. Vous étiez toujours présent pour moi. Au-delà de l'amitié vous étiez un frère, mes confidents. Ces quelques lignes ne pourront jamais décrire suffisamment mon sentiment de remerciement à vos égards. Merci au fond du cœur mes chers amis. Sachez qu'en aucun instant je n'ai regretté votre compagnie.
- Je remercie mes Co-thésards, **Karine Nyowa Coulibaly, Nana TOURE, Saibou TOLO, Sadio DOUMBIA, Tièido SIDIBE**, nous avons partagés les mêmes joies et les mêmes angoisses de la vie de thésard, mais également d'excellents moments de détente.
- Une pensée particulière à tous mes proches et à toutes les personnes qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de cette thèse, je ne pourrai toutes les nommer dans ce document. Aussi permettez-moi de juste dire MERCI à toutes et à tous.
- Je remercie l'ensemble des travailleurs de la Pharmacie Faladiè pour la gentillesse et la considération portée à mon égard.
- Merci enfin à ma famille et à mes amis qui, de près comme de loin, m'ont encouragée aux moments opportuns. Un merci particulier à mes parents, pour avoir toujours cru en mes choix.

## HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY

**A notre Maître et Président du jury,**

**Professeur Titulaire Yacouba TOLOBA**

- + Professeur Titulaire en pneumologie à la FMOS ;**
- + Spécialiste en pneumo-physiologie et en allergologie ;**
- + Praticien Hospitalier au CHU du Point G ;**
- + Chef de DER à la FMOS ;**
- + Membre de plusieurs sociétés nationales et internationales ;**




Cher Maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury malgré vos occupations.

Véritable icône, vous n'avez cessé de nous fasciner par la grandeur de votre simplicité. Nous vous prions, cher Maître d'accepter nos sincères remerciements. Que Dieu le Tout Puissant vous accorde santé et prospérité.

**A notre Maître et Juge,**

**Docteur Ibréhima GUINDO**

-  **Pharmacien Microbiologiste,**
-  **Maître-Assistant en Bactériologie -Virologie à la Faculté de Pharmacie**
-  **Chef de département laboratoire et de recherche biomédicale à l'Institut  
National de Santé Publique (INSP),**

Cher maître,

C'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce modeste travail malgré  
votre emploi de temps chargé.

Votre disponibilité, votre dynamisme, votre souci pour le travail bien fait alliés à vos qualités  
humaines font de vous un maître admiré et admirable.

Puisse Dieu vous accorder heureuse et longue vie.

**A notre Maître et Juge,**

**Docteur Bassirou Diarra**

- ✚ Docteur en Médecine ;**
- ✚ Maître-Assistant à la FMOS de l'USTTB ;**
- ✚ Titulaire d'un Master en Médecine Tropicale de l'Université de Nagasaki au Japon ;**
- ✚ Titulaire de PhD à l'Institut de Médecine Tropicale et l'Université d'Anvers en Belgique ;**
- ✚ Senior chercheur et Responsable du laboratoire P3 de Tuberculose et des Fièvres Hémorragiques de l'UCRC ;**
- ✚ Membre de l'équipe d'intervention rapide de la CEDEAO contre les fièvres Hémorragiques ;**
- ✚ Coordinateur-adjoint de Biosécurité du comité Institutionnel Public de Biosécurité, Bio sureté (CIPBB) de l'USTTB ;**

Cher Maître,




Nous avons été tous touché de la gentillesse et de la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de siéger dans ce jury.

Votre rigueur scientifique, votre abord facile, Votre disponibilité, votre dynamisme, votre souci pour le travail bien fait alliés à vos qualités humaines font de vous un maître admiré et admirable

Veillez trouver ici, cher maître, l'expression de notre profonde reconnaissance.

**A notre Maître et Co-directeur de thèse,**

**Docteur Bréhima TRAORE**

 **Docteur en médecine,**  
 **Biologiste chercheur,**  
 **Responsable de l'unité de recherche de la tuberculose du Centre  
d'Infectiologie Charles Mérieux**

Cher Maître,

Nous vous remercions d'avoir accepté de Co-diriger ce travail. Nous avons été séduits par votre pédagogie, votre esprit critique et nous sommes fiers de l'enseignement de qualité que vous nous avez donné.

Votre grande qualité de praticien fait de vous un modèle dans ce domaine.

Votre humanisme et votre modestie forcent le respect et incitent l'admiration

Puisse Dieu vous donner une longue vie.

**A notre Maître et Directeur de thèse,**

**Professeur Agrégé Bourèma KOURIBA**

- ✚ Maître de conférences Agrégé d'immunologie**
- ✚ Chef de l'unité d'immunologie Cellulaire et Moléculaire du MRTC/DEAP**
- ✚ Chef du Département d'Enseignement et de Recherche à la FAPH et FMOS**
- ✚ Directeur Scientifique du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux de Bamako**
- ✚ Président de la Société Malienne d'Immunologie**

Cher maître,

Nous vous remercions d'avoir accepté de diriger ce travail. C'est un grand privilège pour nous d'être parmi vos élèves. Nous avons été impressionnés dès notre premier contact avec vous.

Vous êtes un homme en qui la supériorité intellectuelle s'unie à la noblesse de caractère. Votre esprit de recherche, le talent de votre parole, la finesse de votre réflexion, votre mémoire prodigieuse associés à vos qualités humaines exceptionnelles font de vous une référence.

Que Dieu vous accorde bonne santé et longévité afin que l'école malienne d'immunologie soit parmi les meilleures.

## **SIGLES ET ABREVIATIONS**

**ADN** : Acide désoxy ribonucléique

**AG** : arabinogalactane

**ARN** : Acide Ribonucléique

**AST** : Test de sensibilité aux antibiotiques

**ATB** : Antibiotique

**BAAR** : Bacille acido alcalo résistant

**BCG** : Bacille de Calmette et Guerin

**BK** : Bacille de Koch

**CICM** : Centre d'Infectiologique Charles Mérieux

**CMT**: Complexe *Mycobacterium tuberculosis*

**COVID-19**: Coronavirus Disease 2019

**CIII** : Commune III

**CVI** : Commune VI

**CSLS-TBH** : Cellule Sectorielle de lutte contre le Sida, la Tuberculose et les Hépatites

**CS Réf** : Centre de Santé de Référence.

**DPP** : Dérivé protéinique purifié

**DOTS** : Direct Observed Treatment Short-course

**EMB** : Ethambutol

**FQ** : Fluoroquinolone

**GL** : glycolipides

**IDR** : intradermoréaction

**IFN- $\gamma$**  : interféron- $\gamma$

**IGRA** : interféron gamma release assays

**IgG** : Immunoglobuline G



**IgM** : Immunoglobuline M

**IgA** : immunoglobuline A

**IL-12** : interleukine-12

**IL-18** : interleukine-18

**INH** : Isoniazide

**Kg** : Kilogramme

**LCR**: liquide céphalo-rachidien.

**LED**: Light Emitting Diode

**LJ** : Lowenstein-Jensen

**LRM** : Laboratoire Rodolphe Mérieux

**mAGP**: mycolyl arabinogalactane-peptidoglycane

**MGIT**: Mycobacterial Growth Indicator Tube

**MTB**: *Mycobacterium tuberculosis*

**NALC**: N-acétyle-L-cystéine.

**NRAMP** : Natural Resistance-Associated Macrophage Protein

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PANTA** : Polymyxine B Amphotéricine B Acide Nalidixique Triméthoprime et Azlocine

**PG** : peptidoglycane

**PIT** : primo-infection tuberculeuse

**PNLT** : le programme national de lutte contre la tuberculose

**POA** : acide pyrazinoïque

**PSM** : Poste de sécurité microbiologique

**R** : Résistance

**RIF** : Rifampicine

**STR** : Streptomycine

**TAG** : techniques d'amplification génique

**TB** : tuberculose.

**TB-MR**: Tuberculose multi résistante.

**TEP**: Tuberculose extra pulmonaire

**TLR8**: Toll-Like Receptor 8

**VIH** : Virus l'immunodéficience Humaine.

**ZN** : Ziehl-Neelsen

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I:</b> Classifications des médicaments antituberculeux selon le groupe .....	22
<b>Tableau II:</b> Spectres et mécanismes d'action des antituberculeux majeurs .....	23
<b>Tableau III:</b> Principaux antibiotiques utilisés dans le traitement de la tuberculose.....	26
<b>Tableau IV :</b> Expression des résultats de l'examen microscopique selon le nombre de bacilles observés par champ microscopique au grossissement 1000 par la méthode de Ziehl Neelsen.....	31
<b>Tableau V:</b> Expression des résultats de l'examen microscopique selon le nombre de bacilles observés par champ microscopique au grossissement 40 des frottis colorés à l'Auramine.....	31
<b>Tableau VI:</b> Résultat du test sensibilité aux antituberculeux des souches du complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en milieu liquide. ....	40
<b>Tableau VII:</b> Résultats du test de sensibilité et de résistance aux antituberculeux des souches de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> par la méthode test GenoType ® MTBC (Hain Lifescience). ....	42
<b>Tableau VIII:</b> Répartition des souches de MTB résistantes selon sexe des patients de l'étude. ....	44
<b>Tableau IX:</b> Répartition des souches de MTB résistantes aux antituberculeux selon le statut VIH des patients de l'étude.....	44
<b>Tableau X:</b> Répartition des patients selon la résistance aux antituberculeux et l'Age .....	45
<b>Tableau XI:</b> Répartition des patients selon le résultat du traitement.....	45

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Incidence de la TB dans le monde en 2019.....	6
<b>Figure 2:</b> Pourcentage de nouveaux cas de tuberculose avec MDR/RR-TB en 2019 .....	6
<b>Figure 3:</b> Structure de l'enveloppe des mycobactéries.....	9
<b>Figure 4:</b> Schéma du cycle infectieux du <b>M. tuberculeux</b> .....	12
Figure 5: Zones de réaction de GenoType® MTBDRplus(exemples) .....	19
<b>Figure 6:</b> Schéma de traitements des prélèvements pour recherche de <b>M.tuberculosis</b> .....	29
<b>Figure 7:</b> Schéma des étapes de coloration de Ziehl-Neelsen et de l'auramine .....	30
<b>Figure 8: Photographie de l'automate BACTEC® MGIT® de culture des mycobactéries (Photo personnelle Date :07/11/2021)</b> .....	32
<b>Figure 9:</b> Photographie des mycobactéries sur milieu Lowenstein Jensen (Photo personnelle du 07/11/2022) .....	33
<b>Figure 10 :</b> Photographie du test AgMPT64 du complexe Mycobacterium tuberculosis.....	34
<b>Figure 11:</b> Répartition des patients de l'étude selon la tranche d'âge. ....	37
<b>Figure 12:</b> Répartition des patients de l'étude selon le sexe (F= Féminin M= Masculin).....	38
<b>Figure 13:</b> Répartition des patients de l'étude en fonction de leurs statut VIH.....	38
<b>Figure 14:</b> Répartition des patients de l'étude selon les signes cliniques.....	39
<b>Figure 15:</b> Profil de résistance des souches de Mycobacterium tuberculosis aux antibiotiques. ....	41
<b>Figure 16:</b> Photographie des Bandelettes GenotypeMDRplus. ....	43

## Table des matières

<b>LISTE DES ENSEIGNANTS</b> .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>DEDICACES</b> .....	<b>v</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>vi</b>
<b>HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY</b> .....	<b>viii</b>
<b>SIGLES ET ABREVIATIONS</b> .....	<b>xiii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>xvi</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>xvii</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJECTIFS</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Objectif Général</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2. Objectifs Spécifiques</b> .....	<b>3</b>
<b>3. GENERALITES</b> .....	<b>4</b>
<b>3.1. Définition</b> .....	<b>4</b>
<b>3.2. Historique de la tuberculose</b> .....	<b>4</b>
<b>3.3. Epidémiologie</b> .....	<b>5</b>
<b>3.4. Facteurs de risque</b> .....	<b>7</b>
<b>3.5. Agent pathogène</b> .....	<b>7</b>
<b>3.6. Physiopathologie</b> .....	<b>10</b>
<b>3.6.1. Mode de Transmission</b> .....	<b>12</b>
<b>3.6.2. Aspects cliniques</b> .....	<b>13</b>
<b>3.7. Diagnostic</b> .....	<b>14</b>
<b>3.7.1. Diagnostic bactériologique</b> .....	<b>14</b>
<b>3.7.2. Diagnostic Histologique</b> .....	<b>17</b>
<b>3.7.3. Diagnostic radiologique</b> .....	<b>17</b>
<b>3.7.4. Diagnostic Biologie Moléculaire(20) :</b> .....	<b>18</b>
<b>3.7.5. Diagnostic immunologique</b> .....	<b>20</b>
<b>3.7.6. Diagnostic Sérologique</b> .....	<b>20</b>
<b>3.8. La Prévention</b> .....	<b>20</b>
<b>3.9. Le traitement</b> .....	<b>21</b>
<b>3.9.1. Les antituberculeux</b> .....	<b>21</b>
<b>3.9.2. Mécanismes de résistance</b> .....	<b>23</b>
<b>3.9.3. Différents schémas thérapeutiques</b> .....	<b>24</b>
<b>4. MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

<b>4.1. Matériels</b> .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>4.1.1. Lieu d'étude</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1.4. Echantillonnage</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1.5. Variables mesurées</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2. Méthodes</b> .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>4.2.1. Prélèvements</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2.2. Transport et conservation des échantillons :</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2.3. Méthodes de traitement des échantillons au laboratoire :</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2.4. Culture :</b> .....	<b>31</b>
<b>4.2.5. Identification :</b> .....	<b>33</b>
<b>4.2.6. Sensibilité aux antibiotiques</b> .....	<b>34</b>
<b>4.2.6.1. Antibiogramme en milieu liquide (MGIT™ AST)</b> .....	<b>34</b>
<b>4.2.7. Conservation des souches :</b> .....	<b>35</b>
<b>4.2.8. Contrôle de qualité</b> .....	<b>35</b>
<b>4.2.9. Saisie et analyse des données</b> .....	<b>36</b>
<b>4.2.10. Considérations éthiques</b> .....	<b>36</b>
<b>5. RESUSTATS</b> .....	<b>37</b>
<b>5.1. Sociodémographiques</b> .....	<b>37</b>
<b>5.2. Cliniques</b> .....	<b>38</b>
<b>5.3. Bactériologiques</b> .....	<b>40</b>
<b>6. Discussion</b> .....	<b>46</b>
<b>6.1. Résultats Globaux</b> .....	<b>46</b>
<b>6.2. Caractéristiques socio-démographiques et cliniques</b> .....	<b>46</b>
<b>7. CONCLUSION</b> .....	<b>49</b>
<b>8. Recommandation</b> .....	<b>50</b>
<b>9. REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>51</b>
<b>10. ANNEXES</b> .....	<b>55</b>
<b>SERMENT DE GALIEN</b> .....	<b>82</b>

## 1. INTRODUCTION

La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse chronique et contagieuse due au complexe *Mycobacterium tuberculosis* (1). À la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, la TB était déjà connue comme étant une pathologie associée à une morbidité et mortalité élevée. De nos jours, l'ampleur morbide et mortelle due à *Mycobacterium tuberculosis* (**MTB**) dans le monde reste inquiétante (2).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en 2019, 10 millions de personnes ont contracté la tuberculose et 1,4 million en sont mortes (dont 208000 patients vivant avec le VIH). La TB est l'une des 10 premières causes de décès dans le monde et la première cause de décès due à un seul agent infectieux (devant le VIH/sida)(3). Tous les pays sont touchés mais la plupart des cas (85%), se produisent en Asie (55%) et en Afrique (30%) (4).

L'un des principaux facteurs alimentant l'épidémie de la tuberculose est l'émergence et la propagation des souches de **MTB** résistantes aux médicaments, sur des nouveaux cas et déjà traités, ce qui crée une condition menaçante et difficile pour la prévention et le contrôle de la tuberculose (5). Selon l'OMS, en 2019, environ 3,3% des nouveaux cas et 18% des cas précédemment traités avaient une tuberculose résistante à la rifampicine (TB-RR), et 13,1% des nouveaux cas et 17,4% des cas ayant précédemment reçu un traitement, présentaient une résistance à l'isoniazide (3).

Le Mali, un grand pays aux ressources limitées, a enregistré en 2020, 6 922 cas incidents de tuberculose dont 22 patients TB-MR pour une incidence de 53 cas pour 100 000 habitants (6). L'OMS estime qu'environ 1 % des nouveaux patients tuberculeux et 14 % des patients précédemment traités au Mali sont atteints de TB-MR (7).

Bien que la mise en œuvre de la Stratégie DOTS (directly observed treatment, short-course) et de la Stratégie « Halte à la tuberculose » aient donné des résultats significatifs, le contrôle de la tuberculose, basé prioritairement sur le diagnostic précoce et le traitement adéquat des malades tuberculeux, reste un défi majeur en matière de santé publique dans le monde entier et, surtout, dans les pays en développement (8).

Le traitement de la tuberculose s'effectue en général par l'antibiothérapie multiple associant des antimycobactériens. Une résistance à l'un des quatre antibiotiques principaux notamment streptomycine (STR), Isoniazide (INH), rifampicine (RIF) et Ethambutol (EMB), rend le

traitement plus difficile et plus onéreux. La détection rapide de ces isolats résistants est essentielle pour une prise en charge efficace des patients (9). Les tests de sensibilité aux médicaments (DST) individuels des patients ne sont pas universellement accessibles au Mali, avec seulement quelques laboratoires (10).

Au Mali comme dans la plupart des pays, la Cellule Sectorielle De Lutte Contre Le VIH SIDA La Tuberculose et Les Hépatites Virales (CSLS-TBH) est confronté à d'énormes difficultés pour atteindre ses objectifs et améliorer ses indicateurs de performance (11). Parmi les indicateurs de fonctionnement des programmes, la surveillance des résistances est un outil essentiel pour s'assurer de la qualité des actions entreprises (12).

Ainsi une connaissance des niveaux de résistance primaires de *Mycobacterium tuberculosis* est essentielle pour évaluer et améliorer les performances d'un programme de lutte contre la tuberculose (13), car il reflète de la transmission des bacilles résistants dans une population donnée (14).

En raison de tous ces facteurs, la présente thèse se propose d'étudier la sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis* aux antituberculeux chez les personnes n'ayant jamais subi un traitement antituberculeux.



## **2. OBJECTIFS**

### **2.1.Objectif Général**

Evaluer la fréquence de la résistance primaire du bacille tuberculeux aux antituberculeux chez les patients des communes III et VI du district de Bamako.

### **2.2.Objectifs Spécifiques**

- 1) Identifier les souches de Mycobactéries isolées chez les patients suspects de tuberculose.
- 2) Déterminer la sensibilité aux antituberculeux des souches du complex *Mycobacterium tuberculosis* isolées chez les patients nouvellement diagnostiqués.
- 3) Comparer les niveaux de résistance primaire entre les patients tuberculeux et ceux vivant avec le VIH.

### 3. GENERALITES

#### 3.1.Définition

La tuberculose est une maladie infectieuse contagieuse causée par des bactéries appartenant au groupe *Mycobacterium tuberculosis* complexe. Le principal agent responsable est *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacille de Koch (15).

#### 3.2.Historique de la tuberculose

La tuberculose est une affection connue depuis l'antiquité, mais au cours des temps, elle a connu des évolutions concernant son entité, son diagnostic et son traitement.

Depuis HYPPOCRATE, la tuberculose était connue dans le cadre des maladies respiratoires, le terme de tuberculose vient des tubercules ou nodules fermes que provoque la maladie (16).

En 1819, la tuberculose trouvera son identité grâce aux œuvres de Théophile René Marie LAENNEC (1781-1826). Il isole et reconnaît la tuberculose qu'il distingue des autres affections pulmonaires, et affirmera son unicité tant sur le plan anatomique que sur le plan clinique (17).

En 1860, la découverte de la cellule géante par LANGHANS (qui porte désormais son nom) et celle du follicule tuberculeux par FRIEDLANDER, KOSTER et VIRCHOW vont faire un grand pas dans le diagnostic histologique de la tuberculose. Ce n'est qu'en 1865 que Jean-Antoine Villemin a suspecté la nature microbienne de la tuberculose en reproduisant une infection analogue à la phtisie sur des lapins et des cochons d'Inde, et ce, après les avoir inoculés avec un homogénat préparé à partir de lésions tuberculeuses (18).

En 1882, ROBERT KOCH identifia l'agent pathogène et mit au point les premières techniques de sa coloration. Ce bacille alcool-acido-résistant (BAAR) porte depuis son nom « Bacille de Koch » (16).

En 1885, ZIEHL et NEELSEN mirent au point une méthode de coloration spécifique aux mycobactéries basée sur leur acido-alcool-résistance. Cette méthode de coloration est aujourd'hui utilisée dans les laboratoires d'analyses médicales pour le diagnostic biologique de la tuberculose (19).

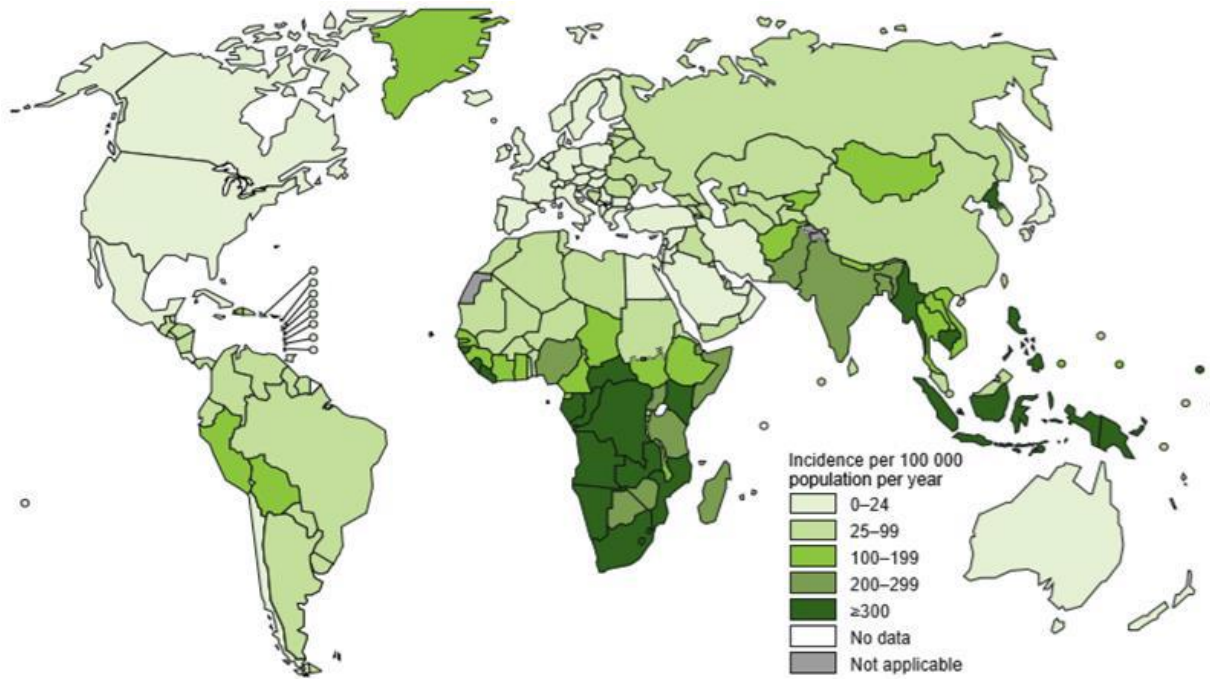
En 1895, ROETGEN met en application médicale sa découverte des rayons X pour détecter et décrire les lésions tuberculeuses. Et SMITH, en 1896 mit en évidence l'existence de deux BAAR : Humanis et Bovis (16).

CALMETTE et GERIN découvrent le vaccin antituberculeux qui porte leurs noms « BCG » et fut appliqué à l'homme pour la première fois en 1921, marquant une étape importante dans la prophylaxie de la maladie (16).

En 1944, S.A. WAKSMAN découvre le premier antibiotique actif contre le bacille tuberculeux (17) Mais la monothérapie avec cette dernière entraînait l'apparition de souche résistante à la streptomycine. La combinaison avec d'autres antibiotiques comme l'acide paramino-salicylique (1949), l'isoniazide (1952), le Pyrazinamide (1954), la cyclopyrine (1955), l'Ethambutol (1962) et la rifampicine (1963), pallia ce problème (18).

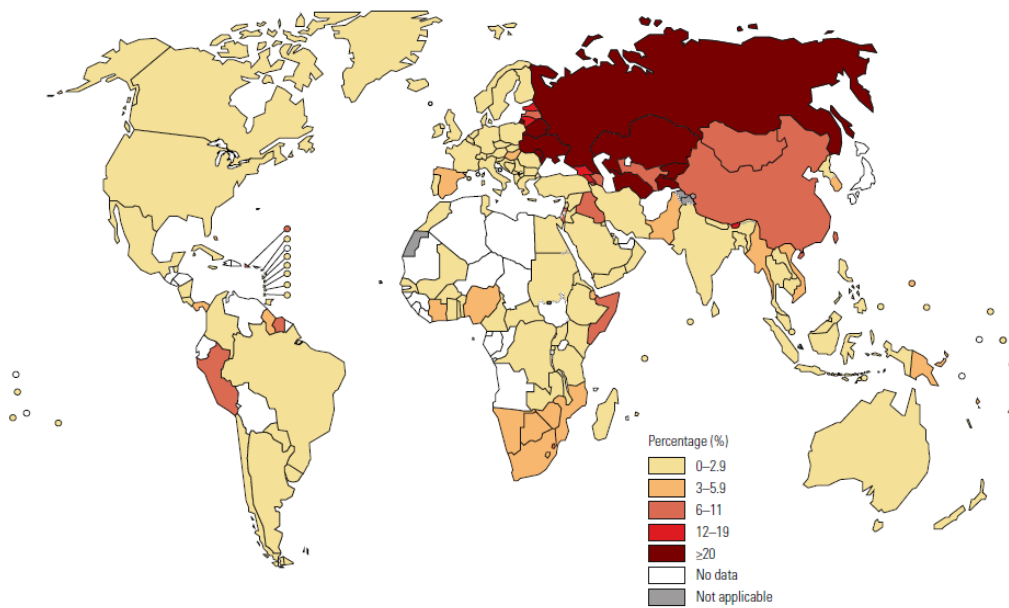
### **3.3.Epidémiologie**

La TB demeure une menace persistante et majeure en matière de santé publique mondiale(2) . A l'échelle mondiale, on estime que 1,7 milliard de personnes sont infectées par *M. tuberculosis* et que 5 à 15% d'entre elle développeront une tuberculose évolutive au cours de leur vie(11). Elle est la principale cause de décès due à un agent infectieux unique, devant le VIH/Sida(20). En 2019, d'après l'OMS, il y a eu 1,2 million de décès par tuberculose dans la population VIH-négative, auxquels se sont s'ajoutés 208000 décès dans la population VIH-positive. On estime que 10,4 millions de personnes sont tombées malades de la tuberculose en 2019, dont 56% d'hommes (âgés de 15 ans ou plus), les femmes représentaient 32% et les enfants (âgés de moins de 15 ans) pour 12%. La plupart des personnes qui ont développé la tuberculose en 2019 étaient dans les régions OMS de l'Asie du Sud-Est (44%), Afrique (25%) et le Pacifique occidental (18%), avec des pourcentages en Méditerranée orientale (8,2%), les Amériques (2,9%) et Europe (2,5%) (3).



**Figure 1:** Incidence de la TB dans le monde en 2019 (11).

En 2019, la tuberculose multirésistante demeure une crise de santé publique et une menace pour la sécurité sanitaire. En 2019, 206 030 cas de tuberculose multirésistante (dont 3,3% des nouveaux cas et 18 % des cas précédemment traités avaient une TB-MR/RR) ont été détectés et notifiés dans le monde, soit une augmentation de 10 % par rapport aux 186 883 cas enregistrés en 2018 (3).



**Figure 2:** Pourcentage de nouveaux cas de tuberculose avec MDR/RR-TB en 2019 (21)

### 3.4. Facteurs de risque

Les facteurs expliquant la disparité de la distribution des cas de tuberculose sont multiples. Plusieurs ont été identifiés et peuvent être classés en trois catégories : les facteurs sociaux et comportementaux, les facteurs physiologiques et génétiques et les facteurs liés à une immunosuppression (22) :

- **Facteurs Sociaux et Comportementaux** : La plupart des facteurs sociaux influençant l'épidémiologie de la tuberculose sont associés à la pauvreté, la malnutrition et des conditions de vie insalubres (23).
- **Facteurs physiologiques et génétique** : Au niveau mondial, il y a deux fois plus d'hommes adultes atteints de tuberculose que de femmes. Cette disparité aurait des origines hormonales, génétiques et métaboliques (23).
- **Facteurs liés à une immunodépression** : Ce sont tous les facteurs susceptibles de diminuer les moyens de défense de l'organisme. Une affection entraînant une immunodéficience comme l'infection par le VIH, ou le diabète, ou encore un traitement au long cours aux corticoïdes ou aux immunosuppresseurs (24).

### 3.5. Agent pathogène

La tuberculose est une maladie infectieuse causée par *Mycobacterium tuberculosis* qui appartient à la famille des *Mycobacteriaceae*, ordre des Actinomycétales(4).

#### 3.5.1. Classification

Le genre *Mycobacterium* rassemble plus de 80 espèces qui sont réparties en 3 groupes classés en fonction de leur pouvoir pathogène :

- ❖ Le complexe *Mycobacterium tuberculosis* : les principales espèces dans ce groupe sont *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti* et *Mycobacterium microti* (22) :
- *Mycobacterium tuberculosis* : est responsable de la tuberculose humaine.
- *Mycobacterium bovis* : provoque chez les bovins des lésions tuberculeuses pulmonaires, des lésions des glandes mammaires. Il peut être pathogène pour tous les mammifères et également pour l'homme qui se contamine à partir du réservoir animal par inhalation de particules infectées.

- ***Mycobacterium africanum*** : est responsable de tuberculoses humaines en Afrique, est plus rare en Europe.
  - ***Mycobacterium microti*** : est une espèce très peu pathogène pour l'homme qui infecte les rongeurs et les bovins.
  - ***Mycobacterium canetti*** : est rarement responsable de tuberculose, ces cas ont été décrits en Afrique.
- ❖ Les mycobactéries atypiques. Cultivables in vitro, elles n'ont pas de pouvoir pathogène par injection sous-cutanée chez le cobaye. La plupart sont des espèces saprophytes. Certaines, considérées comme des bactéries opportunistes, peuvent occasionnellement être à l'origine d'infections humaines appelées mycobactérioses. Elles ne manifestent un pouvoir pathogène qu'à la faveur d'une défaillance des défenses de l'hôte (immunodépression, VIH). C'est notamment le cas de ***Mycobacterium avium*** intra cellulaire, ***Mycobacterium kansasii*** ou ***Mycobacterium xenopi*** (16). Certaines mycobactéries atypiques sont des espèces pathogènes : ***Mycobacterium ulcerans*** est la seule mycobactérie à posséder une toxine et ***Mycobacterium marinum*** présente un pouvoir pathogène cutané.
- ❖ ***M. leprae*** responsable de la lèpre, ce groupe comprend : ***M. leprae*** ou Bacille de Hansen (responsable de la lèpre humaine) et ***M. lepraemurium*** (responsable de la lèpre du rat) (11).

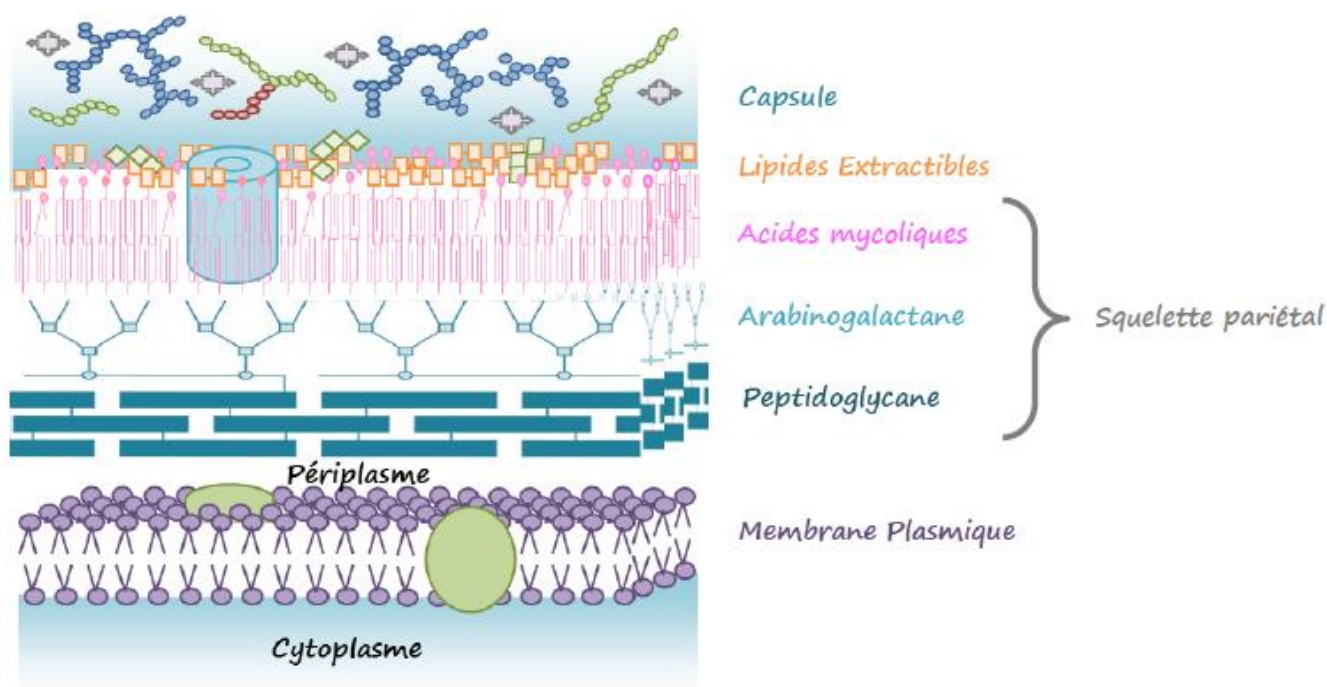
### 3.5.2. Morphologie

Au microscope, les mycobactéries du CMT se présentent sous forme de bâtonnets d'où leurs dénominations de bacilles ; ils sont légèrement incurvés et se regroupent volontiers en amas. Ils mesurent entre 1 et 10  $\mu\text{m}$  de long pour 0,2 à 0,6  $\mu\text{m}$  de large et ne disposent d'aucun appareil de locomotion (flagelles). En tant que procaryote, c'est-à-dire des organismes sans noyau véritable délimité par la membrane nucléaire, les mycobactéries ont une structure physique commune à celle des autres cellules à paroi bi-membranée : présence de deux membranes superposées, la membrane interne ou membrane cytoplasmique et la membrane externe ou enveloppe cellulaire encore appelée paroi cellulaire (2).

Elles se colorent difficilement par les colorants usuels, leurs visualisations au microscope optique n'est possible qu'en utilisant des colorations particulières (l'auramine et Fischine) qui imprègnent la paroi du bacille riche en cires (24).

### 3.5.3. Structure

En tant que procaryote, c'est-à-dire des organismes sans noyau véritable délimité par la membrane nucléaire, les mycobactéries ont une structure physique commune à celle des autres cellules (2). Mais La nature chimique de l'enveloppe des mycobactéries est différente de celle des autres bactéries (11). Une des caractéristiques majeures des mycobactéries est la richesse de leur paroi en lipides (60%) et, en particulier, en acides mycoliques (acides gras à longue chaîne). Ce haut contenu lipidique les rend imperméables aux colorants basiques (25).



**Figure 3:** Structure de l'enveloppe des mycobactéries (26).

### 3.5.4. Caractères biochimiques

*M. tuberculosis* est aérobie strict, nitrate positif. Au cours de sa croissance il synthétise une quantité importante d'acide nicotinique ou niacine qui peut être mise en évidence par une épreuve biochimique, le test de KONNO ou niacine-test. La positivité de cette épreuve est spécifique de *M. tuberculosis* (27).

### 3.5.5. Caractères Antigéniques (18) :

Le lipoarabinomannane est un glycolipide de haut poids moléculaire, résistant à la température, composant majoritaire de la paroi bactérienne. Cette molécule n'est pas spécifique pour le complexe MTB mais plusieurs groupes ont montrés la présence de

concentrations mesurables de lipoarabinomannane dans les expectorations ou dans les urines des patients atteints de tuberculose. L'antigène MPT64, est une protéine incriminée dans la virulence et sécrétée par les mycobactéries du complexe tuberculosis à l'exception de certaines souches de *M. bovis* (BCG).

### 3.5.6. Caractères culturels

La qualité nutritionnelle de l'environnement détermine le mode de vie du bacille et ses limites, que ce soit dans l'habitat naturel ou dans les milieux de cultures, comme la disponibilité de l'oxygène, la température, le pH et la salinité(18) . *M. tuberculosis* ne pousse pas sur les milieux usuels. Il nécessite des milieux très enrichis. Le plus employé est un milieu à l'œuf, le milieu de LOEWENSTEIN-JENSEN. Sur ce milieu il donne des colonies de teinte crème-beige, sèches, à surface rugueuse, en chou-fleur, tout à fait caractéristiques. Fait important, les colonies n'apparaissent qu'en 21 jours en moyenne (temps de division de *M. tuberculosis* = 20 heures) (28).

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

- Milieux de Lowenstein-Jensen;
- Milieux de Dubos ;
- Milieux Middlebrook 7H11, 7H10, 7H9.
- Milieux liquide MGIT.

Le temps de division de *M. tuberculosis* étant de 20H en moyenne, les cultures ne seront positives qu'après au moins trois semaines d'incubation à 37°C pour les milieux solides et une à deux semaines d'incubation à 37°C pour les milieux liquides (11).

### 3.6. Physiopathologie

La tuberculose est transmise par voie aérienne et interhumaine, par des gouttelettes de sécrétions respiratoires aérosolisées contenant la mycobactérie (*M. tuberculosis*), ces particules pouvant demeurer dans l'air pendant plusieurs minutes à quelques heures (29) .

Une fois que le bacille inhalé, au niveau des alvéoles, il est reconnu grâce à des éléments de sa paroi, est phagocyté par différentes cellules immunitaires : les macrophages alvéolaires, les cellules dendritiques qui sont des cellules présentatrices d'antigène et les polynucléaires neutrophiles. Ce sont la première barrière de défense non spécifique (immunité innée)(30) .



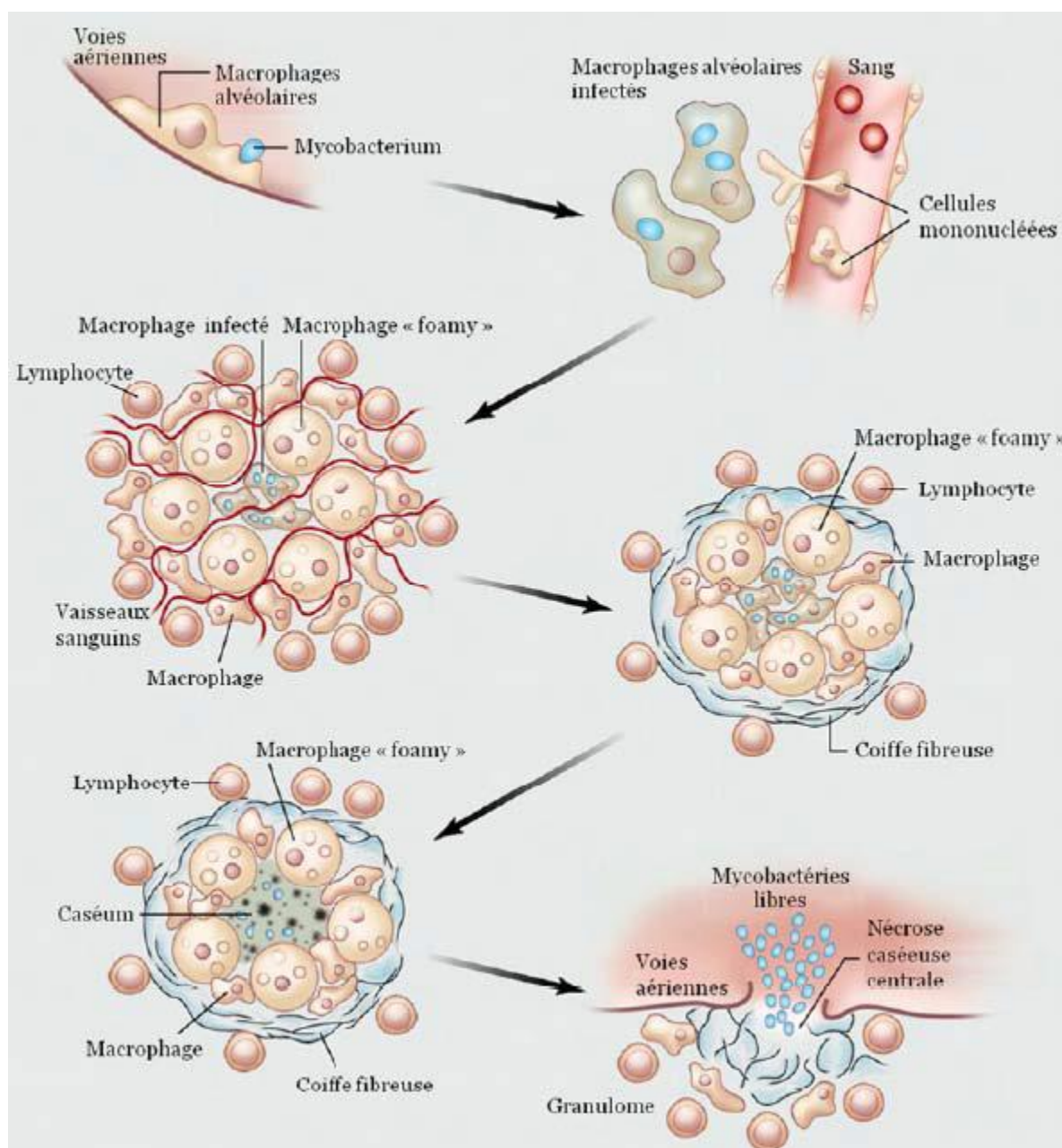
La bactérie va pouvoir se multiplier en intracellulaire dans les macrophages aboutissant à un granulome inflammatoire ou granulome tuberculoïde contenant environ  $10^5$  bacilles.

A partir de là deux possibilités se présentent :

- ✚ Dans 90% des cas, l'évolution se fait vers la guérison spontanée, en laissant une cicatrice de primo-infection.
- ✚ Dans 10% des cas, l'évolution se fait vers la tuberculose maladie : 8 cas sur 10 se manifestent dans l'immédiat et les 2 cas sur 10 restants apparaissent tardivement.

Il y aura donc un granulome avec une zone de nécrose caséuse fermée où le nombre de bacilles atteint un million, jusque-là on est devant une tuberculose fermée c'est-à-dire maladie non contagieuse. Si ça évolue, on assistera à l'augmentation de la quantité de caséum qui va fistuliser les parois environnantes et se déverser vers l'extérieur, entraînant ainsi une émission importante des mycobactéries, environ cent millions : on est devant une tuberculose ouverte c'est-à-dire maladie contagieuse. Le sujet contagieux va en contaminer d'autres (16).

L'immunité cellulaire intervient 2 à 8 semaines après l'infection. Les lymphocytes T activés et les macrophages forment des granulomes qui limitent la multiplication et la diffusion de *M. tuberculosis*. Les macrophages alvéolaires infectés par *M. tuberculosis* sécrètent l'interleukine-12 (IL-12) et l'IL-18 stimulant ainsi les lymphocytes T (surtout les CD4+) qui libèrent à leur tour l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), dont le rôle est crucial pour le contrôle de l'infection, favorisant en particulier la phagocytose de *M. tuberculosis* par les macrophages et la libération de TNF- $\alpha$ , dont l'importance est fondamentale pour la formation du granulome. Lorsque la réponse immune de l'hôte ne peut contenir la réplication de *M. tuberculosis* associée à la primo-infection tuberculeuse, la tuberculose maladie survient (31).



**Figure 4:** Schéma du cycle infectieux du *M. tuberculosis* (23)

### 3.6.1. Mode de Transmission

La transmission de la tuberculose est essentiellement interhumaine par les gouttelettes de pflugge. Les bacilles extracellulaires des foyers caséux et des cavernes sont éliminés dans l'air par les malades bacillifères toussant ou parlant. Ils restent en suspension dans l'air et peuvent être inhalés par tout sujet dans cet environnement. L'inhalation par un sujet de bacilles tuberculeux l'expose à la survenue de l'infection tuberculeuse, et de la maladie tuberculeuse. Les autres modes de transmission sont très rares. Les tuberculoses extra

pulmonaires sont peu contagieuses, à l'exception du corps médical en contact avec les fluides de malades (32).

### **3.6.2. Aspects cliniques**

#### **3.6.2.1. Tuberculose pulmonaire primaire ou primo-infection**

La primo-infection tuberculeuse (PIT) traduit le premier contact de l'organisme avec le BK(18) . Dans 90 % des cas, elle n'évolue pas vers une maladie ; dans 10 % des cas chez l'adulte, suite à une diffusion par voie sanguine et lymphatique, elle conduit à une forme disséminée : la tuberculose active(20) . Le diagnostic de la tuberculose latente, persistance de *M. tuberculosis* complexe après la primo-infection, repose sur l'élimination du diagnostic de tuberculose active par un interrogatoire précis, un examen clinique rigoureux et une radiographie du thorax (22).

#### **3.6.2.2. La tuberculose pulmonaire :**

La tuberculose-active ne se développe que chez environ 10% des personnes infectées par *M. tuberculosis*. Elle peut se développer soit directement après la primo-infection, soit après plusieurs années suite à la réactivation de l'infection tuberculeuse latente. Dans ce cas, la lésion précédemment formée se nécrose et les bacilles tuberculeux quiescents sont libérés (25). Le plus souvent, les symptômes s'installent progressivement et persistent plusieurs semaines. Les signes cliniques associent habituellement une altération de l'état général avec asthénie, amaigrissement et anorexie, une fièvre, des sueurs nocturnes quasi constantes, et des signes respiratoires (toux prolongée, expectoration mucopurulente, douleurs thoraciques). La radiographie du thorax est évocatrice par la localisation et l'aspect des lésions (16).

#### **3.6.2.3. Tuberculoses extra pulmonaires**

La tuberculose pulmonaire (ou phtisie) est la forme la plus commune de la tuberculose (85% des cas), cependant les bacilles tuberculeux peuvent, plus rarement, être transportés dans tout l'organisme, via les systèmes lymphatique et sanguin, créer de nouveaux foyers infectieux et provoquer une tuberculose extra-pulmonaire (15% des cas). Les bacilles peuvent infecter différents organes du corps tels que les os, les reins, les ganglions, les méninges, l'intestin, la peau. Lorsque la tuberculose est extra-pulmonaire, les symptômes peuvent varier en fonction de la région corporelle atteinte (25). Nous avons :

- **Les ganglions (Tuberculose ganglionnaire) :** C'est la forme la plus fréquente des tuberculoses extra-pulmonaires, soit entre 30 et 60 % de l'ensemble des TEP (22).
- **Les méninges (Tuberculose neuro-méningée) :** elle est une forme fréquente chez les enfants de moins de 2 ans et les adultes infectés par le VIH (20).
- **Les Os (Tuberculose ostéoarticulaire) :** La tuberculose ostéoarticulaire (TOA) représente 3 à 5 % de l'ensemble des tuberculoses et environ 15 % des tuberculoses extra pulmonaires (29). La plus fréquente localisation ostéoarticulaire est la spondylodiscite tuberculeuse ou Mal de Pott. Elle correspond à une atteinte vertébrale et discale avec formation d'abcès froids paravertébraux pouvant entraîner des déformations rachidiennes et des tassements vertébraux ainsi que des complications neurologiques par compression (20).
- **Tuberculose Urogénitales (TU)** La tuberculose urogénitale est une localisation assez rare de l'infection par le bacille tuberculeux(33). Les formes génitales sont considérées comme graves parce qu'elles peuvent se compliquer, d'infertilité (11).
- **Tuberculose digestive :** La tuberculose digestive constitue l'une des formes les plus communes de la tuberculose extra pulmonaire, elle occupe le troisième rang après la forme pleurale et ganglionnaire (34).
- **Tuberculose disséminée ou miliaire:** La miliaire tuberculeuse est une forme grave, aiguë de tuberculose due à la dissémination lymphohématogène des bacilles tuberculeux à partir d'une lésion focale rompue dans le flux sanguin ou lymphatique (35).

### 3.7. Diagnostic

Le diagnostic de la tuberculose est la reconnaissance d'un cas évolutif, c'est-à-dire d'un patient présentant la maladie clinique due à *M. tuberculosis*(31). En effet le diagnostic est évoqué devant des données cliniques, et radiologiques, mais la confirmation n'est que bactériologique parfois histologique sans que cette dernière ne soit spécifique (36).

#### 3.7.1. Diagnostic bactériologique

##### 3.7.1.1. Prélèvements

Afin de diagnostiquer une tuberculose il faut tout d'abord réaliser des prélèvements dont le site est fonction du siège de la maladie. Pour la tuberculose pulmonaire on fait appel aux expectorations spontanées ou induites, au tubage gastrique, aux aspirations bronchiques et au

lavage broncho-alvéolaire. Pour la tuberculose extra pulmonaire, il y a les liquides de ponction pleurale, péritonéale, articulaire, ganglionnaire, l'hémoculture (36).

La qualité des résultats fournis par l'examen bactériologique dépend en grande partie des conditions de recueil et de transport des prélèvements, de leur répétition et quelques fois de leur conservation (37).

### **3.7.1.2.Examen Direct**

Cet examen peut être effectué soit directement sur le produit pathologique soit après fluidification et décontamination. Le caractère d'acido-alcool-résistante des mycobactéries permet l'utilisation de colorations spécifiques : coloration de Ziehl Neelsen et auramine(38).

L'examen microscopique utilisant la coloration de Ziehl-Neelsen (ZN) est la méthode de diagnostic la plus répandue notamment dans les pays où les ressources sont limitées. Il permet un diagnostic rapide et peu coûteux des formes de tuberculoses pulmonaires bacillifères et donc contagieuses (39).

Le microscope à fluorescence et spécialement le microscope LED (Light Emitting Diode) permet de mettre en évidence le BK après la coloration à l'auramine ou de Dugommier. C'est aussi une méthode moins coûteuse. Sa sensibilité est meilleure (36).

### **3.7.1.3.La Culture**

Le diagnostic de tuberculose pulmonaire et extra pulmonaire repose essentiellement sur la culture, méthode de référence ou gold standard. Sa sensibilité est de 60 à 90 %, et sa spécificité est de 100 %. Elle permet le diagnostic des tuberculoses à microscopie négative notamment la tuberculose extra pulmonaire où le diagnostic est difficilement atteint par l'examen direct. Il faut distinguer les cultures sur milieu solide et sur milieu liquide (36).

#### **❖ Le milieu solide**

IL est représenté par le milieu de Lowenstein-Jensen (LJ), milieu le plus couramment utilisé, les colonies apparaissent en 3 à 4 semaines quand les prélèvements sont riches en bacilles et 6 semaines, voire plus quand ils sont pauci bacillaires(39).

Il existe aussi La culture sur milieu gélosé (milieu de Middlebrook) : les cultures sont examinées à la loupe binoculaire après 3 à 4 semaines (au lieu de 4 à 6 par la méthode classique (24).

### ❖ Milieu liquide

Les cultures sur milieu liquide se sont développées ces dernières années et ont permis de raccourcir les délais diagnostiques (39). Il est représenté par plusieurs systèmes automatisés non radioactifs. Parmi ceux-ci on peut citer (36):

- **La méthode Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT) :**

C'est une méthode manuelle et automatisable (Bactec960TB). Le principe est basé sur la présence d'un sel de ruthénium, élément fluorescent en lumière violette, dont la fluorescence croît lorsque la concentration en oxygène dissout induite par la multiplication bactérienne diminue.

- **La méthode BaCT/Alert :**

C'est une technique automatisée basée sur l'acidification du milieu provoquée par le métabolisme bactérien qui entraîne le virage de la couleur de la pastille contenue au fond du flacon.

- **La méthode Vera TREK :**

Il s'agit aussi d'une méthode automatisée qui détecte la croissance bactérienne grâce à des capteurs de pression. La technique se base sur la détection des modifications de pression dans la partie supérieure d'un flacon fermé en surveillant les modifications dans la production ou la consommation de gaz due à la croissance microbienne.

#### 3.7.1.4. Identification

Elle est basée sur des critères microscopique ( après coloration de Ziehl Nelson), macroscopique (aspect, morphologies ) et par leur réponse à des tests biochimiques ( les colonies de *M. tuberculosis* ont une activité catalasique, une activité nitrate réductase, et elles accumulent l'acide nicotinique ou niacine qui peut être révélé par le niacine-test) (24).

Les Mycobactéries peuvent être identifiées par des techniques moléculaires et des techniques antigéniques. Les techniques moléculaires reposent sur l'hybridation avec des sondes complémentaires de séquences génomiques spécifiques. Elle remplace avantageusement l'étude des caractères cultureux et biochimiques. Les bandelettes GenoType Mycobacterium® (HainScience) ou INNO LiPA Mycobacteria® (Innogenetics) dont les cibles respectives sont l'ARN 23S ou l'espace 16S-23S de l'ARN, permettent d'identifier *Mycobacterium tuberculosis* en culture, dans un délai de quelques heures seulement, avec une excellente sensibilité (≈100 %) et une excellente spécificité (≈95 %). Bien que ces bandelettes assurent, l'identification du complexe *M. tuberculosis* et des espèces de mycobactéries atypiques les plus fréquemment rencontrées, elles ne permettent pas d'identifier les espèces au sein du

complexe *M. tuberculosis*. La différenciation des espèces au sein du complexe tuberculosis est réalisée l'aide d'autres bandelettes génotype MTBC (Hain Lifescience).

Les techniques antigéniques reposent sur la détection par immuno- chromatographie de la protéine MPT64 spécifique aux mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* (à l'exclusion de quelques souches de *M. bovis* BCG) dans le milieu de culture liquide ou solide pendant la phase de croissance (20).

#### 3.7.1.5. Etude de la sensibilité

La mesure de la sensibilité aux antibiotiques de la souche de mycobactérie du complexe tuberculosis vient compléter son isolement et son identification.

Différentes méthodes sont utilisées :

- Méthode classique manuelle de référence : la résistance des BK aux antibiotiques est la conséquence des mutations. On détecte dans la population de bacille infectant chez un malade, les mutants résistants à des concentrations d'antibiotiques voisines de celles obtenues in vivo au cours des traitements. Si la proportion de mutants résistants dépasse un taux de 1%, le traitement risque d'être inefficace. C'est la méthode des proportions sur milieu LJ qui est utilisée.
- Il existe des méthodes semi-automatisées sur milieu gélosé 7H10, 7H11 ou sur milieu liquide (MGIT, BaCT/Alert etc...) (11).

#### 3.7.2. Diagnostic histologique

Sur un plan anatomopathologique, le processus inflammatoire provoque des lésions casées folliculaires qui font évoquer le diagnostic histologique de tuberculose indépendamment de l'organe examiné. Ces caractéristiques associent l'apparition de granulomes épithélioïdes et géantocellulaires, et la survenue fréquente d'une nécrose tissulaire particulière typique, la nécrose caséuse (aspect macroscopique de lait caillé, aspect microscopique de nécrose acidophile. Aussi, face à toute situation d'inflammation granulomateuse avec ou sans nécrose, une tuberculose doit être évoquée et faire pratiquer une coloration de Ziehl-Neelsen sur la coupe tissulaire (20).

#### 3.7.3. Diagnostic radiologique

Chez l'adulte, les images radiologiques de la tuberculose peuvent prendre différents aspects dont certains sont atypiques, surtout chez les personnes immunodéprimées. Il est

recommandé, si possible, de comparer les clichés à ceux pris antérieurement. Toute anomalie radiologique du thorax compatible avec une tuberculose ne constitue qu'une suspicion de la maladie ; une confirmation par des examens bactériologiques est indispensable pour confirmer le diagnostic (32).

#### 3.7.4. **Diagnostic Moléculaire** (20) :

Le diagnostic se base sur les techniques d'amplification génique (TAG). Elles permettent théoriquement de détecter rapidement la présence de bacille du complexe *Mtb* dans les prélèvements. Les cibles moléculaires des TAG sont soit des séquences spécifiques du complexe tuberculosis (IS 6110), soit des séquences universelles d'ARN ribosomiaux 16S ou 23S qu'ils détectent et amplifient.

Les méthodes de détection des produits amplifiés sont variées et font appel à des agents intercalants ou des sondes. Les principaux avantages de ces techniques sont l'absence d'étapes post-PCR avec pour conséquences une rapidité de la technique, du rendu des résultats, une diminution des risques de contamination et la possibilité d'ajouter des contrôles internes Co amplifiés et Co révélés.

La polymérase Chain réaction (PCR) ne permet pas la distinction entre BK mort et BK vivant. Elle ne renseigne pas sur le degré de contagion et ne reconnaît pas certaines mutations existantes. La PCR est utile pour confirmer rapidement la présence de Mycobacterium du complex tuberculosis en cas de prélèvement à microscopie positive, dans les tuberculoses pulmonaires, alors que son utilisation en cas de prélèvement négatif a peu d'intérêt dans le diagnostic de tuberculose. C'est donc pas un bon outil de suivi.

Un nouveau système permettant l'automatisation complète de l'analyse, Xpert MTB/RIF (Genexpert) a été développé. Il s'agit d'une PCR en temps réel automatisée qui détecte la présence du BK en même temps que les mutations les plus fréquentes (résistance à la rifampicine) en moins de 2 heures. Sa sensibilité est supérieure à 95 % lorsqu'il s'agit de prélèvements respiratoires ayant un examen direct positif, et varie entre 65 et 77 % en cas d'examen microscopique négatif. Sa spécificité est très élevée (97 % à 100 %). Son apport dans le diagnostic de la TEP est intéressant puisque sa sensibilité est de 77,3 % et sa spécificité est de 98,2 %. Cependant, un examen Genexpert négatif n'exclut pas le diagnostic de tuberculose.



### 3.7.4.1. Le test GenoType MTBC ( Hain Lifescience)

Le test GenoType® MTBC (Hain Lifescience,) est un test disponible dans le commerce qui combine la détection du complexe MTB avec la prédiction de la résistance à la rifampicine et à l'INH pour la version MTBDRplus, et détection des mutations associées aux résistances aux FQs et aux antibiotiques injectables (AMK, KAN...) dans la version MTBDRsl (40). Il comprend trois étapes : extraction d'ADN, amplification PCR multiplex et hybridation inverse (41). De façon pratique, des portions de gènes sont amplifiées par PCR à l'aide de plusieurs couples d'amorces biotinylées spécifiques de la région déterminant la résistance à l'ATB. Les produits PCR sont mis en contact avec les sondes de type sauvage et mutée fixées sur les bandelettes et complémentaires des produits d'amplification. La réaction colorimétrique révèle l'hybridation ainsi, les hybridations uniques sur des sondes sauvages traduisent le caractère sauvage du bacille pour le gène en question. À l'inverse, l'hybridation des produits PCR sur une sonde mutée traduit le caractère muté du locus étudié (2).

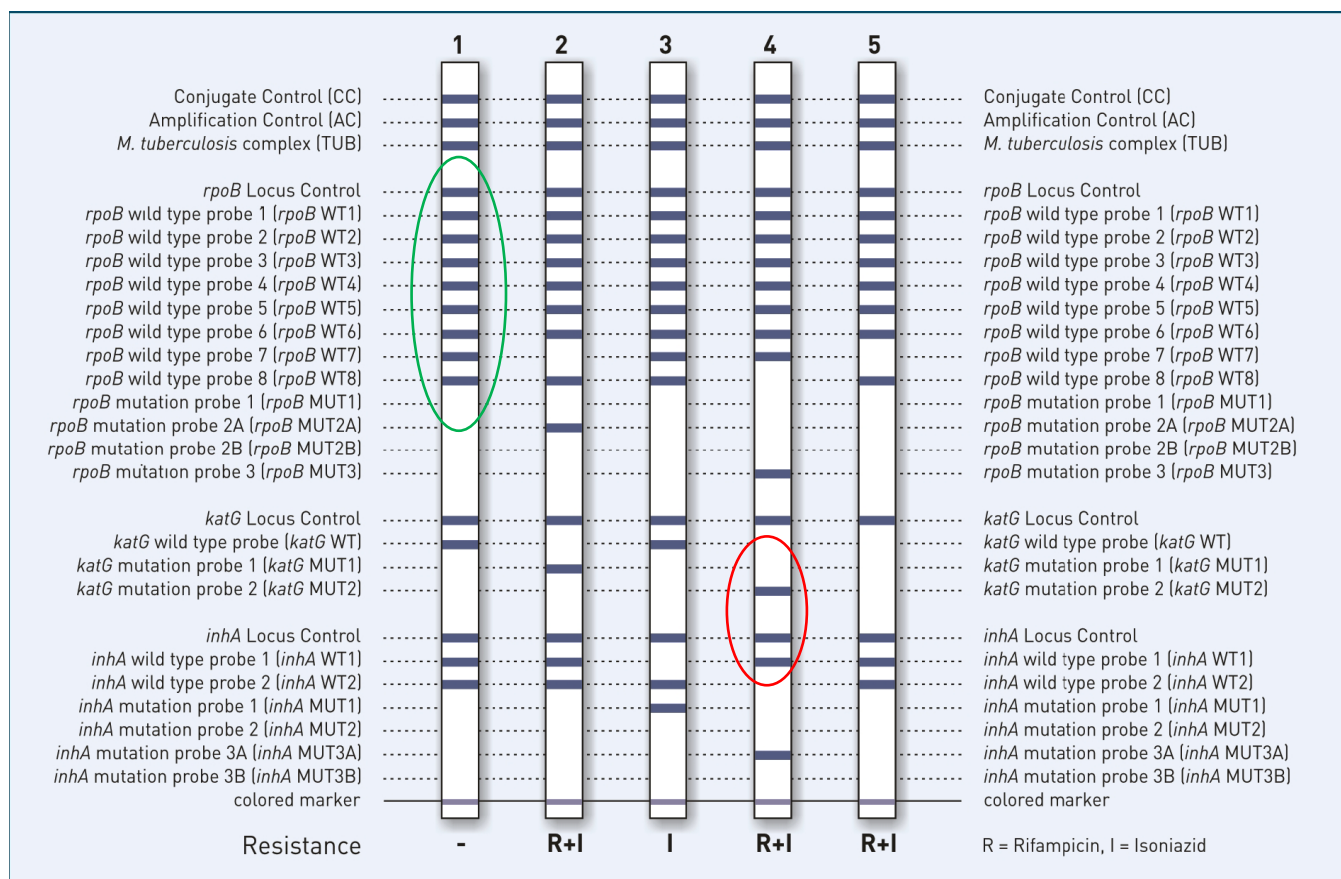


Figure 5: Zones de réaction de GenoType® MTBDRplus(exemples) (42)

### 3.7.5. Diagnostic immunologique

#### 3.7.5.1. L'intradermoréaction à la tuberculine (IDR) (43) :

L'intradermoréaction à la tuberculine est un test cutané qui explore l'hypersensibilité de type retardée induite par l'injection sous cutanée de composants antigéniques : la tuberculine (dérivé protéinique purifié = DPP) de *M. tuberculosis*. L'interprétation d'une IDR consiste à mesurer la taille de l'induration. Ainsi, l'infection tuberculeuse récente se traduit par un virage tuberculinique, c'est-à-dire l'augmentation de la réaction de l'IDR.

#### 3.7.5.2. Les tests interféron gamma release assays (IGRA)

Au cours de l'infection par le *Mtb*, l'interféron gamma est d'abord produit par les cellules de l'immunité innée, principalement les « naturels killers » puis en grande quantité par les lymphocytes Th1 exprimant des récepteurs spécifiques pour des antigènes de mycobactéries. Ce procédé naturel est mis à profit par les tests in vitro, qui permettent de doser l'interféron gamma produit par les lymphocytes T effecteurs qui ont eu contact récent avec le *Mycobacterium tuberculosis*. Les antigènes utilisés pour ce test correspondent à des protéines codées dans une région particulière du génome des mycobactéries du complexe tuberculosis, ces protéines sont absentes dans les souches atténuées du *M. bovis* utilisées dans la production du BCG. D'ailleurs ce test est plus spécifique par rapport à l'intradermoréaction à la tuberculine(88,7 %) (36).

### 3.7.6. Diagnostic Sérologique

Les techniques immuno-enzymatiques (Elisa A 60) permettent de détecter des anticorps (IgG, IgM, IgA) dirigés contre les antigènes spécifiques (LSD,DAT, PGLTb1) de *M. tuberculosis*. En plus, elles ne permettent pas la distinction entre tuberculose guérie ou tuberculose évolutive(20).

### 3.8. La Prévention

La première étape de ce type de prophylaxie débute dès le plus jeune âge par la vaccination(24). Dans le cas particulier de *Mtb* et de l'existence de la latence, les vaccins prophylactiques antituberculeux visent à prévenir l'infection, ou au moins à empêcher le développement de la TB active chez les individus non exposés à *M. tuberculosis* (44). Le seul vaccin disponible est le BCG, un vaccin vivant atténué (23). Les objectifs de la prévention de la tuberculose sont le dépistage le plus précoce de plus de cas possibles et l'identification

des cas résistants au traitement car elle permet de réduire la transmission aux sujets sains et de traiter ceux qui sont infectés.

### **3.9. Le traitement**

La Tuberculose est une maladie curable si un traitement approprié est prescrit à temps et est scrupuleusement respecté par le malade. Ce traitement a trois objectifs principaux. Le premier consiste à réduire rapidement la population de bactéries répliquées afin de résoudre les symptômes, prévenir la mort et prévenir la transmission de l'infection. Le deuxième consiste à éliminer les sous-populations de bactéries persistantes qui pourraient causer une rechute après avoir arrêté le traitement et ainsi obtenir une guérison durable. Le troisième consiste à prévenir l'apparition de la résistance aux médicaments pendant la thérapie. La thérapie combinée, l'utilisation simultanée d'antibiotiques multiples, est nécessaire pour atteindre ces objectifs(18) . Le traitement de la tuberculose est basé sur l'application d'une chimiothérapie basée sur l'association de plusieurs antituberculeux (24).

#### **3.9.1. Les antituberculeux**

Les médicaments antituberculeux essentiels sont au nombre de cinq : ( Isoniazide, Rifampicine, Pyrazinamide, Streptomycine, Ethambutol). Aucun d'entre eux n'est suffisamment efficace pour détruire tous les bacilles tuberculeux se trouvant chez un malade ; c'est pourquoi l'association de plusieurs médicaments antituberculeux est indispensable pour obtenir la guérison définitive d'un malade (24).

L'apparition de résistances aux antituberculeux de première ligne nécessite d'employer des antibiotiques dits de secondes et troisièmes lignes. Ces médicaments sont souvent moins efficaces, présentent plus d'effets secondaires, sont plus coûteux et moins pratiques d'utilisation (médicament injectable, conditions de stockage) (44).

Les médicaments antituberculeux sont regroupés en cinq groupes en fonction de l'efficacité, de la puissance, de l'expérience d'utilisation et de la classe des médicaments. Les médicaments du groupe 1 « première ligne » sont ceux recommandés pour le traitement de la tuberculose susceptible d'être sensible. Les médicaments «de deuxième ligne » (groupes 2, 3, 4) sont généralement réservés à la tuberculose résistante aux médicaments. Les médicaments de troisième intention (Groupe 5) ont une efficacité peu claire et / ou un rôle peu clair dans le traitement (18).

**Tableau I:** Classifications des médicaments antituberculeux selon le groupe (18)

<b>Classification des médicaments antituberculeux OMS 2011</b>		
<b>Groupe 1</b> Médicaments antituberculeux oraux de première intention	Isoniazide	<b>1<sup>ère</sup> Ligne</b>
	Rifampicine	
	Ethambutol	
	Pyrazinamide	
<b>Groupe 2</b> Médicaments antituberculeux injectables (Agents injectables ou parentéraux)	Streptomycine	<b>2<sup>ème</sup> ligne</b>
	Kanamycine	
	Amikacine	
	Capreomycine	
<b>Groupe 3</b> Fluoroquinolones	Levofloxacin	
	Moxifloxacin	
	Gatifloxacin	
	Ofloxacin	
<b>Groupe 4</b> Médicaments Antituberculeux bactériostatiques oraux de deuxième intention	Ethionamide/Prothionamide	
	Cyclosérine/ terizidone	
	p-Aminosalicylic acide	
<b>Groupe 5</b> Médicaments antituberculeux ayant des données limitées sur l'efficacité et la sécurité à long terme dans le traitement de la tuberculose résistante aux médicaments	Linezolid	
	Clofazimine	
	Amoxicilin-clavulanate	
	Meropenem	
	Isoniazide à forte dose	
	Thioacetazone	
	Clarithromycine	

**Tableau II:** Spectres et mécanismes d'action des antituberculeux majeurs(20)

<b>Principe actif</b>	<b>Mycobactéries sensibles</b>	<b>Type d'effet et Cibles principales</b>
Rifampicine	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. africanum</i> , <i>M. kansasii</i>	Bactéricide sur Bactéries extracellulaires et intra-macrophagiques
Isoniazide	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. africanum</i>	Bactéricide sur Bactéries extracellulaires de surface
Ethambutol	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. africanum</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. avium</i> , <i>M. xenopi</i>	Bactériostatique sur Bactéries extracellulaires et intra-macrophagiques
Pyrazinamide	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. africanum</i>	Bactéricide sur Bactéries intra-macrophagiques et du caséum

### 3.9.2. Mécanismes de résistance

Chez *M. tuberculosis*, il existe deux formes de résistance aux antibiotiques: la résistance acquise, causée par des mutations spontanées qui modifient son génome, et la résistance intrinsèque qui correspond à des mécanismes de défense naturels de la bactérie (23).

Une souche sauvage de bacilles contient naturellement une majorité de bacilles sensibles aux antituberculeux ainsi qu'un petit nombre de bacilles ayant subi une mutation lors de la multiplication (45).

Toutefois, lorsque le traitement antituberculeux est mal prescrit ou mal suivi par le malade, il peut entraîner la sélection de mutants résistants (résistance secondaire ou acquise), cause majeure d'échec thérapeutique. Un patient tuberculeux porteur d'une souche devenue

résistante peut contaminer son entourage, qui peut alors développer une tuberculose à bacilles d'emblée résistants (résistance primaire). Les souches ayant acquis une résistance aux antituberculeux de 1ère ligne les plus efficaces (Isoniazide et Rifampicine) sont dites multirésistantes (MDR : multi Drug- résistant tuberculosis). Les souches MDR ayant acquis en plus des mutations entraînant la résistance aux antituberculeux de 2ème ligne les plus efficaces (Aminosides injectable et les fluoroquinolones) sont quant à elles dites ultrarésistantes (XDR :extensively Drug résistant tuberculosis) (46).

Contrairement aux autres bactéries pathogènes qui acquièrent en général leur résistance aux antibiotiques par transfert horizontal de plasmides ou transposons portant des gènes de résistance, l'acquisition de résistance chez *M. tuberculosis* provient, presque toujours d'altérations spontanées de gènes chromosomiques spécifiques sous la forme de mutations ponctuelles non-synonymes, de délétions ou insertions. Par conséquent, la résistance n'est pas transférable entre les mycobactéries présentes chez un même patient, mais elle se transmet à toute la descendance. Jusqu'à présent, les mutations impliquées dans la résistance de *M. tuberculosis* aux antibiotiques ont été mises en évidence (25):

- Dans les gènes codant les protéines cibles de l'antibiotique, diminuant l'affinité de la cible pour cet antibiotique (RIF, EMB, FQ,)
- Dans un gène codant une enzyme impliquée dans l'activation de l'antibiotique, empêchant son passage de la forme prodrogue à la forme active (INH, PZA,)
- Dans une région génomique régulatrice provoquant la surexpression de la cible de l'antibiotique.

### 3.9.3. Différents schémas thérapeutiques

#### 3.9.3.1. Tuberculose latente (traitement préventif)

Une tuberculose latente sera recherchée chez les patients à risque (immunodéprimé, entourage d'un patient bacillifère) et diagnostiquée selon les procédures habituelles (intradermo-réaction, test à l'interféron positifs...). Après que le diagnostic de tuberculose maladie aura été strictement éliminé, deux schémas seront proposés chez l'adulte :

- ❖ INH en monothérapie pendant 6 mois (et jusqu'à 12 mois chez les immunodéprimés)
- ❖ RMP+INH pendant 3 mois, en privilégiant les associations fixes.

### 3.9.3.2. Tuberculose maladie (traitement curatif)

Le schéma thérapeutique varie selon que le patient ait été ou non traité antérieurement mais dans tous les cas, il comprend deux phases distinctes (47) :

- Une phase initiale ou intensive qui dure deux mois et qui sert à détruire rapidement les bacilles de *M. tuberculosis*, à prévenir l'apparition de bacilles résistants et à faire disparaître la contagiosité ;
- Une phase d'entretien : de durée variable selon la situation clinique. Cette phase sert à stériliser les lésions et prévenir ainsi les rechutes.

Au Mali les médicaments essentiels de premier ligne utilisés contre la tuberculose sont au nombre de cinq : l'**Isoniazide (H)**, la **Rifampicine (R)**, la **Pyrazinamide (Z)**, l'**Ethambutol (E)**, la **Streptomycine (S)**. Certains sont distribués sous formes combinées et proportions fixes :

- ✓ Double association : R+Z
- ✓ Triple association : R+H+Z et R+H+E
- ✓ Quadruple association : R+H+Z+E

Il y a 4 catégories de traitements standardisés et trois régimes retenues au Mali :

- ✓ Catégories I ou primo traitement
- ✓ Catégories II ou retraitement de première ligne
- ✓ Catégories III pour les enfants de 0-14 ans ayant une TB à microscopie négative ou une TB extra pulmonaire non grave
- ✓ Catégorie IV ou retraitement de deuxième ligne pour les cas de TB-MR

Les régimes de traitement sont :

- 2RHZE/4H pour catégorie I et III
- 2SRHZE/1RHZE/5RH pour la catégorie II
- Le traitement de la TB-MR fait appel aux médicaments de deuxième ligne, entre autres la Kanamycine (Km), la levofloxacine (Lfx), l'éthionamide (Eth), cyclosérine (Cs), la moxifloxacine (Mfx), la Prothionamide (Pto), clofazimine (Cfz)... Le schéma de deuxième ligne (ou traitement de catégorie IV) doit comprendre au moins 4 médicaments jamais utilisés par le malade, incluant un médicament en injectable et une fluoroquinolone. Le Mali a adopté le schéma de deuxième ligne préconisé par OMS dont la durée est de 21 mois : **6(Km-Lfx-Z-Eth-Cs) /15(Lfx-Z-Eth-Cs)**.

Un schéma court de 9 mois faite de **4(Km-Mfx-Pto-H-Cfz-E-Z)/5(Mfx-Cfz-E-Z)** est proposé et pourrait être appliqué après une étude de Validation qui est en préparation.(48)

**Tableau III:** Principaux antibiotiques utilisés dans le traitement de la tuberculose(11)

Médicaments	Posologie		Dose maximale Par jour (mg/j)
	Adultes	Enfant	
Isoniazide	4 à 5 mg/kg/j	5 à 10 mg/kg/j	300
Rifampicine	10 mg/kg/j	35 mg/kg/j	600
Pyrazinamide	20 à 30mg/kg/j	20 à 30 mg/kg/j	2000
Ethambutol	15 à 20mg/kg/j	15 à 25 mg/kg/j	2500
Streptomycine	15 mg/kg/j	15 mg/kg/j	1000



## **4. Méthodologies**

### **4.1.Lieu d'étude**

L'étude a eu lieu dans les centres de santé de référence de la Commune III et Commune VI du District de Bamako d'où les échantillons ont été recueillis. Le choix de ces deux sites se justifie par la densité de la population et la proximité avec le CICM pour le CS Réf CIII ; et du fait que la commune VI est la commune la plus vaste du District de Bamako et qui concentre le plus grand nombre de cas de tuberculose de la ville.

Les échantillons ont ensuite été acheminés au laboratoire Rodolphe Mérieux du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (CICM) de Bamako pour traitement.

### **4.2.Type et période d'étude**

Notre travail est une étude prospective descriptive qui s'est déroulée entre août 2020 et Avril 2021 soit 09 mois.

### **4.3.Population d'étude**

Tous les patients tuberculeux ayant été diagnostiqués aux Centres de Santé de Référence des Communes III et VI du district de Bamako pendant la période d'étude.

### **4.4.Critères d'inclusion**

Tout patient présentant une tuberculose à microscopie positive, enregistré comme nouveau cas dans le registre de la tuberculose du CS Réf durant la période de l'étude.

### **4.5.Critère de non inclusion**

N'ont pas été inclus dans notre étude les patients :

- Diagnostiqués en dehors de la période d'étude ;
- A microscopie négative au niveau du CS Réf ;
- Sous traitement antituberculeux ;
- Ayant déjà été traité pour tuberculose

### **4.6.Echantillonnage**

Nous avons procédé à des prélèvements d'expectoration des malades à tuberculose microscopie positive du CS Réf des commune III et VI du district Bamako. Le crachat est recueilli dans un tube conique et à vise, au réveille avant de manger. Il est acheminé directement au Laboratoire des CSRef, et puis au Laboratoire Rodolphe Mérieux pour la culture.

#### **4.7. Variables mesurées**

Le recueil des données de chaque patient s'est fait par l'exploitation minutieuse des dossiers médicaux, et des registres. Les renseignements recueillis ont été notés sur une fiche d'exploitation (annexe1) prenant en considération les variables suivantes :

- Sexe, Age, Poids, Statut sérologie/VIH ; Antécédents de tuberculose ;
- Signes cliniques : Toux, Fièvres, Amaigrissement, Hémoptysie, Asthénie, Sœurs nocturnes ;
- Espèce de Mycobactérie ;
- Profile de résistance aux antituberculeux ;

#### **4.8. Prélèvements**

Tous les échantillons ont été recueillis au sein des Centres de Santé de référence (CIII et CVI) du district de Bamako. Les échantillons étaient constitués d'expectorations. Les expectorations approximativement de 5ml ont été faites dans un pot stérile transparent de 100 ml à large ouverture et à vis.

#### **4.9. Transport et conservation des échantillons :**

Après les prélèvements, les échantillons ont été collectés dans des boîtes de transport hermétiquement fermés pour être transportés au Laboratoire Rodolphe Mérieux du CICM. Ils ont été conservés dans le réfrigérateur à +4°C avant l'heure de la technique (**Mode opératoire Annexe 3**).

#### **4.10. Méthodes de traitement des échantillons au laboratoire :**

##### **4.10.1. Décontamination, fluidification**

La décontamination et la fluidification des échantillons ont été faites par la N-acétyl-cystéine et NaOH à 2% selon la méthode de Kubica. Le N-acétyl-cystéine agit comme fluidifiant et la solution de soude à 2% agit comme décontaminant en limitant la prolifération des autres bactéries de la flore oropharyngé. Le mélange N-acétyl-cystéine + Na OH dosée à 2% est ajouté à volume égal à l'échantillon et maintenu à température ambiante pendant 20 mn (**Mode opératoire Annexe 4**).

#### 4.10.2. Centrifugation, Ensemencement

Le tampon phosphate pH 6,8 est utilisé pour neutraliser la réaction de décontamination. Les tubes sont centrifugés pendant 15 mn à 3000g à 4°C. Le surnageant est versé dans une poubelle à déchets liquides et le culot est repris avec 1 ml de tampon phosphate. On ensemence 0,2 ml à 0,3 ml maximum sur milieux de culture Lowenstein-Jensen (LJ) et 0.5ml sur le milieu liquide (MGIT).

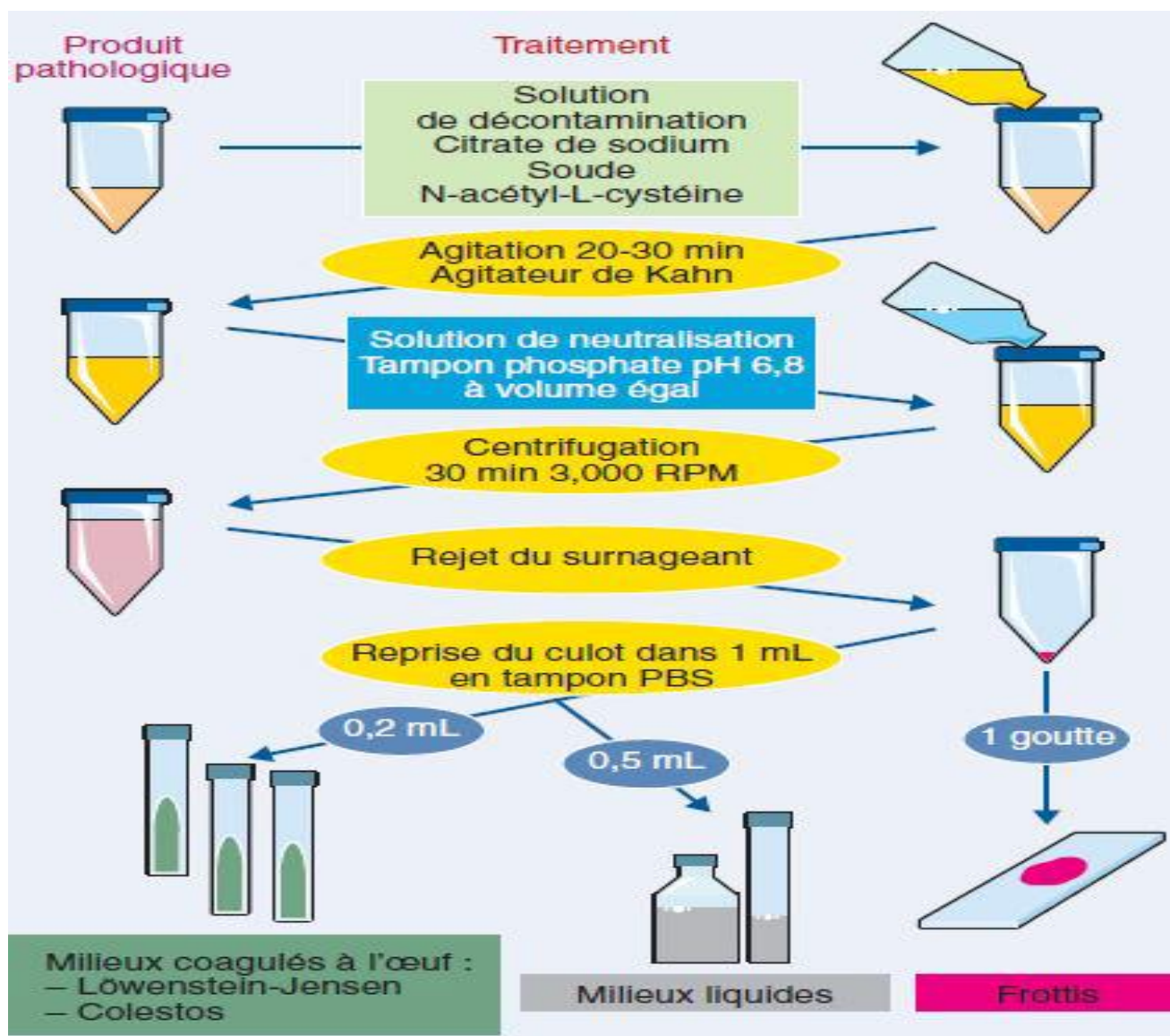
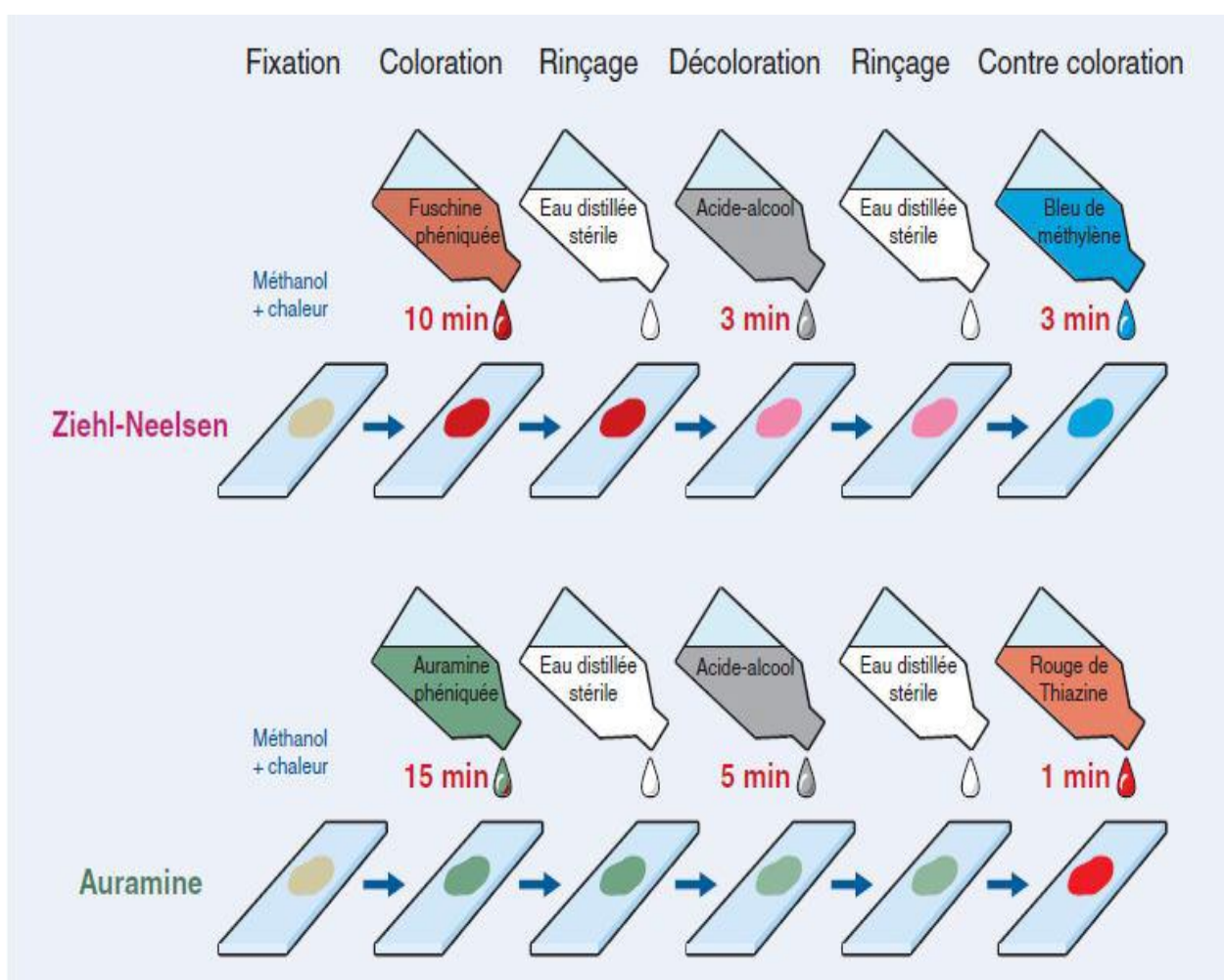


Figure 6: Schéma de traitements des prélèvements pour recherche de *M.tuberculosis* (49)

#### 4.10.3. Etalement, coloration et observation microscopique des frottis

Les frottis sont préparés par étalement sur lames des différents échantillons à partir du culot. Une à deux gouttes de la suspension du culot est étalée sur une lame propre et identifiée par le numéro de laboratoire. Les frottis sont séchés puis fixés sur une plaque chauffante pendant environ 1 heure. Les lames ainsi colorées et séchées passent à l'observation microscopique. La lecture est faite aux microscopes optique (à l'objectif 100x) et à fluorescence (à l'objectif 40x). Les BAAR apparaissent sous forme de bâtonnets fins, souvent incurvés de couleur rouge ou rose sur fond bleu au microscope optique et jaune doré au microscope à fluorescence.



**Figure 7:** Schéma des étapes de coloration de Ziehl-Neelsen et de l'auramine (49)

**Tableau IV :** Expression des résultats de l'examen microscopique selon le nombre de bacilles observés par champ microscopique au grossissement 1000 par la méthode de Ziehl Neelsen.

NOMBRE DE BAAR	CODE UTILISE
<b>Pas de BAAR pour 100 champs</b>	Négatif
<b>1 à 9 BAAR pour 100 champs</b>	Faiblement positif
<b>10 à 99 BAAR pour 100 champs</b>	+
<b>1 à 10 BAAR par champ</b>	++
<b>Plus de 10 BAAR par champ</b>	+++

**Tableau V:** Expression des résultats de l'examen microscopique selon le nombre de bacilles observés par champ microscopique au grossissement 40 des frottis colorés à l'Auramine.

Fluorescence	Interprétation
Grossissement 400X ; une longueur = 40 champs = 200 CFG	
Zéro BAAR/ 1 longueur	Négatif
1-19 BAAR / 1 longueur	Faiblement positif
20-199 BAAR / 1 longueur	+1
5-50 BAAR / 1 champ en moyenne	+2
>50 BAAR / 1 champ en moyenne	+3

#### 4.11. Culture :

Le reste de la suspension est utilisé pour la culture en milieux solide et liquide. Pour chaque échantillon un milieu liquide et un milieu solide ont été inoculés. Le reste du culot est gardé dans un cryotube et conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Pour la culture sur milieu liquide nous avons utilisé le système BD BACTEC MGIT (Becton Dickinson). Le supplément de croissance BACTEC MGIT (mycobacteria growth indicator tube) est ajouté à chaque tube MGIT de façon à apporter les éléments essentiels à la croissance rapide des mycobactéries. La contamination peut être réduite par l'addition au

bouillon de base BBL MGIT du supplément de croissance BACTEC MGIT/complexe d'antibiotiques MGIT PANTA (Polymyxine B, Amphotéricine B, acide Nalidixique, Triméthoprime, Azlocilline) avant l'inoculation avec un échantillon clinique. Chaque tube MGIT est inoculé avec 0,5 ml de la suspension et incubé dans l'automate pour une durée de 42 jours. (Cf. Mode opératoire en annexe5).



**Figure 8: Photographie de l'automate BACTEC® MGIT® de culture des mycobactéries (Photo personnelle Date :07/11/2021)**

Les milieux solides utilisés ont été soit le milieu Löwenstein Jensen ; soit le milieu 7H11 de Middlebrook. A l'aide d'une pipette pasteur, inoculer le tube identifié avec 2 gouttes de la suspension. Les tubes sont incubés à 37°C, inclinés et légèrement débouchés. Ils sont régulièrement observés la 1ère semaine puis une fois par semaine pendant 8 semaines. (Cf. Mode opératoire en annexe)



**Figure 9:** Photographie des mycobactéries sur milieu Lowenstein Jensen (Photo personnelle du 07/11/2022)

#### **4.12. Identification :**

Les tests d'identification ont été réalisés sur les tubes MGIT, détectés positifs par l'automate ainsi que sur les colonies présentes sur les milieux solides. La confirmation se fait par examen direct réalisé à partir des cultures (**Mode opératoire Annexe7**).

#### 4.12.1. Test Ag MPT64 :

Le kit SD BIOLINE TB Ag MPT64 est un test immuno- chromatographique rapide de détection du complexe *Mycobacterium tuberculosis* basé sur l'anticorps monoclonal de souris anti-MPT64. Chaque test se présente sous forme de cassette avec une zone échantillon et une zone de lecture. Le test est réalisé à partir de milieu liquide ou solide positifs. A partir d'un milieu liquide, prélever 100µl de bouillon et mettre dans le puits S du test.

Pour une culture sur milieu solide, préparer à partir du tampon, une suspension de 200µl avec 3- 4 colonies et déposer 100µl de la suspension dans la zone de test S. La lecture des réactions s'effectue au bout de 15 mn.



**Figure 10** : Photographie du test AgMPT64 du complexe *Mycobacterium tuberculosis*.

#### 4.12.2. Test Génotype MTBDR plus

Ce test permet d'identifier le complexe *M. tuberculosis* et d'évaluer la résistance à la rifampicine et/ou à l'isoniazide en une seule phase.

#### 4.12.3. Sensibilité aux antibiotiques

##### 4.12.3.1. Antibiogramme en milieu liquide (MGIT<sup>TM</sup> AST)

Le système MGIT<sup>TM</sup> AST est un test de sensibilité qualitatif de *Mycobacterium tuberculosis*, réalisé après l'identification. Les antibiotiques testés sont, la Streptomycine, l'Isoniazide, la Rifampicine, et l'Ethambutol, l'Ofloxacine et la Kanamycine. Le test est basé sur une comparaison de la croissance d'un isolat de *M. tuberculosis* dans un tube contenant un antibiotique avec celle obtenue dans un tube sans antibiotique (témoin de croissance). (Cf.

**Mode opératoire en annexe 6).**



#### 4.12.3.2. Test Géotype MTBDR plus :

Le test permet la détection simultanée des gènes qui confèrent la résistance à la rifampicine et/ou à l'isoniazide à savoir la *KatG* et l'*inH* pour l'isoniazide ; et la *rpoB* pour la rifampicine.

#### 4.13. Conservation des souches :

Toutes les souches de mycobactéries isolées au cours de l'étude ont été conservées au niveau de la souchothèque pour une utilisation future.

A partir du milieu liquide, 1 ml de bouillon est prélevé et centrifugé dans un tube Eppendorf. Le surnageant est jeté et le culot conservé dans du glycérol à 20% dans un cryotube à vis de 1,8 ml et gardé entre -20 et -80°C.

A partir du milieu solide, quelques colonies sont prélevées et re-suspendues dans du glycérol à 20% dans un cryotube à vis et gardé entre -20 et -80°C.

#### 4.14. Contrôle de qualité

Toutes les étapes pré-analytiques, analytiques, et post-analytiques font l'objet de contrôle de qualité. La qualité des prélèvements est évaluée par rapport au volume et à l'aspect afin d'augmenter la chance de recouvrement des mycobactéries.

Le laboratoire dispose d'une série de souches de référence pour évaluer la qualité des cultures et des frottis.

- *M. tuberculosis* ATCC 27294 (sensible à toutes les molécules)
- *M. tuberculosis* ATCC 35820 (résistante à la Streptomycine)
- *M. tuberculosis* ATCC 35822 (résistante à l'isoniazide)
- *M. tuberculosis* ATCC 35838 (résistante à la Rifampicine)
- *M. tuberculosis* ATCC 35837 (résistante à l'Ethambutol)
- *M. bovis* BCG ATCC 35735
- *M. kansasii* ATCC 12478
- *M. avium* ATCC 15769
- *M. fortuitum* ATCC 6841
- *M. gordonae* ATCC 35758
- *M. intracellulare* ATCC 13950

Ces souches sont utilisées pour effectuer le contrôle de qualité des tests d'identification, des antibiogrammes, et du génotypage des mycobactéries.

Ces souches sont gardées et sécurisées dans le laboratoire de confinement P3 du CICM.

#### **4.15. Saisie et analyse des données**

Les données ont été saisies sur Microsoft Excel version 2013 et analysées par SPSS version 25. La comparaison des proportions a été effectuée par le test de Chi carré. Le seuil de significativité a été fixé à  $p < 0,05$ .

#### **4.16. Considérations éthiques**

Le protocole n'a pas été soumis à un comité d'éthique cependant nous avons obtenu l'autorisation des responsables des Centres de santé de référence des communes III et VI du district de Bamako pour l'utilisation des données. Nous avons obtenu le consentement verbal des patients. Par ailleurs, la confidentialité a été assurée par les numéros d'identification utilisés pour l'anonymisation des patients. Les règles de bonnes pratiques de laboratoire ont été respectées à travers l'Assurance Qualité du laboratoire. Les références bibliographiques n'ont fait l'objet d'aucune modification. Les résultats des cultures et de test AST/SIRE ont été systématiquement communiqués et ensuite envoyés par le laboratoire aux cliniciens pour la prise en charge rapide des patients.

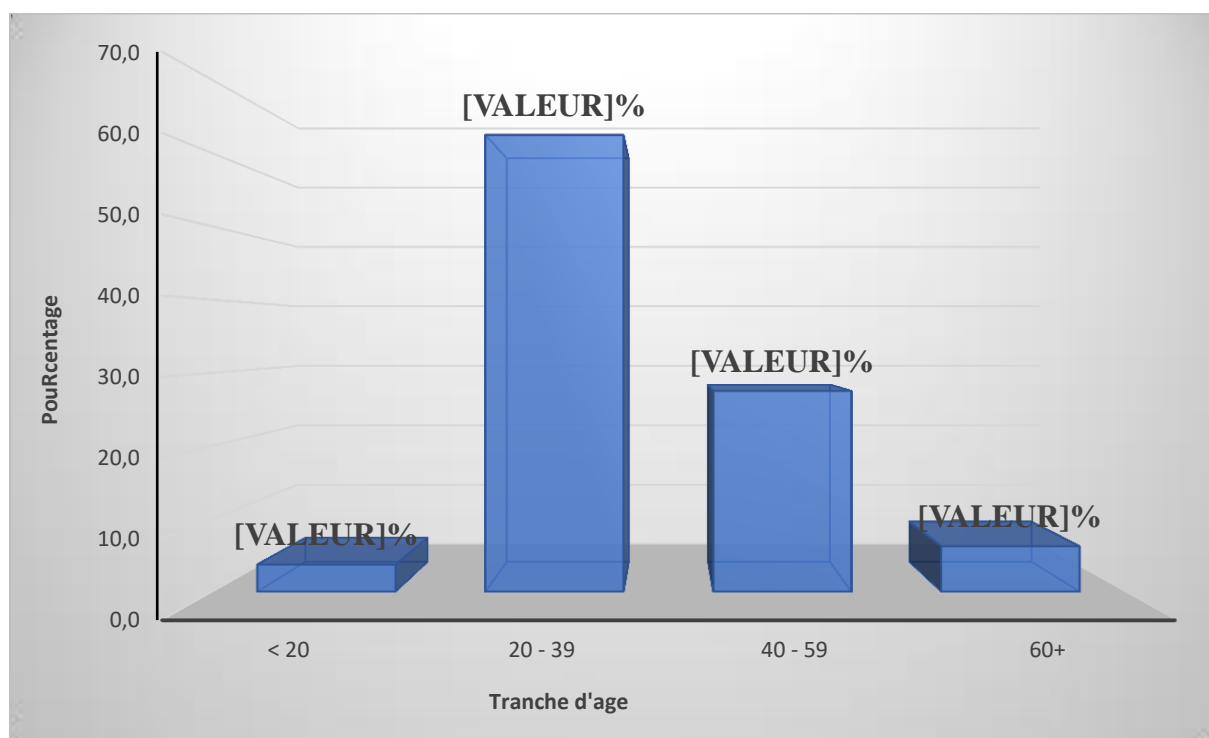
## 5. RESUSTATS

Notre étude s'est déroulée entre le 1<sup>er</sup> août 2020 et le 30 avril 2021 soit sur 9 mois. Pendant cette période, 112 patients ont répondu aux critères d'inclusion. Sur les 112 échantillons, 09 ont été contaminés, 20 échantillons négatifs et 83 échantillons ont été positifs à la culture (dont 02 étaient des mycobactéries non tuberculeuses et 81 des cas du complexe *Mycobacterium tuberculosis*)

Sur ces 81 souches de *Mtb*, 15% provenaient du CSREF CIII et (85%) du CSREF CVI. Tous ces échantillons ont été testés vis-à-vis de la Streptomycine, l'Isoniazide, la Rifampicine, l'Ethambutol, l'Ofloxacine et la Kanamycine.

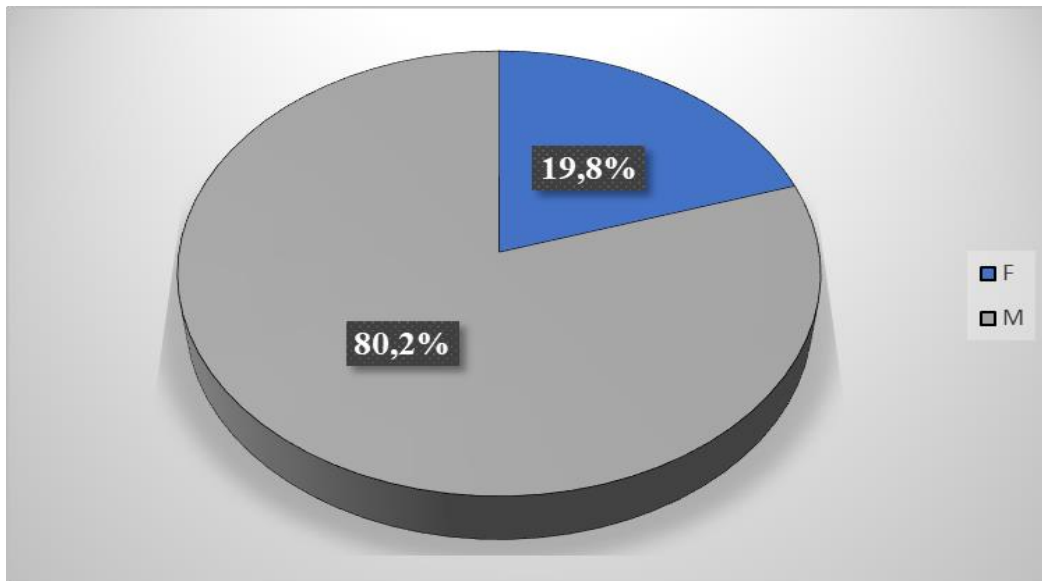
7.4% étaient résistantes au moins à un antibiotique. La TB-MR était de 1.2%.

### 5.1.Sociodémographiques



**Figure 11:** Répartition des patients de l'étude selon la tranche d'âge.

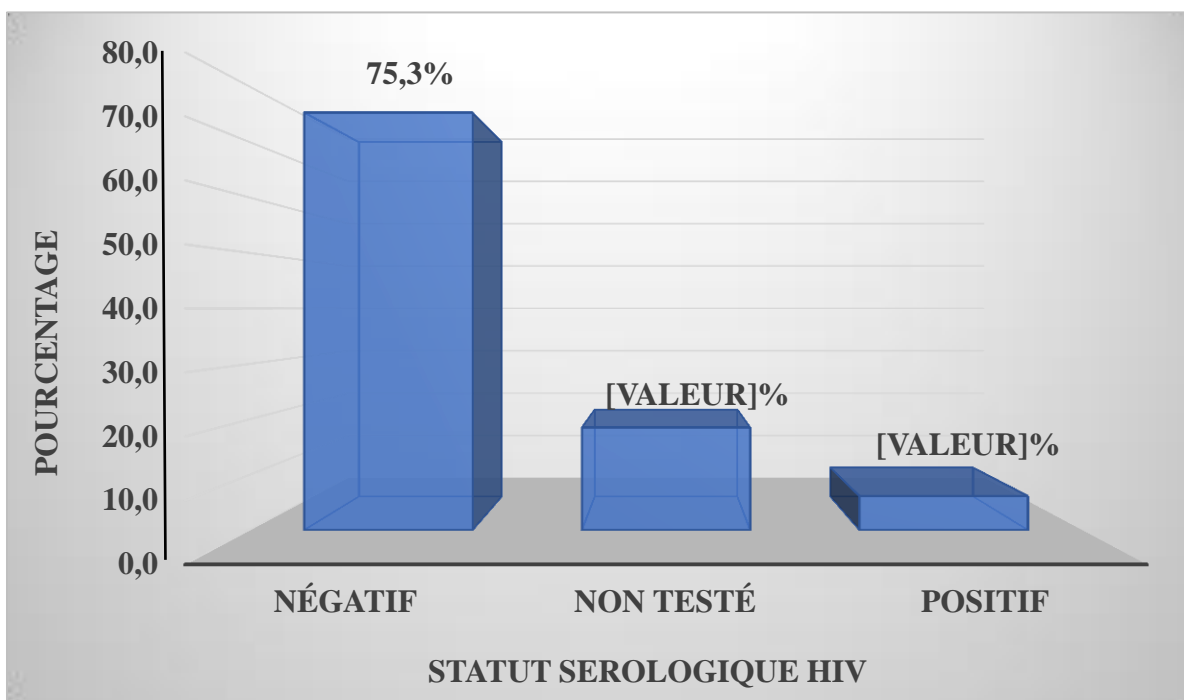
L'âge de nos patients variait entre 13 et 85 ans avec une prédominance de la tranche d'âge de 20 ans à 39 ans qui représentait 62,5%. L'âge moyen était de 36,54 ans, avec une médiane de 35 ans.



**Figure 12:** Répartition des patients de l'étude selon le sexe (F= Féminin M= Masculin).

Le sexe masculin était prédominant soit 80,2% tandis que le sexe féminin était de 19,8%, avec un sexe ratio M/F de 4,06.

## 5.2.Sérologique

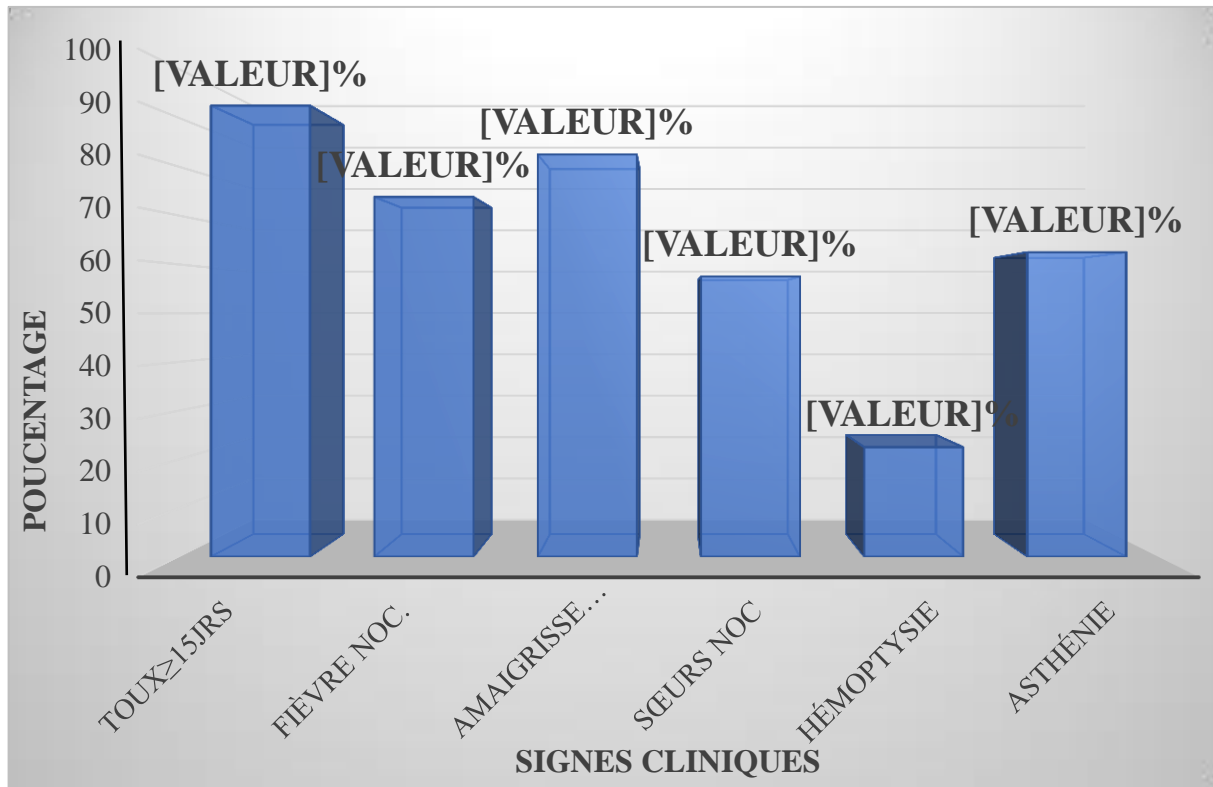


**Figure 13:** Répartition des patients de l'étude en fonction de leurs statut VIH

La plupart de nos patients avait un statut sérologique négatif soit à **75,3%**.

### 5.3.Clinique

Concernant les signes fonctionnels rapportés par les patients, nous avons noté la présence d'une toux supérieure à 15 jours, un amaigrissement et des sueurs nocturnes dans respectivement 92,5%, 82,5% et 73,8% des cas. Des épisodes d'hémoptysie ont été rapportés chez 22,5% des patients.



**Figure 14:** Répartition des patients de l'étude selon les signes cliniques.

## 5.4. Bactériologiques

**Tableau VI:** Résultat du test sensibilité aux antituberculeux des souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* en milieu liquide.

Antibiotiques testés	Sensible N (%)	Résistante N (%)
<b>STR</b>	77 (95,1%)	04 (4,9%)
<b>INH</b>	75 (92,6%)	06 (7,4%)
<b>RIF</b>	80 (98,8%)	1 (1,2%)
<b>EMB</b>	81 (100%)	0
<b>Ofi</b>	81 (100%)	0
<b>Ka</b>	81 (100%)	0

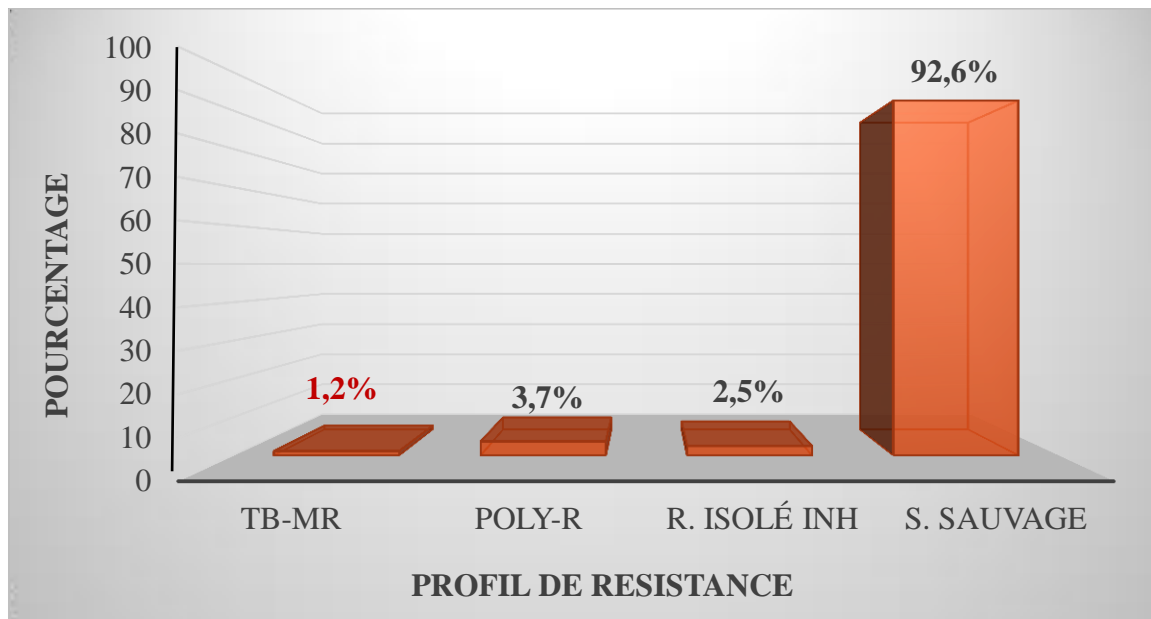
**STR:** Streptomycine, **INH:** Isoniazide, **RIF:** Rifampicine, **EMB:** Ethambutol,

**Ofi:** Ofloxacine, **Ka:** Kanamycine.

L'antibiogramme réalisé en milieu liquide a révélé une résistance à la streptomycine, à l'isoniazide et à la rifampicine dans respectivement 4,9%, 7,4% et 1,2% des cas.

Toutes les souches étaient sensibles à l'Ethambutol et aux antituberculeux de 2<sup>e</sup> ligne (Ofloxacine et Kanamycine).

La résistance des antibiotique et leurs associations



**Figure 15:** Profil de résistance des souches de *Mycobacterium tuberculosis* aux antibiotiques.

TB-MR : Tuberculose Multirésistante. Poly-R : Poly-résistance. R. ISOLE INH : résistance isolée à l'isoniazide. S. Sauvage : aucune résistance

Le taux de la résistance primaire était de 7,4%, dont 1,2% de TB-MR.

❖ **Test MTBC Génotypage**

**Tableau VII:** Résultats du test de sensibilité et de résistance aux antituberculeux des souches de *Mycobacterium tuberculosis* par la méthode test GenoType® MTBC (Hain Lifescience).

Profil de Résistance	Sensible N (%)	Résistante N (%)
<b>INH</b>	76 (93,8%)	05 (6,2%)
<b>RIF</b>	80 (98,8%)	1 (1,2%)
<b>OfI</b>	81 (100%)	0
<b>Ka</b>	81 (100%)	0

, **INH**: Isoniazide, **RIF**: Rifampicine, **EMB**: Ethambutol, **OfI**: Ofloxacin, **Ka**: Kanamycine

L'antibiogramme génotypique n'a été réalisé que sur quatre antituberculeux. Le profil de résistance donne 6,2% et 1,2% respectivement pour l'Isoniazide et la Rifampicine.

Le taux de sensibilité des antituberculeux par la méthode génotypique est presque le même que celle réalisé en milieu liquide.



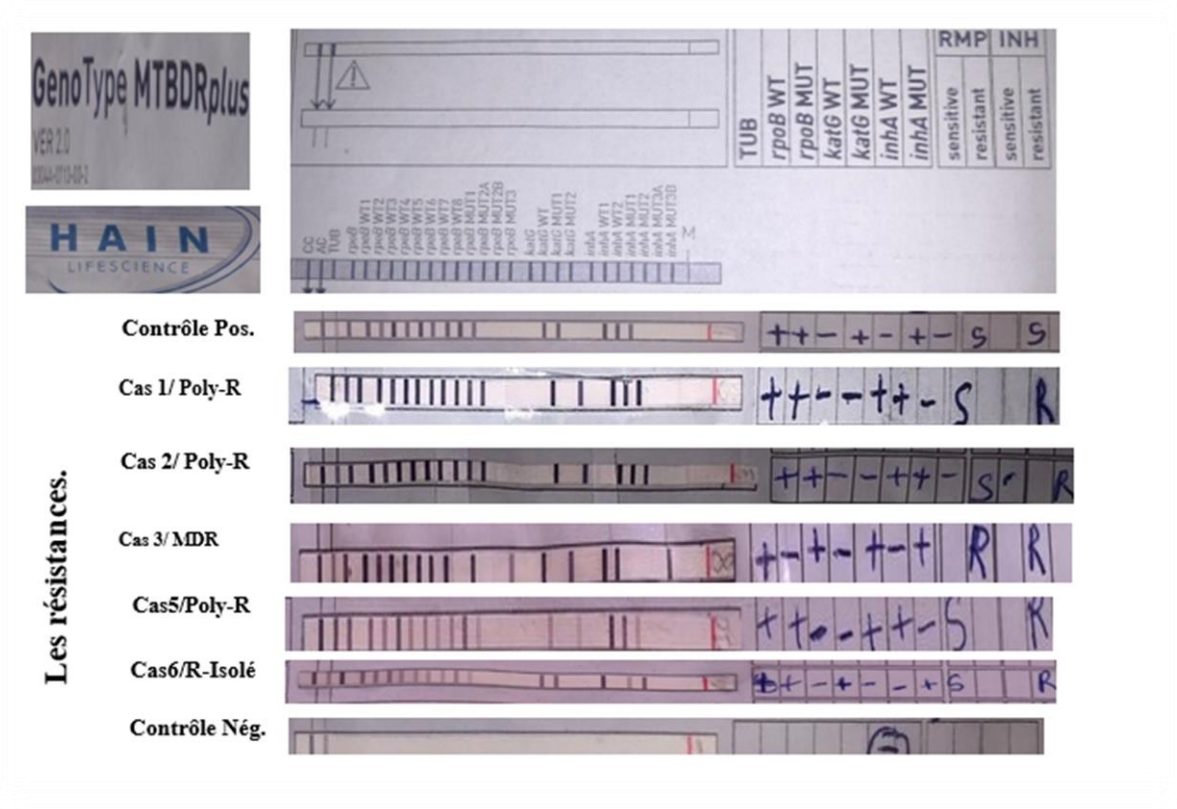


Figure 16: Photographie des Bandelettes GenotypeMDRplus.

**Tableau VIII:** Répartition des souches de MTB résistantes selon sexe des patients de l'étude.

Sexe	Résultat		Total (%)
	S. Résistante (%)	S. Sauvage (%)	
Féminin	2,47	17,28	19,75
Masculin	4,94	75,31	80,25
Total	7,41	92,59	100

Il ne semble pas y avoir de relation entre le sexe et l'apparition de la résistance avec un (Test exact de Fisher  $p= 0,385$ ) non statistiquement significative.

**Tableau IX:** Répartition des souches de MTB résistantes aux antituberculeux selon le statut VIH des patients de l'étude.

Statut VIH	Résultat		Total (%)
	Resistance (%)	S. Sauvage (%)	
Négatifs	6,17	69,13	75,30
Non testés	1,24	17,29	18,53
Positifs	0	6,17	6,17
Total	7,41	92,59	100

Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre la présence de résistance et le statut VIH des patients. Test exact de Fisher  $p= 0,792$ .

**Tableau X:** Répartition des patients selon la résistance aux antituberculeux et l'Age

AGE	RESULTAT (%)		Total (%)
	S. Résistante	S. Sauvage	
<20	1,23	2,47	3,70
20-39	6,17	56,79	62,96
40-59	0	27,16	27,16
60≥	0	6,17	6,17
<b>Total</b>	7,40	92,60	100

La résistance des antituberculeux n'est pas liée à l'âge du patient, Test de Khi carré ( $p=0.137$ ). Mais par contre la tranche d'âge (20 à 39 ans) est la plus touchée.

**Tableau XI:** Répartition des patients selon le résultat du traitement

Résultats	Fréquence	Pourcentage (%)
Décès	4	4,9
Echec	4	4,9
Guéri	63	77,8
Perte de Vue	10	12,3
<b>Total</b>	81	100,0

La majorité des patients ont été guéris, avec un taux de 77,8%. On note un taux d'échec de 4,9%.

## 6. Discussion

La Tuberculose est dite pharmacorésistance lorsque la souche de *Mycobacterium tuberculosis* est résistante à un ou plusieurs antituberculeux. L'impact de la pharmacorésistance sur le traitement antituberculeux varie selon le ou les médicaments auxquels la souche est résistante.

Dans les pays à ressources limitées comme le Mali, les estimations de la résistance primaire aux médicaments antituberculeux est très difficile.

La durée de l'étude, la taille de l'échantillon et sa limite aux deux centres de santé de référence font que nos données sont difficilement comparables à d'autres études. Mais Malgré ces limites, l'étude trouve son importance dans la lutte contre la tuberculose.

### 6.1. Résultats Globaux

Cette étude s'est déroulée du 01 aout 2020 à 30 avril 2021. Pendant cette période, nous avons récolté 112 échantillons dont 74,2% étaient positif, 17,8% de négatif et 8% échantillons contaminés.

Cette fréquence des échantillons positifs est supérieure à celle obtenue par **Okemba et al.** à Brazzaville au Congo en 2017 soit 67.79% de cas positif(50), mais des fréquences élevées ont été apporté par **Adamounou et al.** au Togo en 2017 (99,4 %)(51). La fréquence des échantillons négatifs est supérieure au résultat rapporté par **Okemba et al.** qui ont eu 14,67%.

Ces nombres de cas élevés des négatifs et contaminé de notre étude plus élevée par rapport au cas précédent, ceci peut s'expliquer par la taille de notre échantillon mais souvent aussi d'effet des décontaminant pendant la phase de décontamination.

### 6.2. Caractéristique socio-démographique et clinique

#### Le Sexe

Notre étude montre une prédominance des patients du sexe masculins avec 80.2%, soit un sexe ratio de 4,06. Cette supériorité du sexe masculin a été de » montré aussi par

**Youssef.** au Maroc, Rabat en 2014 qui a eu 77,77% d'hommes(49).

Ce résultat rejoint la tendance mondial, dont les hommes sont plus touché que les femmes Les hommes (âgés de  $\geq 15$  ans) représentaient 56 %(3).

Cette prédominance masculine peut s'expliquer par les comportements à risques qui sont beaucoup fréquents chez les hommes.

### L'Age

Dans notre étude la tuberculose atteint plus l'adulte jeune 20 à 39 ans avec 62,5%. Les extrêmes étaient de 13ans et 85 ans, l'âge moyen était 36,54 ans.

**Amadou et al.** au Centre Hospitalier Régional de Maradi, Niger ont noté 57,14% des cas pour 21 à 40 ans en 2017(52). Par contre **Sanogo et al** au Mali en 2015 qui ont trouvé 75,5% de patient avec le tranche d'âge 14 a 45 ans(7) .

La manifestation de la tuberculose sur cette tranche d'âge peut s'expliquer par le fait que cette tranche est la plus active dans la société.

### La Sérologie VIH

Le statut VIH était positif à 6,2% et négatif jusqu'à 75,3% dans notre étude. 18,5% avait un statut sérologique inconnu. D'autres études ont montré cette supériorité des patients à statut négatif par rapport aux positifs comme celui de **Chevalier et al**, à l'hôpital principale de Dakar, Sénégal en 2010 qui ont eu 71,2% des patients a statut négatif avec une coinfections( VIH/TB) de 10.9% (53). Par ailleurs **Sanogo et al.** au Mali en 2015 ont notés 12,24 % des patients infectés par le VIH(7).

### La sensibilité aux antituberculeux

Sur les 81 souches testées vis-à-vis des antituberculeux, 6 souches (7,4%) présentaient une résistance à un ou plusieurs antituberculeux. 76 (92,6%) des souches étaient des sauvages.

Cette fréquence de résistance primaire est inférieure à celle observée par **Vezeris et al** en France en 2010 qui ont eu 9,7% des souches résistantes (46). Par contre une fréquence inférieure a été observé par **Liang et al** à Dalian, en chine qui ont eu en 2019, 4.82% de taux de résistance primaire(54).

Quant aux taux de résistance aux antituberculeux et d'un point de vue globale, au moins 06 souches sur 81 (7,4%) avait une résistance à l'isoniazide, 4 souches sur 81 (4,9%) à la streptomycine et 01 souche sur 81 soit (1,2%) à la Rifampicine. Toutes les souches étaient sensibles aux autres antituberculeux testées (Ethambutol, Ofloxacine et kanamycine). Ces résultats sont comparables avec ceux obtenus par **Vezeris et al.** en 2010 en France qui ont eu

5.4% de souches résistantes à l'Isoniazide, 1.3% à la Rifampicine et 6.0% à la streptomycine (46) et **Chevalier et al.** au Dakar (53) qui ont également obtenu des résistances à l'isoniazide, streptomycine et rifampicine respectivement 6,4%, 24,1% et 1,7%.

Une attention particulière doit être portée dès à présent au taux de résistance à l'isoniazide et la rifampicine associés. Il apparait qu'une souche sur 81, soit 1.2% sont résistantes à ces deux antibiotiques. Cette fréquence est plus proche par exemple, dans une étude menée au SEREFO, Mali par **Diarra et al.** en 2014 ou le multi Drug résistance était (1,3%)(11) . Par contre **Welekidan et al.** en 2019 à l'Ethiopie ont observés une fréquence supérieure, 20 souches sur 172 soit 11,6%(5) e.

Ces différences de résistance peuvent s'expliquer soit par la taille de l'échantillon, et par l'année d'étude de la résistance.

## CONCLUSION

La résistance aux antituberculeux est un problème majeur de santé publique. Dans notre étude, le taux la résistance primaire aux antituberculeux était de 7,4% avec 1,2% des souches TB-MR et 3.7% des souches de poly résistantes (résistance à l'isoniazide et à la Streptomycine). Aucune souche n'a présenté de résistance à L'Ethambutol, ofloxacine et kanamycine.

Le statut sérologique et le sexe du patient n'ont pas de relation par rapport à la sensibilité des antituberculeux.

La tuberculose multi résistante reste donc un défi majeur au Mali surtout avec la presence des souches TB-MR dans la population.

L'introduction des tests de sensibilité moléculaire comme outil de dépistage peut améliorer la détection précoce de la TB-MDR, les résultats du traitement et freiner la propagation de la TB-MR.

## 7. Recommandation

Au terme de notre étude et en vue des résultats obtenus, nous formulerons des recommandations suivantes :

### Au CICM

- Pérenniser ces travaux de recherche sur la tuberculose Multi Résistante.

### CSLS-TBH

- Mener fréquemment une étude nationale pour évaluer la résistance primaire du *Mycobacterium tuberculosis*.
- Adopter une stratégie pour tester la sensibilité des antituberculeux avant tout traitement.

### Aux Personnels de la santé

- Evoquer toujours la culture des mycobactéries pour le diagnostic de la tuberculose en cas des symptômes présentes.
- Tester systématiquement la sensibilité des *Mycobacterium* devant un cas de la tuberculose.

### Au Ministère de la Santé

- Soutenir les actions de Diagnostic de la Tuberculose Multi Résistante.
- Rendre possible la culture des mycobactéries dans les CSRef au Mali.



## 8. REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Dicko A, Faye O, Fofana Y, Soumoutera M, Berthé S, Touré S, et al. Tuberculose cutanée à Bamako, Mali. *Pan Afr Med J.* 2017 ;27 :6.
2. Alame-Emane AK. ALAME EMANE Amel Kevin – Thèse de Doctorat. L'Université Sorbonne Paris Cité :2016 ;165.
3. OMS. Rapport sur la tuberculose dans le monde 2020 : résumé d'orientation ; Genève: Organisation Mondiale de la Santé.2020;13.
4. Meyssonier V. Epidémiologie de la tuberculose et de la résistance aux antituberculeux [PhD Thesis]. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI :2012 ;162.
5. Welekidan LN, Skjerve E, Dejene TA, Gebremichael MW, Brynildsrud O, Agdestein A, et al. Characteristics of pulmonary multidrug-resistant tuberculosis patients in Tigray Region, Ethiopia: A cross-sectional study. *PLoS ONE.* 2020 ;15(8).
6. Cellule Sectorielle de Lutte contre le VIH/Sida, La Tuberculose et les Hépatites Virales. Rapport annuel Cellule Sectorielle de Lutte contre le VIH/Sida, La Tuberculose et les Hépatites Virales. Vol. 51. Mali; 2020.
7. Sanogo M, Kone B, Diarra B, Maiga M, Baya B, Somboro AM, et al. Performance of Microscopic Observation Drug Susceptibility for the Rapid Diagnosis of Tuberculosis and Detection of Drug Resistance in Bamako, Mali. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* juin 2017;23(6):408.e1.
8. Nguen OB, Bisuta SF, Kabengele BO, Murhula I, Kashongwe DK, Kaba DK, et al. Facteurs associés à l'échec du traitement initial de la tuberculose pulmonaire dans les Centres de Santé de Diagnostic et Traitement de Kinshasa, RD Congo: étude cas-témoins Risk factors for tuberculosis treatment failure among pulmonary tuberculosis patients in health care. *Ann Afr Med.* 2020;13(2):e3613.
9. Becton, Dickinson and Company. Bactec mgit sire kit For the Antimycobacterial Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis.2010.16
10. Diarra B, Goita D, Tounkara S, Sanogo M, Baya B, Togo ACG, et al. Tuberculosis drug resistance in Bamako, Mali, from 2006 to 2014. *BMC Infectious Diseases.* 2016 ;16.
11. Ba M. Etude d'une série de 8 cas de tuberculose chez les enfants de 0 à 15 ans au service de pédiatrie de l'Hôpital du Mali [Thèse PharmD]. USTTB; 2020.102.
12. Trébucq A, Anagonou S, Gninafon M, Lambregts K, Boulahbal F. Prévalence de la résistance primaire et acquise de Mycobacterium tuberculosis aux antituberculeux au Bénin après 12 ans d'utilisation des traitements courts. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1999;3(6):466-70.
13. Coulibaly D, Dosso M, Bonard D, Msellati P, Bamba A, Peyre M, et al. Résistance primaire aux traitements antituberculeux en Côte d'Ivoire: une enquête nationale: rapport final. 1997.42.

14. Gibelin P, Gibelin M, Lamrani Z, Larbaoui D. Etude de la résistance primaire de Mycobacterium tuberculosis aux antibiotiques en Algérie, de 1973 à 1977. Médecine et Maladies Infectieuses. 1981;11(8):465-9.
15. Dupont A, Mahaza C, Apaire-Marchais V. Actualités sur la tuberculose. Actualités Pharmaceutiques. 2020;59(593):35-9.
16. Essad A. LE SUIVI DU TRAITEMENT ANTITUBERCULEUX AU SERVICE DE PNEUMOLOGIE DE L'HOPITAL MILITAIRE D'INSTRUCTION MOHAMMED V. [Thèse PharmD]. UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT ; 2020.185.
17. CISSE MBZ. Analyse des stigmas sur la tuberculose chez les prestataires de soins dans les centres de santé des communes 1, 5 et 6 du District de Bamako.Thèse Médecine.USTTB. 2005.86.
18. MPllleP.TIMOUYAS Yasmine. Etude moléculaire de la résistance à la rifampicine des bacilles du complexe Mycobacterium tuberculosis [Internet] [PhD Thesis]. [MAROC]: Université Cadi Ayyad de Marrakech.2017.199.
19. Traore BY. Aspects épidémiologiques, diagnostiques et thérapeutiques de la tuberculose pulmonaire à bacilloscopie négative au service de Pneumo-phtisiologie de l'hôpital du point G. TheseMed Bamako : FMPOS ; 2005.71
20. BAFAI LCBS. Les traitements antituberculeux et MDR: Expérience de l'Hôpital Moulay Youssef-CHU de Rabat [PhD Thesis]. 2018.75
21. Global tuberculosis report 2020.13.5
22. SARA A. Etude génétique et épidémiologique de la tuberculose [PhD Thesis]. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem ; 2020.69.
23. Leblanc C. Rôle de la 4'-phosphopantéthéinyl transférase PptT dans la multiplication et la persistance de Mycobacterium tuberculosis et mise en place d'un test d'activité enzymatique pour la recherche de nouveaux antituberculeux [PhD Thesis]. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier; 2012.196.
24. Ait-Khaled N, Enarson D. TUBERCULOSE Manuel pour les Etudiants en Medecine.1999.149.
25. Mathys V. Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires de résistance de Mycobacterium tuberculosis aux agents anti-tuberculeux. 2009.172.
26. Passemar C. Etude du rôle des lipides de l'enveloppe de Mycobacterium tuberculosis dans la virulence et la pathogénie de la tuberculose [Internet] [phd]. Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier; 2013.260.
27. FMPMC-PS - Bactériologie - Niveau DCEM1.2020. Disponible sur: <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.12.html>
28. FMPMC-PS - Bactériologie - Niveau DCEM2. Disponible sur: <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.12.html>

29. Ben Taarit C, Turki S, Maïz HB. La tuberculose ostéoarticulaire en Tunisie : étude rétrospective de 180 cas. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 1 avr 2003;33(4):210-4.
30. Rafiqi K, Yousri B, Arihi M, Bjitro C, Aboumaarouf M, El Andaloussi M. Localisations inhabituelles de la tuberculose ostéoarticulaire chez l'enfant : une étude de 12 cas. *Revue de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique*. 1 mai 2013;99(3):297-303.
31. FETTAH, Fettah H. Tuberculose et évolution de la résistance à l'égard des antituberculeux. [PhD Thesis]. 2010.172.
32. Ouaddin. S. NOUVELLES TECHNIQUES DIAGNOSTICS ET THERAPEUTIQUE DE LA TUBERCULOSE. [PharmD Thesis]. UNIVERSITE MOHAMMED V.2019.148.
33. Hachimi KE, Zaghba N, Benjelloun H, Yassine N. Tuberculose urogénitale. *Revue des Maladies Respiratoires*. 1 janv 2018;35:A260.
34. Moufakkir R. TUBERCULOSE DU TUBE DIGESTIF[PharmDThesis]. UNIVERSITE MOHAMMED V de Rabat.2020.258.
35. Touré NO, Cissé MF, Dia Kane Y, Diatta A, Bouker Bakioui B, Ndiaye EHM, et al. Miliaria tuberculeuse : à propos de 49 cas. *Revue des Maladies Respiratoires*. 1 mars 2011;28(3):312-6.
36. Jabri H, Lakhdar N, El Khattabi W, Afif H. Les moyens diagnostiques de la tuberculose. *Revue de Pneumologie Clinique*. 1 oct 2016;72(5):320-5.
37. Martinez V, Gicquel B. Techniques diagnostiques de la tuberculose et des autres mycobactérioses. *Archives de Pédiatrie*. 1 août 2005;12:S96-101.
38. Maugein J, Bébéar C. Diagnostic microbiologique de la tuberculose et intérêt de la PCR. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 1 mars 2003;33:153-8.
39. Slim-Saidi L, Mehiri-Zeghal E, Ghariani A, Tritar F. Nouvelles méthodes de diagnostic de la tuberculose. *Revue de Pneumologie Clinique*. 1 avr 2015;71(2):110-21.
40. Huyen MN, Tiemersma EW, Lan NT, Cobelens FG, Dung NH, Sy DN, et al. Validation of the GenoType® MTBDRplus assay for diagnosis of multidrug resistant tuberculosis in South Vietnam. *BMC Infect Dis*. 3 juin 2010;10:149.
41. Ling DI, Zwerling AA, Pai M. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. *European Respiratory Journal*. 2008;32(5):1165-74.
42. Albert DH. The Hain test: new reports from South Africa and Tanzania. (4):17.
43. Emane AKA. Les infections à mycobactéries du complexe Mycobacterium tuberculosis à Libreville: profil des résistances aux antibiotiques et diversité génétique[PhD Thesis]. l'Université Sorbonne Paris Cité; 2016.184.
44. Coupet CA. Développement d'un vaccin thérapeutique multi-antigénique contre la tuberculose et étude de l'influence des antibiotiques antituberculeux sur son immunogénicité. 2018.223.

45. Martin S. Co-infection tuberculose multirésistante et VIH: étude à partir d'un cas et revue de la littérature [PhD Thesis]. UHP-Université Henri Poincaré; 2004.19.
46. Veziris N, Jarlier V, Robert J. La résistance aux antituberculeux en France en 2009-2010. Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire. 2012;24:25.
47. Tattevin P. Le traitement de la tuberculose en 2007. Médecine et Maladies Infectieuses. 1 oct 2007;37(10):617-28.
48. Diabaté S, Baya B, Sanogo M, Diarra B, Toloba Y, Berthé G, et al. Epidémiologie et recherche sur la tuberculose au Mali: Etat des lieux Epidemiology and Research on Tuberculosis in Mali: Current Status. Revue Malienne d'Infectiologie et de Microbiologie. 2015;6:2.
49. Moutaouakkil Y. Etude de la sensibilité aux antibacillaires des isolats du Complexe Mycobacterium tuberculosis, à propos de 36cas: Comparaison des données phénotypiques aux données génotypiques [Thesis]. 2014.85.
50. Okemba-Okombi F, Essango EN, Kayomo MK, Abacka BO, Bopaka R, Ibara BA. Multi-resistant tuberculosis in Brazzaville: epidemiological, clinical, radiographic and progressive aspects. J Func Vent Pulm. 2020;33(11):1-6.
51. Adambounou TAS, Gbadamassi AG, Aziagbe KA, Ako AM, Efalou P, Adjoh KS. Profil de résistance des mycobactéries du « complexe Tuberculosis » aux antituberculeux au Togo. Revue des Maladies Respiratoires Actualités. 1 janv 2020;12(1):165.
52. Amadou MLH, Abdoulaye O, Amadou O, Biraima A, Kadri S, Amoussa AAK, et al. Profil épidémiologique, clinique et évolutif des patients tuberculeux au Centre Hospitalier Régional (CHR) de Maradi, République du Niger. Pan Afr Med J. 17 juin 2019;33:6.
53. Chevalier B, Margery J, Sane M, Camara P, Lefebvre N, Gueye M, et al. Épidémiologie de la résistance de Mycobacterium tuberculosis aux antituberculeux à l'hôpital principal de Dakar. Étude rétrospective sur quatre ans (2000–2003). Revue de Pneumologie Clinique. 1 sept 2010;66(4):266-71.
54. Du L, Zhang Y, Lv X, Duan Y, Shi X, Ji H, et al. Prevalence of Multidrug-Resistant Tuberculosis in Dalian, China: A Retrospective Study. Infect Drug Resist. 16 mars 2021;14:1037-47.

## 9. ANNEXES

### 9.1. Annexe 1 : Fiche d'enquête

#### FICHE DE COLLECTE D'ECHANTILLONS

##### Renseignements Sociodémographiques

Provenance : CSRef.....

Type de patient :

Nouveau cas:/...../ échec/...../ Rechute /...../ Retraitement / ..... /

Identifiant patient : N° Registre : / ..... /

Nom/ ..... / Prénom / ..... / Tel / ..... /

Sexe : Masculin / ..... / Féminin / ..... / Age / ..... /

BCG : Oui / ..... / Non / ..... /

Profession : .....

Situation matrimoniale :

Marié : / ..... / Célibataire / ..... / Divorce / ..... / Veuf / ..... /

Conditions de Vie :

Communauté / ..... / Seul / ..... / Autres / ..... /

Notion de contagé : .....

Résidence actuelle : .....

##### Renseignements Cliniques

Poids (Kg) : / ..... /

Signes cliniques de Tuberculose :

Toux de plus de 15 jours / ..... / Fièvre nocturne /..... / hémoptysie / ..... /

Amaigrissement / ..... / Sueurs Nocturnes /..... / Asthénie / ..... /

Signes radiologiques de tuberculose : Oui / ..... / Non /..... / Non Fait / ..... /

Statut VIH : Positif / ..... / Négatif / ..... / Non Testé / ..... /

Type de VIH : VIH1 / ..... / VIH2 / ..... / VIH 1+2 / ..... / Non Typé / ..... /

### Renseignement de Laboratoire

Diagnostic bactériologique

Date du prélèvement : .....

Nature du prélèvement :

Expectoration : / ..... / Tubage gastrique : / ..... / Biopsie : / ..... /

Tubage gastrique : / ..... / LCR : / ..... / Autres à préciser : / ..... /

Examen microscopique (BAAR) : Positif : / ..... / Négatif : / ..... /

Culture : Positif : / ..... / Négatif : / ..... / Contaminé / ..... /

Identification des mycobactéries :

*Mycobacterium tuberculosis Complexe* : / .../ *Mycobacterium non Tuberculosis* : / ..... /

Antibiogramme :

Sensibilité : S : / .... / I : / ... / R : / .... / E : / .... /

Résistance S : / .... / I : / ... / R : / .... / E : / .... /

Non fait / ..... /

### Traitement

Traitement antituberculeux actuel : Oui : / ..... / Non : / ..... /

Régime du traitement : / ..... /

Traitements ARV actuels :

Oui : / ..... / Non : / ..... / si Oui, Schéma : / ..... / date du début : / ..... /

## **9.2. Annexe 2 : FICHE SIGNALÉTIQUE**

**Nom :** SAMAKE

**Prénom :** Dramane

**Tel :** 00223 76155391

**Email :** dramanesamake011@gmail.com

**Titre de la thèse :** ETUDE DE LA RESISTANCE PRIMAIRE DU COMPLEXE  
Mycobacterium tuberculosis AUX ANTITUBERCULEUX CHEZ LES PATIENTS DES  
COMMUNES III et VI DU DISTRICT DE BAMAKO, MALI

**Année universitaire :** 2021-2022

**Pays et ville de soutenance :** Mali – Bamako

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

**Secteurs d'intérêt :** CSLS-TBH, Bactériologie, Clinique, Santé publique.

## Résumé

**Introduction :** La tuberculose est une maladie infectieuse chronique et contagieuse due au complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Il représente un problème majeur de santé publique . Selon l'organisation Mondiale de la Santé (OMS), En 2019, 10 millions de personnes ont contracté la tuberculose et 1,4 million en sont mortes. C'est l'une des 10 premières causes de décès dans le monde et la première cause de décès due à un seul agent infectieux. L'un des principaux facteurs alimentant l'épidémie de tuberculose est l'émergence et la propagation de souches de MTB résistantes aux médicaments.

Le Mali, un grand pays aux ressources limitées, a enregistré en 2020, 6 922 cas incidents de tuberculose dont 22 patients TB-MR pour une incidence de 53 cas pour 100 000 habitants. L'OMS estime qu'environ 1 % des nouveaux patients tuberculeux et 14 % des patients précédemment traités au Mali sont atteints de TB-MR.

**Objectif :** Evaluer la prévalence de la résistance primaire du bacille tuberculeux aux antibiotiques utilisés chez les patients des communes III et VI du district de Bamako.

**Matériels et méthodes :** Il s'agissait d'une étude prospective, descriptive, qui s'est déroulée du 1er Aout 2020 AU 30 Avril 2021 au centre de santé de référence de la Commune III et Commune VI de Bamako, qui a inclus 81 isolats de *Mycobacterium tuberculosis* après identification. L'ensemble des isolats ont bénéficié de l'étude de sensibilité à la rifampicine, isoniazide, streptomycine et Ethambutol, Ofloxacine et Kanamycine réalisée en milieu liquide (Bactec MGIT 960 ATB SIRE). L'identification et la recherche des mutations au niveau du gène rpoB pour la rifampicine et katG et inhA pour l'isoniazide ont été réalisées par méthode moléculaire. Les données ont été collecter aux CSRef, saisies sur Microsoft Excel version 2013 et analysées par IBM SPSS Statics 25. Les figures et les tableaux ont été faits à Microsoft Excel 2013.

**Résultats :** Sur les 81 isolats du *Mycobacterium tuberculosis* testés vis-à-vis aux antituberculeux, les souches étaient plus résistantes à l'isoniazide. le taux de la résistance primaire était de 7,4%. les isolats TB-MR étaient de 1,2%. 3,7% des isolats étaient poly-résistantes ( Résistantes croisées à l'isoniazide et Streptomycine). Sur les Six isolats résistante à l'isoniazide, par méthode phénotypique, Cinq ont été confirmé par biologie moléculaire. Tous les isolats détectés résistante à la rifampicine ont été confirmé par la biologie moléculaire. Il n'y a pas eu de résistance primaire à l'ofloxacine et à la kanamycine.



Le VIH et l'âge ne sont pas des facteurs qui influencent la sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis* aux antituberculeux.

### **Conclusion :**

La TB-MR est un problème majeur de santé publique. Cette étude montre la présence et la circulation des souches multi-résistantes à Bamako.

L'introduction des tests de sensibilité moléculaire comme outil de dépistage améliorera la détection précoce de la TB-MR et améliorera les résultats du traitement et freinera la propagation de la TB-MR.

## **PROFILE SIGNAGE**

**Name :** SAMAKE

**First Name :** Dramane

**Phone :** 00223 76155391

**Email :** dramanesamake011@gmail.com

**Thesis title:** STUDY OF THE PRIMARY RESISTANCE OF THE Mycobacterium tuberculosis COMPLEX TO ANTITUBERCULAR DRUGS IN PATIENTS IN COMMUNES III AND VI OF THE DISTRICT OF BAMAKO, MALI.

**Academic year :** 2021 – 2022

**Defense country and city:** Mali – Bamako

**Deposit local:** Library of the Faculty of Medicine and Odontostomatology and the Faculty of Pharmacy.

**Area of interest:** PNLTP, Bacteriology, Clinic, Public health.

## **Summary**

**Introduction :** Tuberculosis is a chronic and contagious infectious disease caused by the *Mycobacterium tuberculosis* complex and represents a major public health problem.

According to the World Health Organization (WHO), In 2019, 10 million people contracted tuberculosis and 1.4 million died from it. It is one of the top 10 causes of death worldwide and the leading cause of death from a single infectious agent. One of the main factors fueling the TB epidemic is the emergence and spread of drug-resistant strains of MTB.

Mali, a country with a high endemic tuberculosis, had an estimated incidence of 53 new cases per 100,000 inhabitants in 2018. WHO estimates that around 1% of new tuberculosis patients and 14% of patients previously treated in Mali have TB -MR.

**Objective:** To measure the prevalence rate of primary resistance of the tuberculosis bacillus to the antibiotics used by the National Tuberculosis Control Program (PNLT).

**Materials and Methods:** This was a prospective, descriptive study, which took place from August 1, 2020 TO April 30, 2021 at the reference health center of Commune III and Commune VI of Bamako, which included 81 isolates of Mycobacterium tuberculosis after identification. All the isolates benefited from the sensitivity study to rifampicin, isoniazid, streptomycin and Ethambutol, Ofloxacin and Kanamycin carried out in liquid medium (Bactec MGIT 960 ATB SIRE). The identification and testing of mutations in the rpoB gene for rifampicin and katG and inhA for isoniazid was performed molecularly. The data were collected at CSRef, entered in Microsoft Excel version 2013 and analyzed by IBM SPSS Statics 25. Figures and tables were made in Microsoft Excel 2013.

**Results:** Of the 81 isolates of Mycobacterium tuberculosis tested for anti-tuberculosis drugs, the strains were more resistant to isoniazid. the rate of primary resistance was 7.4%. MDR isolates were 1.2%. 3.7% of the isolates were multidrug resistant (Cross-resistant to isoniazid and Streptomycin). Of the six isolates resistant to isoniazid, phenotypically, five were confirmed by molecular biology. All isolates detected resistant to rifampicin were confirmed by molecular biology. There was no primary resistance to ofloxacin and kanamycin.

HIV and age are not factors that influence the susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to anti-tuberculosis drugs.

**Conclusion:**

MDR-TB is a major public health problem. This study shows the presence and circulation of multi-resistant strains in Bamako.

The introduction of molecular susceptibility testing as a screening tool will improve early detection of MDR-TB, improve treatment outcomes and slow the spread of MDR-TB.

### **9.3. Annexe 3:**

#### **MODE OPERATOIRE DE COLLECTE, TRANSPORT ET STOCKAGE DES ECHANTILLONS POUR LA RECHERCHE DES MYCOBACTERIES**

##### **Principe**

- ✓ Obtenir un échantillon de bonne qualité permettant d'assurer une microscopie efficiente et des résultats fiables.

##### **Matériels**

Pot transparent à large ouverture avec fermeture à vis.

##### **Nature des prélèvements**

##### **Expectoration**

Le prélèvement se fait le matin au réveil, dans un environnement bien aéré à la suite d'un effort de toux pour ramener les excréctions bronchiques accumulées pendant la nuit.

Les expectorations sont reçues dans un pot transparent à large ouverture avec fermeture à vis fourni par le laboratoire.

Un (1) pot est remis au patient le 1er jour en lui expliquant les conditions de recueil d'un bon crachat. Il fournit le 1er crachat ce jour.

Un second pot lui est remis pour recueillir le 2eme crachat le lendemain au réveil.

Le volume idéal est de 3 à 5ml, cependant les échantillons de volume inférieur ne doivent pas être systématiquement rejetés.

##### **Transport et conservation**

Les échantillons collectés aux Centres de Santé de Référence sont acheminés au CICM. Après enregistrement, ils sont gardés au frais (+4°C) jusqu'au jour du traitement.

## 9.4. Annexe 4

### MODE OPERATOIRE DE PRE-TRAITEMENT DES ECHANTILLONS POUR RECHERCHE DES MYCOBACTERIES PAR CULTURE

#### Principe

- L'addition de la soude aux échantillons élimine les bactéries de la flore commensale.
- Les bactéries commensales sont ainsi mises en contact avec l'agent décontaminant et sont détruites. Les mycobactéries plus résistantes survivent, le rendement de la culture est ainsi augmenté de façon notable. Toutefois, bien que plus résistantes aux antiseptiques que les autres bactéries, les mycobactéries n'y sont pas complètement insensibles et la décontamination doit être effectuée en respectant scrupuleusement la concentration de l'antiseptique et son temps de contact avec l'échantillon.
- Pour que la décontamination soit de bonne qualité, il faut que les échantillons, notamment les crachats, soient homogénéisés par un agent fluidifiant qui libèrent les bactéries (contenues dans le mucus, le pus) et les cellules.

#### Matériels

Echantillon dans pot transparent de 50 ml à large ouverture. (QUALIBACT ; PC 150S ; Lot : 911342).

- Tubes coniques stérile pour centrifuger en polypropylène de 50 ml (TC450).
- Pot stérile 30 ml bouchon rouge pour aliquotage de la solution NAOH Citrate NALC
- Pipettes plastiques de transfert
- Pipette de 200 – 1000 µL avec cône stérile à filtre
- Tube pour congélation 3mL,
- Lames dégraissées
- Vortex.
- Plaque chauffante
- Centrifugeuse sécurisée et réfrigéré

- Poste de sécurité microbiologique PSMTYPE II.

- Minuteur.

Poubelles DASRI liquides et solide

- Papier de type Benchcoat

- Compresses

- Marqueur et crayon de papier

- Portoirs pour tubes de culture et portoirs pour tubes de 50 ml Réactifs

- Flacon en verre de solution NaOH Citrate de sodium stérile. Voir annexe 1

- Flacon en verre de Tampon de phosphate stérile. Voir annexe 2

- Poudre de N-acétyl-L-cystéine NALC (PROLABO ; Pro20097134).

Aliquot en Pot de 250 MG N acétyl L cystéine NALC qsp pour 50 ml de la solution de NaOH  
CITRATE

Albumine bovine (BIOMERIEUX ; REF : 55242).

Tube de Coletsos.

Tube MGIT : tubes contenant 7 ml de milieu 7H9 et un détecteur fluorescent de  
consommation d'O<sub>2</sub> qui sert d'indicateur de croissance. Conservation entre 2°C – 25°C

Milieu gélose au sang ; GS

Coffret de supplément d'antibiotiques PANTA flacon de poudre lyophilisée.

Coffret de supplément de croissance OADC ; flacon de 15 ml

Solution détergent-désinfectant.

## **Echantillons**

### **Expectoration**

Les expectorations sont reçues dans un pot transparent de 50 ml à large ouverture fournis par  
le laboratoire.

Volume minimum de 2 ml et maximum 10 ml

## **Urines**

Volume minimum de 40 ml

Elles sont d'abord centrifugées et le culot est traité comme une expectoration

## **Pus**

Volume minimal de 2 ml et maximal 10 ml.

Les écouvillons sont non conformes pour la mise en culture

Les pus, pour libérer les germes du mucus, subissent une étape de décontamination et de fluidification.

## **Liquides de ponction et biopsies**

Les liquides de ponctions (liquide d'ascite, pleural, LCR) sont apportés au laboratoire dans des tubes stériles.

Les liquides de ponctions sont centrifugés et le culot mis en suspension dans l'albumine bovine est directementensemencé et étalé sur une lame pour l'examen direct.

Les biopsies sont broyées et mis en suspension dans l'albumine bovine est directementensemencé et étalé sur une lame pour l'examen direct.

NB ; Un liquide de ponction sanglant ne peut pas être cultivé en tube MGIT. On ensemencera trois tubes Coletsos Mode opératoire

### Organisation

Les échantillons sont techniques du lundi au vendredi. Par série de 8 échantillons

### Déroulement

❖ En dehors du PSM :

Étiqueter les pots pour aliquotage du NAOH/NALC et du Tampon phosphate 'PBS'

o Étiqueter le milieu Coletsos tube MGIT, et la lame

o Préparer le portoir des tubes de 50 ml pour la décontamination ;

- Numéroter de 1 à 10 les tubes
- Le tube numéro 1 et 10 seront des témoins négatifs

- Nettoyer le PSM pour préparer les aliquots et les tubes de MGIT :

o Préparer les aliquots de 10 ml dans les pots de NaOH

o Préparer les aliquots de 40 ml de PBS en tube Falcon®.

o Préparer les aliquots de 3ml SAB.

❖ Sous PSM, réhydrater le lyophilisat de la poudre de PANTA en transvasant les 15 ml OADC.

o Indiquer la date de préparation ainsi que les initiales de l'opérateur

o Supplémenter le nombre de tube MGIT nécessaire pour la technique du jour

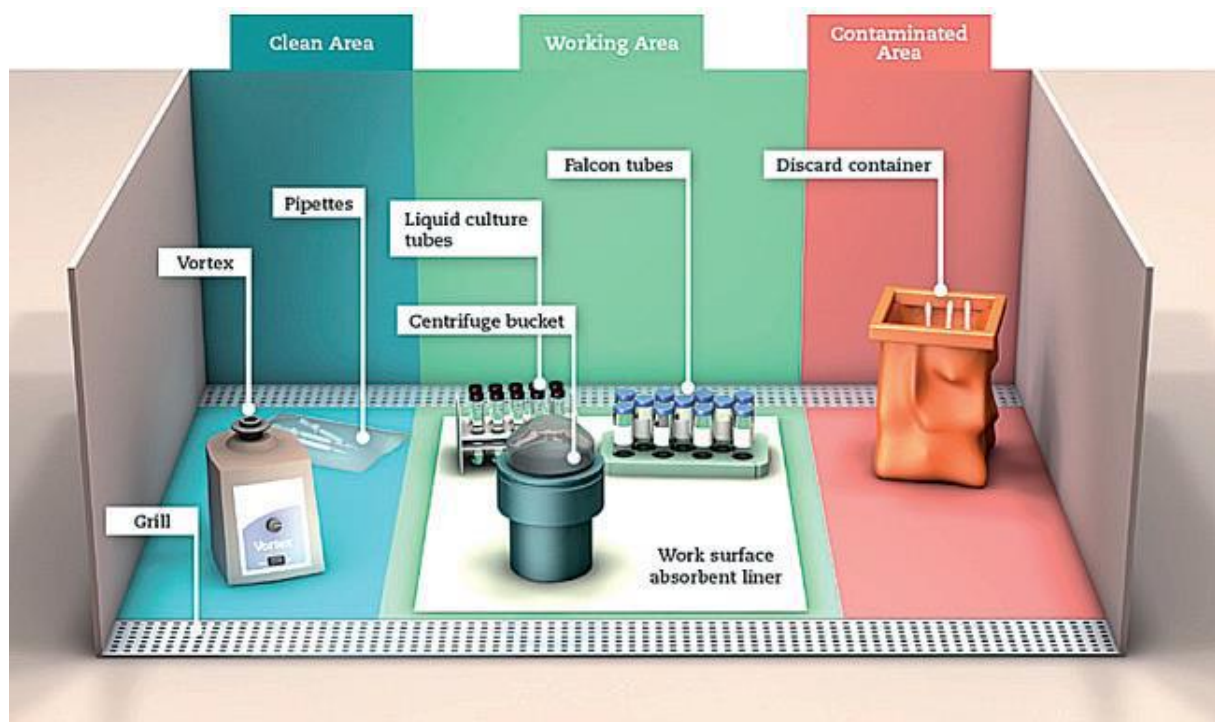
Ajouter 800 µl du mélange PANTA-OADC par tube.

o Le restant du mélange PANTA-OADC sera conservé environ 4°C à l'abri de la lumière pdt 5 jours.

o Vérifier avant chaque utilisation que le mélange PANTA-OADC n'est pas trouble.

o Conserver sur un portoir les tubes MGIT préparés en dehors du PSM.

Organiser le PSM avant la technique de décontamination :



Transférer les échantillons 3 à 5 ml dans des tubes coniques de 50 ml numérotés



Compléter volume à volume avec la solution NaOH-NALC

Agiter doucement au vortex ou retourner 5 fois ; pour ne pas dénaturer le NALC

Démarrer le minuteur dès que la solution NAOH-NALC est versée dans le premier tube

Mélanger et retourner de nouveau les tubes au bout de 7 minutes

Après 15-20 mn de contact, remplir chaque tube avec un tampon phosphate jusqu'au repère de 45ml

Centrifuger à 3000g pendant 15 mn (placer les tubes dans les pots à centrifuger à l'intérieur du PSM).

Organiser le PSM pour la deuxième phase technique :

Classer sur le portoir ensemencement le milieu Coletsos et le tube MGIT

Classer sur la platine chauffante les 8 lames

- Ouvrir les plots à centrifuger à l'intérieur du PSM
- Sortir les tubes de décontamination et replacer dans l'ordre sur le portoir
- Verser le surnageant dans la poubelle liquide, essuyer le bord du tube avec la compresse imbibée de désinfectant
- Avec une pipette de transfert ajouter environ 2 ml d'Albumine bovine
- Par aspiration refoulement pour remettre le culot en suspension
- Pipeter les 3 ml et ensemencer les milieux ;
  - 500 µl dans le tube MGIT, bien serrer le bouchon
  - 3 gouttes dans le tube Coletsos, ne pas trop serrer le bouchon
  - Environ 2ml pour la boîte de congélation
  - Etaler une goutte pour le frottis
  - Laisser sécher le frottis sous PSM et le fixer par la chaleur
  - Ranger le PSM

- Après décontamination externe, incuber les milieux dans les étuves respectives
- Placer les tubes de culot de décontamination au congélateur à -20°C

### **Gestion des déchets**

Voir procédure de gestion des déchets

### **PREPARATION DES SOLUTIONS DE DECONTAMINATION**

NaOH à 4 %, citrate de Na à 2,9

Poudre de Na OH (référence Fisher)

Poudre de Citrate de Na réhydratée (référence Fisher)

Eau distillée

Erlenmeyer de 1 litre

Becher de 500 ml

Falcon de 50 ml pour aliquotage de la solution NaOH Citrate de sodium.

Préparation du réactif

À l'aide d'une balance numérique, peser :

- 40 g NaOH qsp 500 ml d'eau distillée dans un bécher,
- Placer le bécher sur un agitateur magnétique,
- 58g de Citrate de Na qsp 500 ml d'eau distillée,
- Placer le bécher sur un agitateur magnétique,
- Après dissolution mélanger les 2 solutions,
- Aliquote par 100 ml dans des flacons propres en verre bouchés hermétiquement,
- Étiqueter tous les flacons en indiquant le nom du réactif, le numéro de lot, la date de préparation, la date d'expiration et le nom du technicien.
- Autoclaver pendant 15 minutes à 121°C, 15 PSI.

- Laisser refroidir à température ambiante,
- Incuber à 37°C pendant 24h, si les flacons ne sont pas troubles, valider le lot.
- Puis conserver à une température comprise entre 20 et 25°C

<b>Nom du réactif :</b> Solution de travail NaOH- Citrates de Na 1 litre	<b>Numéro de lot :</b>	<b>Date de préparation :</b>	<b>Volume total préparé :</b>	<b>Date d'expiration :</b>	<b>Préparé par :</b>
<b>Ingrédients</b>	<b>Numéro de fournisseur/c atalogue</b>	<b>Numéro de lot</b>	<b>Quantité ajoutée</b>	<b>Technicien</b>	<b>Date</b>
NaOH	Fisher #		40g		
Eau distillée			500 ml		

Remplir le document de traçabilité des lots.

Citrates de sodium dihydraté	Fisher #		58 g		
Eau distillée			500 ml		

### **N-acétyl-L-cystéine (NALC)**

- La NALC est achetée sous forme de poudre.
- A l'aide d'une balance le jour de l'utilisation, pesez 500mg de NALC et ajoutez-les à 100ml de NaOH-Citrate de Na.
- Après addition du NALC, le produit résultant doit être utilisé dans les 24 heures.

**NB :** La NALC est sensible à un secouage ou mélangeage intensif et un mélangeage trop vigoureux de la solution de NaOH et de la NALC peut provoquer une perte de l'activité mucolytique.

### **Tampon phosphate à 0,067 M, pH 6,8.**

Cette solution consiste en deux solutions mères séparées. Préparez d'abord des solutions mères de :

- Phosphate disodique (solution A)

Dissolvez 9,07g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhydre dans 1 litre d'eau distillée

- Monophosphate de potassium (solution B)

Dissolvez 9,07 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dans 1 litre d'eau distillée

Après avoir préparé ces solutions, mélangez 500 ml de solution A et 500 ml de solution B.

Vérifiez le pH à l'aide d'un pH-mètre étalonné.

- Ajustez le pH à  $6,8 \pm 0,2$  en utilisant :
  - la solution A pour augmenter le pH
  - la solution B pour diminuer le pH

Finalement, versez dans des bouteilles de réactif la quantité de solution normalement nécessaire pour traiter les échantillons d'un lot.

- Stérilisez à l'autoclave pendant 15 minutes à 121 °C, 21 PSI (1,45 bar)
- Etiquetez et conservez à la température ambiante ou à une température de 2 à 8 °C.

### **Utilisation du pH-mètre**

---

- Avant d'utiliser le pH-mètre, étalonnez-le à l'aide d'au moins deux solutions tampons étalons. Cet étalonnage doit être effectué chaque fois que vous utilisez le pH-mètre.
- Généralement, une des solutions étalons a un pH de 7 (pH neutre) et l'autre est choisie pour correspondre à la plage de pH dans laquelle les mesures doivent être prises, habituellement un pH de 10 pour les solutions basiques et un pH de 4 pour les solutions acides (le pH des solutions étalons n'est valide qu'à 25 °C).
- Après l'étalonnage, rincez la sonde dans de l'eau distillée désionisée pour éliminer toutes les traces de la solution tampon, séchez-la avec un mouchoir en papier propre pour absorber toute l'eau qui pourrait diluer l'échantillon et donc modifier la valeur lue, puis plongez rapidement la sonde dans l'échantillon.
- La valeur du pH est affichée sur l'écran.
- Rincez l'électrode avec de l'eau distillée désionisée pour éliminer toute trace de l'échantillon et remettez-la dans le tampon de stockage.

### **Contrôle qualité**

La documentation de la préparation des milieux et des réactifs est un élément essentiel du contrôle qualité. Cette documentation est très importante parce qu'elle peut servir éventuellement à retrouver la source de problèmes dus à un lot de mauvaise qualité d'un ingrédient. Voyez ci-dessous un exemple de documentation de la préparation d'un réactif :

#### **Préparation de réactif**

<b>Nom du réactif</b> :	<b>Numéro de lot</b>	<b>Date de préparation</b> :	<b>Quantité totale préparée</b> :	<b>Date d'expiration</b> :	<b>Préparé par</b> :
Solution de travail NaOH/citrate de Na					

Instructions de préparation :

A l'aide d'une balance numérique, pesez les quantités de NaOH et de citrate de Na indiquées ci-dessus.

Mesurez et ajoutez aux poudres le volume d'eau spécifié ci-dessus dans un bécher de taille appropriée.

Placez le bécher sur un agitateur magnétique et utilisez un barreau aimanté pour bien mélanger.

Versez les parties aliquotes voulues dans des bouteilles propres en verre ou en polypropylène et bouchez hermétiquement.

Collez sur chaque bouteille une étiquette portant le nom du réactif, le numéro de lot, la date de préparation, la date d'expiration et le nom du technicien.

Passez à l'autoclave pendant 15 minutes à 121 °C et 15 PSI.

Refroidissez à la température ambiante, conservez à 2-8 °C.

Les réactifs et les milieux de CQ doivent être conservés dans de bonnes conditions :

- Essayez de ne préparer que 2 mois de stock à la fois pour que les réactifs soient toujours frais.
- Si vous conservez le NaOH et la solution tampon phosphate à la température ambiante, placez-les dans un endroit frais et sombre ou bien conservez-les à une température de 2-8 °C.
- La gélose BHI préparée doit être conservée à 2-8 °C.
- La NALC peut être conservée à la température ambiante, dans un endroit frais, sec et sombre. Vérifiez que chaque tube est hermétiquement fermé car l'humidité provoque l'agrégation de la NALC qui colle alors aux parois des tubes, ce qui empêche de l'ajouter au NaOH.

#### **Contrôle qualité avant utilisation pour traitement :**

Vous devez vérifier que le tampon phosphate est bien stérile avant d'utiliser les réactifs. Faites une sous-culture sur de la gélose BHI avec approximativement 10 % du lot préparé et incubez-la pendant 48 heures à 37 °C pour déterminer si des contaminants sont présents.

Pour vous assurer de la stérilité de la gélose BHI, placez 10 % du lot préparé à 37 °C et recherchez la présence de colonies après 48 heures.

## Contrôle qualité des réactifs pendant le traitement

- Assurez-vous de la stérilité de l'hydroxyde de sodium/citrate de sodium et de la NALC à l'aide de tubes vierges témoins de contamination dans les séries traitées quotidiennement.
- Vous pouvez par exemple traiter un témoin vierge (5 ml d'eau stérile) de la même manière que les échantillons. Le premier tube et le dernier tube de chaque lot d'échantillons traités doivent être des témoins vierges.
- Inoculez chaque témoin vierge traité sur un milieu BHI incliné et sur un milieu L-J incliné pour vous assurer de la stérilité des réactifs de traitement utilisés pendant la journée, pour vérifier qu'une technique aseptique a bien été suivie pendant le traitement et pour constater l'absence de contamination croisée d'un tube à l'autre pendant les manipulations.
- Faites une sous-culture de chaque bouteille de tampon phosphate utilisée sur de la gélose BHI ou de la gélose au sang et sur du L-J avant et/ou après chaque série de traitement le jour de l'utilisation.

## Récapitulation des principaux points

Les réactifs et les milieux utilisés pour le traitement des échantillons BT et le CQ incluent :

- ✚ NaOH à 4 %
- ✚ Citrate de Na à 2,9 %
- ✚ Tampon phosphate 0,067 M, pH 6,8
- ✚ Gélose coeur-cervelle
- ✚ Assurez-vous que la balance est horizontale et vérifiée
- ✚ Mesurez les ingrédients avec précision
- ✚ Etiquetez et conservez les produits comme il convient
- ✚ **Documentez toutes les préparations et le contrôle qualité !**

## 9.5. Annexe 5

### MODE OPERATOIRE DE LA GESTION DES CULTURES SUR MILIEUX SOLIDES DES MYCOBACTERIES

#### Principe

Ce mode opératoire consiste à suivre les cultures de mycobactéries sur milieux solides.

#### Matériels

Etuve 37°C

Cryotube 2 ml à vis externe

EPI (voir mode opératoire BPL)

Anses à usage unique

Plaque chauffante

Lames

Pipettes réglables pour 200, 1000

Des embouts à filtre pour 200 et 1000

Pipettes de transfert 3 ml

Réactifs

Kit Ag MPT64 pour identification

Eau physiologique

Tubes coletsos/L.J

Mode opératoire

Les milieux solides sont incubés après ensemencement pour une durée de huit (8) semaines. Après une semaine d'incubation les cultures sont observées et les tubes vissés hermétiquement à l'absence d'eau de condensation sur la surface de la gélose. A partir de la



deuxième semaine les tubes de cultures sont observés une fois par semaine. Les options suivantes peuvent être observées :

**Cultures contaminées :**

Au cours de la culture, si on constate une désintégration de la gélose ou que toute la surface de la gélose est recouverte de champignons, les cultures sont interrompues et les tubes jetés.

**Cultures positives :**

A la culture positive, les colonies sont identifiées selon leur caractère macroscopique et microscopique.

Si l'aspect microscopique et macroscopique oriente nt vers les mycobactéries on procède à l'identification par la recherche de l'Ag MPT64 (MO. Identification des mycobactéries)

S'il y a un mélange de colonies, confronter les résultats à ceux des milieux liquides.

**Cultures négatives :**

Au bout de huit semaines si on n'observe aucune colonie les tubes sont retirés de l'étuve et jetés.

**Enregistrement des données :**

Les résultats seront reportés au registre de paillasse et au SGIL

**Contrôle de qualité**

Afin de contrôler le bon déroulement du test et la qualité des réactifs, chaque lot de milieu de culture est contrôlé avec une souche de référence.

**Gestion des déchets :** (MO : gestion des déchets)

## 9.6. Annexe 6

### MODE OPERATOIRE DE L'ANTIBIOGRAMME EN MILIEU LIQUIDE (MGIT SIRE)

#### Principe

Le coffret BDTMBACTECTM MGIT 960TM SIRE KIT est un test qualitatif d'une durée de 4 à 13 jours. Le test est basé sur une comparaison de la croissance d'un isolat de Mycobacterium complex tuberculosis mis dans un tube contenant l'antibiotique à tester, avec celle du même isolat dilué : au 1/100e (ou 1/10e pour le PZA) dans un tube sans antibiotique (témoin de croissance).

En première intention : 4 antibiotiques sont testés : Streptomycine (S), Isoniazide (I), Rifampicine (R), Ethambutol (E).

#### Matériels

Automate BACTEC MGIT 960

Portoirs à MGIT

Vortex

Portoirs à code barre pour antibiogramme

Pipette 200µl avec cônes stériles à filtre 200µl

Pipette 1000µl avec cônes stériles à filtre 1000µl

Tubes conique 15 ml

Billes de verre

Pipettes de transfert en plastique, à usage unique

EPI (voir mode opératoire BPL)

Réactifs

Tubes MGIT non supplémentés.

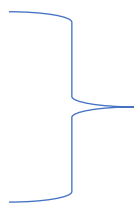
MGIT SIRE Supplément.

Streptomycine.

Isoniazide.

Rifampicine.

Ethambutol.



Préalablement aliquotés à  $-20^{\circ}\text{C} \pm 2$  dans le congélateur

Sérum physiologique stérile

Mode opératoire

Préparer le PSM

Identifier les tubes MGIT avec l'étiquette patient, la date de réalisation de l'antibiogramme

1 tube T (témoin)

1 tube S (Streptomycine)

1 tube I (Isoniazide)

1 tube R (Rifampicine)

1 tube E (Ethambutol)

Sous le PSM

Distribuer les suppléments et les antibiotiques selon le schéma ci-après

	<b>Tubes MGIT</b>				
	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>	<b>E</b>
Supplément <b>SIRE</b>	800 $\mu\text{l}$	800 $\mu\text{l}$	800 $\mu\text{l}$	800 $\mu\text{l}$	800 $\mu\text{l}$
aliquot d'antibiotique	-	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$
		<b>STREPTO</b>	<b>INH</b>	<b>RIFAM</b>	<b>ETHAM</b>
Inoculum (J1-J2)	500 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$
	1/100	<b>Pur</b>	<b>Pur</b>	<b>Pur</b>	<b>Pur</b>
Inoculum (J3-J5)	500 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$
	1/500	1/5	1/5	1/5	1/5

Activer V  
Accédez au

## Préparation et distribution de l'inoculum

A partir du tube MGIT :

Vortexer, laisser sédimenter 5 mn et procéder aux dilutions à partir du surnageant.

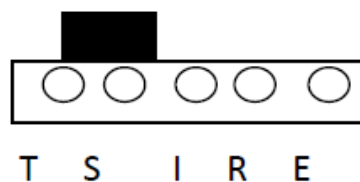
J1 J2 : faire une dilution au 1/100 (100µl dans 10ml d'eau physiologique) pour le témoin.

Repartir le pur (500µl) dans le tube SIRE

J3-J5 : faire une dilution au 1/5 (1ml dans 4ml d'eau physiologique) pour SIRE.

Préparer la dilution au 1/100 à partir du 1/5 (100µl dans 10ml d'eau physiologique) pour le témoin.

Mettre les tubes dans les portoirs à code barre, toujours dans le même ordre selon le schéma suivant :



Avant introduction des portoirs dans le 3ème tiroir du Bactec sélectionner les antibiotiques souhaités (cf. SOP chargement déchargement).

Enregistrement des données :

Les résultats seront reportés au registre de paillasse et au SGIL

Contrôle de qualité

Afin de contrôler le bon déroulement du test et la qualité des réactifs, chaque nouveau coffret est contrôlé avec une souche de référence.

Gestion des déchets :

Cf MO gestion des déchets

Conservation et reconstitution des réactifs :

**PREPARATION DES ANTIBIOTIQUES** (sous la hotte propre avec des gants) :

Coffret BDTMBACTECTM MGIT 960TM SIRE KIT contenant les antibiotiques déshydratés.

Antibiotiques standards

A reconstituer avec de l'eau distillée stérile (ampoules) comme suit :

STREPTOMYCINE **1** + 4 ml d'eau distillée

ISONIAZIDE **0,10** + 4ml d'eau distillée

RIFAMPICINE **1** + 4ml d'eau distillée

ETHAMBUTOL **5** + 4ml d'eau distillée

Après reconstitution, préparer des aliquots de 110µl dans des tubes, datés et identifiés de l'initial de l'antibiotique.

**Ils seront congelés à  $-20^{\circ}\text{C} \pm 3$ , et valable pendant 6 mois à partir de la reconstitution, sans dépasser la date de péremption du lyophilisat et ranger dans le congélateur, dans les boîtes identifiées (SIRE).**

**NB :** Une fois décongelés les aliquots d'ATB doivent être utilisés immédiatement. Jeter les portions non utilisées.

## 9.7. Annexe 7

### MODE OPERATOIRE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES

#### Principe

Ce mode opératoire consiste à identifier les mycobactéries à partir des culots de décontamination, des cultures liquide et solide.

#### Matériels

Vortex

Cryotube 2 ml à vis externe

EPI (voir mode opératoire BPL)

Anses à usage unique

Pipettes réglables pour 200, 1000

Des embouts à filtre pour 200 et 1000

Pipettes de transfert 3 ml

#### Réactifs

Kit Ag MPT64 pour identification

Eau physiologique

Tubes coletsos/LJ

Tubes MGIT

#### Mode opératoire

L'identification se fait sur les culots de décontamination avec frottis positifs au ZN, sur les milieux de cultures liquides et/ou solides positifs.

Culots de décontamination :

L'identification se fait par technique moléculaire (cf. MO HAINS)

#### Cultures liquides :

On procède à l'identification par

la recherche de l'Ag MPT64 pour le complexe tuberculosis (Cf MO Ag MPT64).

La recherche du complexe tuberculosis (MTBDRplus cf. MO HAINS)

La recherche de l'espèce par technique moléculaire (MTBC cf. MO HAINS)

la recherche des mycobactéries atypiques (CM/AS cf. MO HAINS)

**Cultures solides :**

Les colonies sont mises en suspension et les techniques sont identiques à celles en milieu liquide (cf. 4.2).

**Enregistrement des données :**

Les résultats seront reportés au registre de paillasse et au SGIL

**Contrôle de qualité**

Afin de contrôler le bon déroulement du test et la qualité des réactifs, chaque nouveau coffret est contrôlé avec une souche de référence.

### **SERMENT DE GALIEN**

- Je jure en présence des maîtres de cette Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes chers condisciples.
- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- D'exercer dans l'intérêt de la santé publique ma profession, avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine. En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.
- Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.
- Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

**Je le jure !**