

République du Mali

Un Peuple - Un But - Une Foi

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique

**UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES ET DES
TECHNOLOGIES DE BAMAKO**



FACULTE DE PHARMACIE



Année universitaire 2021-2022

N° :.....

THESE

**Evaluation de la qualité des réactifs de coloration pour le
diagnostic de la tuberculose par la microscopie à
fluorescence au Mali**

Présentée et soutenue publiquement le 11/01/2023 devant la

Faculté de Pharmacie

Par : **Mme Amadigué Josephine PEROU**

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

JURY

Président : Pr Flabou BOUGOUDOUGOU

Membres : Dr Aissata Boubakar CISSE

Dr Mohamed AG BARAKA

Co-directeur : Pr Ibrehima GUINDO

Directeur de thèse : Pr Yacouba TOLOBA

DEDICACES

Je dédie ce travail :

A MES CHERS PARENTS

A MON PÈRE OGOBARA AUGUSTIN

Tu nous as montré le chemin du travail et du courage, ta rigueur dans l'éducation a toujours guidé nos pas, ta sagesse, tes critiques et ta culture d'une famille unie resteront à jamais dans notre mémoire. Ton amour particulier pour nous m'a illuminé le chemin du savoir.

Trouve à ce modeste travail un début de récompense à tes nombreux sacrifices. Je suis sûr que tes vœux seront exhaussés par le Tout Puissant et que tes conseils ne seront pas vains.

Tout ce que je peux vous offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je vous porte

Puisse Dieu le Tout Puissant te garde encore longtemps auprès de nous pour que tu puisses profiter des fruits de nos efforts.

A MA MERE JEANNE DOUYNON

Chère mère ce modeste travail est le témoignage de ma promesse faite depuis le début de cette étude.

Merci pour ton amour maternel qu'une mère a de mieux pour son enfant.

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour vous, que Dieu vous préserve et procure santé et longue vie

REMERCIEMENTS

Mes remerciements à l'endroit de :

✓ **DIEU**

Le tout Puissant, Qui m'a toujours gardé, inspiré et guidé dans le droit chemin.

« Gloire à Toi ! Nous n'avons de savoir que ce que Tu nous as appris. Certes c'est Toi l'Omniscient, le Sage » Merci, Je Lui dois ce que je suis devenu et deviendrai.

✓ **MON EPOUX SAMUEL GUINDO**

Ce travail te doit beaucoup. Qu'il soit pour toi le témoignage de mon infinie reconnaissance pour ces années de compréhension, de privations et d'efforts communs. Que ce travail soit l'accomplissement de tes vœux tant allégués, et le fruit de ton soutien infaillible.

✓ **MES FRERE ET SŒUR**

Pour leur appui, leur encouragement et leur soutien tout au long de mon parcours universitaire. L'union, la complicité et la joie de vivre ensemble, qui ont toujours existé dans notre famille nous ont galvanisé dans la bonne réalisation de ce modeste travail. Avançons ensemble dans l'union tels sont les vœux de nos parents. Merci à vous tous pour votre soutien inlassable et prions Dieu afin que nous puissions tous jouir du fruit de ce travail.

Merci d'être toujours là pour moi.

- **MES ONCLES ET TANTES**

Toutes mes gratitudes, ce travail est l'exaucement de vos prières.

- **MES COUSINS, COUSINES, NIECES ET NEVEUX**

Recevez toute ma sympathie et mon amour.

- **MON GROUPE D'EXERCICE : Assetou KEITA, Ichiaka DIARRA,**

Moustapha TRAORE, Ali TEMBELY.

Merci pour les soutiens et l'entraide, dans les moments durs et de luttés.

- **MES AMIES : Assetou KEITA, Aicha MAIGA, Zeina TOURE**

Vous étiez, êtes mes confidentes dans les moments difficiles,

Merci pour votre amitié et votre considération, recevez ici ma profonde estime.

- **TOUS LES ETUDIANTES ET ETUDIANTS, DE PRES OU DE LOIN DE
LA FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE**

Toutes mes reconnaissances pour la formation reçue.

- **DES PERSONNELS DE LA PHARMACIE NONKON KOROYA**
- **DES PERSONNELS DE L'INSTITUT NATIONALE EN SANTE
PUBLIQUE (INSP)**
- **DES PERSONNELS DE LABORATOIRE NATIONAL DE RECHERCHE
DE LA TUBERCULOSE (LNR-TB) DE L'INSP : Dr. Aissata B CISSE, Mme
TOURE Fatoumata COULIBALY, Mme TRAORE Hawa SAMAKE,
Ibrahim DJILLA, Mme SANOGO Hawa SIMPARA, Seydou ARAMA**

*Merci pour la formation, la tolérance, la compréhension et la sympathie qui n'ont
cessé d'agrandir de jour en jour durant tout mon séjour pour l'élaboration de ce
modeste travail d'exercice qui est le vôtre.*

- **La 11^{em} PROMOTION DU NUMERUS CLAUSUS**

*Chers collègues de la promotion feu Pr. Moussa HARAMA, je vous remercie pour la
collaboration tout en nous souhaitant une brillante carrière professionnelle dans l'honneur et
la dignité du code de la profession.*

**HOMMAGE AUX
MEMBRES DU
JURY**

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DU JURY

Pr. Flabou BOUGOUDOGO

- **Maître de conférences agrégé de Bactériologie-virologie à la Faculté de Pharmacie**
;
- **Professeur honoraire de Bactériologie-virologie à la Faculté de Pharmacie ;**
- **Ancien Directeur Général de l'INSP de 2002 à 2012 ;**
- **Officier de l'ordre du mérite de la santé.**

Honorable Maitre,

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

Nous avons été étonnés par votre modestie, bien que vous soyez un homme de science renommé.

Votre détermination pour l'avancement de la science et de sa qualité fait de vous un maitre inoubliable.

Veillez agréer cher maitre, l'expression de notre profonde considération.

A NOTRE MAITRE ET MENBRE DU JURY

Dr. Aissata Boubakar CISSE

- **Docteur en pharmacie ;**
- **Détentrice de Master 2 en Immunologie ;**
- **Attachée de recherche ;**
- **Doctorant en Microbiologie immunologie.**

Honorable Maitre,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

Nous avons été séduits par votre franchise, votre détermination et votre rigueur pour le travail bien fait.

Vous nous avez impressionnés par l'aspect logique de vos raisonnements et surtout de vos qualités humaines.

Soyez-en remercié chère maitre pour l'effort sans cesse que vous déployez pour la lutte contre la tuberculose au Mali.

A NOTRE MAITRE ET MEMBRE DU JURY

Dr. Mohamed AG BARAKA

- **Pharmacien microbiologiste ;**
- **Maitre-assistant en Bactériologie-virologie à la faculté de Pharmacie ;**
- **Enseignant-chercheur à l'INSP.**

Cher maître,

Nous éprouvons beaucoup de joie à vous compter dans ce jury de thèse.

La qualité de votre contribution fut précieuse et inestimable pour parfaire ce travail.

Je vous prie de bien vouloir trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

A NOTRE MAITRE ET CO-DIRECTEUR DE THESE

Pr Ibrehima GUINDO

- **Pharmacien microbiologiste ;**
- **Chef de département de laboratoire de la recherche biomédicale de l'INSP ;**
- **Professeur agrégée en Bactériologie-virologie à la faculté de Pharmacie ;**
- **Point focal de la lutte contre la Résistance Antimicrobienne (RAM) ;**
- **Point focal National Laboratoire Covid 19.**

Cher maitre,

Vous avez été d'un apport indispensable à ce travail par non seulement vos qualités scientifiques mais aussi par votre soutien et encouragement infaillible. Recevez ici cher maitre nos sincères remerciements et profondes grâces.

A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE

Pr Yacouba TOLOBA

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

Honorable Maitre,

C'est un grand honneur, de vous voir nous confier et de diriger ce travail.

Votre abord facile, votre esprit scientifique associé à vos qualités humaines, font de vous un maître admirable.

Veillez agréer cher maitre, l'expression de notre profonde reconnaissance.

SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléotide

ARN : Acide Ribonucléotide

BAAR : Bacille Acido-Alcool-Résistant

B.C.G : Bacille de Calmette et Guérin

BK : Bacille de Koch

CSRéf : Centre de Santé de Référence

CQI : Contrôle de Qualité Interne

DOTS : Stratégie de traitement directement observée

EMB : Ethambutol

EMD : Examen Microscopique Direct

INH, H : Isoniazide

ITL : Infection Tuberculeuse Latente

IFN : Interféron

INFSS : Institut National de Formation en Science de la Santé

INSP : Institut National en Santé publique

LBA : Lavage Broncho alvéolaire

LNR : Laboratoire National de Référence

MR : Multi Résistant

ml : millilitre

mg/kg : milligramme/kilogramme

MTB : *Mycobacterium tuberculosis*

OMS : Organisation mondiale de la Santé

PCR : Réaction en Chaîne de Polymérisation

PNLT : Programme National de Lutte contre la Tuberculose

PZA : Pyrazinamide

CQI : Contrôle de Qualité Interne

RIF : Rifampicine

SNC : Système Nerveux Central

TAR : Traitement Antirétroviral

TDR : Test de Diagnostic Rapide

UICTMR : Union Internationale Contre la Tuberculose et des Maladies Respiratoires

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Les facteurs influençant le risque d'infection et de passage à la tuberculose maladie.....	14
Tableau II: Sites intermédiaires et périphériques évalués	30
Tableau III : Tableau de calcul de la sensibilité et de la spécificité	39
Tableau IV: Evaluation des pratiques de préparation et de conservation au niveau des centres intermédiaires	40
Tableau V : Identification et conservation des colorants au niveau des centres intermédiaires.....	40
Tableau VI : Indicateurs d'utilisation et de conservation au niveau des centres périphériques.....	41
Tableau VII : Contrôle de qualité interne des colorants fraîchement préparés au niveau des centres intermédiaires	42
Tableau VIII : Contrôle de qualité interne des colorants au niveau des centres périphériques.....	43
Tableau IX : Evaluation de la qualité de détection des BAAR des solutions d'auramine des centres intermédiaires	44
Tableau X : Evaluation de la qualité des colorants des laboratoires périphériques	44
Tableau XI : Comparaison du kit Fluo-RAL aux colorants préparés au LNR.....	45
Tableau XII : Résultat de la sensibilité et de la spécificité du kit Fluo RAL.....	46

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Taxonomie des mycobactéries	7
Figure 2 : Mycobactéries	8
Figure 3 : Enveloppes cellulaires des mycobactéries	9
Figure 4 : Transmission aérienne du bacille tuberculeux (18).....	11
Figure 5 : Organisation des follicules tuberculeux.....	12
Figure 6 : Nécrose caséuse.....	12
Figure 7 : Approche du diagnostic de la tuberculose chez l'enfant non infecté par le VIH....	17
Figure 8 : Image d'un bon frottis (Guide technique, Diagnostic de la tuberculose par examen microscopique direct des expectorations dans les pays à faibles revenus).....	20
Figure 9 : Images des BAAR après coloration de ZN à chaud	21
Figure 10 : Images des BAAR après coloration à l'auramine	22
Figure 11 : Kit Fluo-RAL	32
Figure 12 : Microscope primo Star LED.....	33
Figure 13 : GeneXpert	34

Table de matières

1 Objectifs	3
1.1 Objectif général	3
1.2 Objectifs spécifiques	3
2 Généralités sur la tuberculose	4
2.1 Définition	4
2.2 Historique	4
2.3 Epidémiologie	5
2.4 Agent responsable de la tuberculose	7
2.4.1 Classification taxonomique	7
2.4.2 Habitat	8
2.4.3 Caractères bactériologiques	8
2.4.3.1 Morphologie	8
2.4.3.2 Structure de la paroi	8
2.4.3.3 Propriétés tinctoriales	9
2.4.3.4 La résistance des mycobactéries aux agents chimiques	9
2.4.3.5 La sensibilité particulière de Mycobactéries aux antibiotiques	10
2.5 Histoire naturelle	11
2.5.1 Mode de transmission	11
2.5.2 Différentes phases de l'infection	11
2.5.3 Primo-infection	12
2.5.4 La tuberculose latente	13
2.5.5 La tuberculose maladie	13
2.6 La tuberculose chez l'enfant	14
2.7 La tuberculose associée au VIH/SIDA	15
2.8 Diagnostic de la tuberculose	16
2.8.1 Rappels	16
2.8.2 Diagnostic clinique	16
2.8.3 Diagnostic bactériologique de la tuberculose	18
2.8.3.1 Echantillons d'origine pulmonaire	18
2.8.3.2 Echantillons d'origine extra pulmonaire	19
2.9 Prévention	26
2.9.1 Contrôle de l'infection et mesures d'hygiène	26
2.9.2 Chimio prophylaxie	26
2.9.3 Vaccination	26

2.10	Traitement	27
2.10.1	Traitement de la tuberculose sensible	27
2.10.2	Traitement de la tuberculose multi résistante	28
3	Matériels et méthodes	29
3.1	Conception de l'étude.....	29
3.1.1	Type et période d'étude.....	29
3.1.2	Cadre de l'étude	29
3.1.3	Echantillonnage	29
3.2	Matériels	31
3.2.1	Matériel biologique	31
3.2.2	Petits matériels et consommables de laboratoire	31
3.2.3	Réactifs utilisés pour la coloration.....	31
3.2.4	Equipements de laboratoires utilisés	33
3.3	Méthode	34
3.3.1	Collecte des colorants au niveau des sites	34
3.3.2	Préparation des panels	35
3.3.3	Contrôle de qualité des réactifs de coloration collectés	35
3.4	Evaluation du kit de coloration RAL par rapport aux colorants préparés et utilisés au LNR-TB/INSP.....	37
3.4.1	Panels de frottis d'évaluation.....	37
3.4.2	Mode opératoire de coloration à partir du kit Fluo-RAL	37
3.4.3	Interprétation.....	37
3.5	Variables étudiées	38
3.6	Analyses des données	38
4	Résultats	40
4.1	Résultats de l'évaluation des pratiques de préparation et de conservation	40
4.2	Contrôle de qualité interne des colorants fraîchement préparés et en cours d'utilisation	42
4.3	Evaluation de la qualité des solutions prélevées	44
4.4	Evaluation du Kit Fluo-RAL	45
4.4.1	Comparaison de la lecture des frottis tests par charge bacillaire.....	45
4.4.2	Résultat obtenu après modification du temps de décoloration	46
4.4.3	Sensibilité et spécificité du kit Fluo RAL	46
5	Commentaires et discussion	i
5.1	Limites et avantages	i
5.2	Résultats de l'évaluation auprès des centres de préparation et d'utilisation des réactifs de coloration	i

5.2.1 Laboratoires intermédiaires chargés de la préparation des réactifs de coloration	i
5.2.2 Centres périphériques.....	i
5.3 Contrôle de qualité des site intermédiaires	ii
5.4 Contrôle de qualité des districts sanitaires.....	ii
5.5 Comparaison du kit Fluo-RAL	ii
6 Conclusion.....	iv
7 Coloration des frottis.....	ix
8 Interprétation	ix
9 Enregistrement.....	ix
10 Démarches dans les cas de résultats non satisfaisants	x
11 Contrôles négatifs déclarés positifs	x

INTRODUCTION

La tuberculose est une maladie infectieuse due à la bactérie *Mycobacterium* du complexe *tuberculosis* (MTB Complexe) isolé en 1882 par le médecin allemand Robert KOCH (1). Elle touche généralement les poumons (tuberculose pulmonaire) mais peut également toucher d'autres organes (tuberculose extra pulmonaire) À l'échelle mondiale, la tuberculose est la 13^e cause de mortalité et la deuxième due à une maladie infectieuse, derrière la COVID-19 (et avant le SIDA). La tuberculose pulmonaire, forme la plus fréquente, constitue la principale cause de propagation, alors que le défi de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) conformément à l'Objectif de Développement Durable (ODD) est de mettre terme à l'épidémie de tuberculose d'ici 2035 (1).

Selon l'OMS on estime à 9,9 millions le nombre de personnes ayant développé la tuberculose dans le monde en 2020. Cela concerne 5,5 millions d'hommes, 3,3 millions de femmes et 1,1 million d'enfants (1). La tuberculose est présente dans tous les pays et toutes les tranches d'âge sont touchées.

Au Mali on estime 6 922 cas d'incidence de tuberculose (2). C'est une maladie que l'on peut éviter et soigner, cependant l'apport du laboratoire reste indispensable non seulement pour le diagnostic mais également pour le suivi.

L'isolement de la bactérie par culture est la méthode de référence pour le diagnostic. Ce procédé nécessite des conditions de sécurités et reste fastidieux du fait de la croissance lente du *Mycobacterium*. La microscopie pour la recherche de *Mycobacterium*, ou encore bacille tuberculeux encore appelé Bacilles Acido-Alcool Résistants (BAAR) demeure alors la technique la plus utilisée dans les pays en voie de développement bien que les techniques moléculaires de diagnostic rapides comme le GeneXpert soient de plus en plus recommandées par l'OMS. La technique de la microscopie à fluorescence est celle couramment utilisée. Elle fait appel à l'utilisation de colorants traditionnellement préparés à partir de poudres déshydratées par les sites du réseau de laboratoires de la tuberculose.

Contrairement aux réactifs de la coloration de Ziehl Neelsen, la coloration à l'auramine exige une préparation fréquente (mensuellement) de la solution de travail d'auramine. L'auramine présente quelques inconvénients tel que la sensibilité à la lumière diminuant ainsi l'intensité de la fluorescence. Cela peut avoir pour conséquence une baisse de la charge bacillaire et des faux négatifs.

Face à cette exigence de préparation plus fréquente et à la sensibilité de l'auramine à la lumière des sites de préparation intermédiaires ont été désigné dans toutes les régions. Ces sites intermédiaires régionaux sont chargés de la préparation des solutions stocks de colorants pour leur région.

Cependant, certaines difficultés comme

- La non disponibilité d'espace adéquats pour la préparation ;
- Les fréquentes ruptures isolées ou le surstock parce que les besoins de préparation n'ont pas tenu compte de la charge de travail ;
- La non disponibilité de l'eau distillée dans certains sites intermédiaires ;
- La non planification des préparations en vrac en début d'année ;
- La non disponibilité de récipients pour la répartition ;
- La mauvaise conservation des colorants au niveau des laboratoires d'utilisation etc.

Face à ces difficultés, nous nous sommes proposés d'évaluer l'utilisation d'un kit de coloration industriel prêt à l'emploi comme alternative.

Le kit Fluo-RAL peut-il être une bonne alternative comme colorant dans les laboratoires du réseau de microscopie de la tuberculose ?

1 Objectifs

1.1 Objectif général

Evaluer la qualité des réactifs de coloration à fluorescence pour la recherche de BAAR dans le réseau des laboratoires de tuberculose au Mali.

1.2 Objectifs spécifiques

- Décrire les pratiques de préparation et de conservation des réactifs de coloration à fluorescence dans le réseau des laboratoires de tuberculose du Mali ;
- Vérifier l'efficacité des colorants utilisés au niveau du réseau des laboratoires de tuberculose du Mali ;
- Déterminer la performance du kit Fluo-RAL comme alternative à la recherche des Bacilles Acido-Alcool Résistants (BAAR) dans le réseau des laboratoires de tuberculose du Mali.

2 Généralités sur la tuberculose

2.1 Définition

La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse due à une mycobactérie *Mycobacterium tuberculosis*, (bacille de Koch (BK)), qui atteint le plus souvent les poumons (tuberculose pulmonaire) mais qui peut atteindre d'autres organes (tuberculose extra-pulmonaire). Elle se transmet de personne en personne par voie aérienne, à partir des formes respiratoires de la maladie. C'est une maladie habituellement prolongée durant plusieurs mois (3). Contagieuse, avec des signes cliniques variables et arrive en tête des causes de mortalité d'origine infectieuse à l'échelle mondiale, devant le SIDA

2.2 Historique

La paléomicrobiologie a détecté l'agent de la tuberculose dans des squelettes animaux et humains vieux de plusieurs milliers d'années (4). La tuberculose est une maladie très ancienne, mais dont l'unité nosologique et l'étiologie ne furent établies qu'au XIXe siècle. Des preuves d'existence des mycobactéries depuis environ 150 millions d'années ont été rapportées.

Les bacilles de la tuberculose existaient il y a trois millions d'années. La souche originelle serait apparue en Afrique de l'Est, considérée comme le berceau de l'humanité. La maladie serait donc aussi vieille que l'humanité et son expansion à travers le monde serait intimement liée à celle de l'espèce.

Dès l'Antiquité gréco-latine, plusieurs auteurs ont décrit une maladie amaigrissante au long cours, dénommée suivant les uns « phtisie » (pour dépérissement), suivant les autres « tabès ». Hippocrate (Ve – IVe siècle av. J.-C.) puis Galien (IIe siècle apr. J.-C.) et Caelius Aurelianus (Ve siècle) en ont dressé les symptômes, notamment pulmonaires. Arétée de Cappadoce (fin du IIe siècle) en a cependant dressé la description la plus détaillée. Ces descriptions initiales n'ont guère subi de modifications notables jusqu'au début du XIXe siècle.

L'origine de la maladie a été débattue durant l'Antiquité, entre héréditaire ou contagieuse. Plus tard, Avicenne décrira la tuberculose comme uniquement contagieuse.

- En 1733 que Pierre Desault, chirurgien à Bordeaux, fait paraître un Essai sur la phtisie où il affirme notamment que la lésion fondamentale de la phtisie est le tubercule, et est encore un des premiers à signaler la parenté entre la phtisie pulmonaire et les formes ganglionnaires.
- En 1839, le médecin allemand Johann Lukas Schönlein rassemble en une description unifiée les manifestations cliniques disparates de la maladie. Jusqu'alors, « phtisie » et

« tuberculose » étaient souvent considérées comme deux entités, voisines mais distinctes.

- De 1865 à 1868, le médecin Jean-Antoine Villemin reproduit chez les animaux (lapins, cobayes) les lésions de la tuberculose humaine, par inoculation de tissu altéré humain. Il démontra en 1869 que la transmission se fait par voie aérienne.
- En 1882 enfin, à la suite des travaux de Louis Pasteur, Robert Koch met en évidence le bacille tuberculeux à partir de lésions humaines.
- Le 24 mars 1882, il communique d'abord à la Société de Physiologie de Berlin une note sur la recherche et la culture du bacille de la tuberculose ; le 10 avril, il publie dans le Berliner klinische Wochenschrift un mémoire sur l'étiologie de la tuberculose qu'il rapporte à un bacille décelé dans les crachats et les lésions tuberculeuses humaines (4).
- En 1894, Carlo Forlanini met au point la première méthode thérapeutique invasive avec le pneumothorax artificiel intra-pleural : par une injection d'air dans la cavité thoracique, entraînant la rétraction du poumon infecté, il obtient une amélioration de la maladie (5).
- En 1920 fut créée le premier vaccin contre la tuberculose, le bacille bilié de Calmette et Guérin (le BCG) (6).
- En 1943, Waksman découvre enfin la streptomycine qui permet, un an plus tard, la première guérison par antibiotique d'un malade gravement atteint de tuberculose (7).

RAL Diagnostics est une entreprise née en 1916 par deux collaborateurs de Louis PASTEUR, les professeurs Roux et Legroux ainsi que M. Agulhon, directeur de l'industrie Kuhlman. RAL Diagnostics évolue depuis près d'un siècle à l'élaboration des colorants et systèmes dédiés au diagnostic in Vitro. L'entreprise a consacré ces dernières années au développement du premier réactif de coloration spécifiquement conçu pour l'analyse numérique de l'image. Spécialiste de la chimie fine, les laboratoires sont équipés d'une technologie de pointe s'adaptant aux produits de base comme aux formules complexes.

RAL Diagnostic crée en 2007 le Kit Fluo-RAL, cette coloration par fluorescence permet une détection rapide des Bacilles Acido-Alcool Résistants (BAAR).

2.3 Epidémiologie

En 2020, 1,1 million d'enfants ont développé la tuberculose dans le monde. Chez les enfants et les adolescents, la maladie n'est souvent pas reconnue par les prestataires de soins et elle peut être difficile à diagnostiquer et à traiter, parmi tous les nouveaux cas de tuberculose enregistrés en 2020, 86 % sont survenus dans les 30 pays présentant la plus forte charge de la maladie.

Deux tiers des cas sont concentrés dans huit pays, avec l'Inde en tête, suivie de la Chine, de l'Indonésie, des Philippines, du Pakistan, du Nigéria, du Bangladesh et de l'Afrique du Sud. L'incidence de la tuberculose régresse d'environ 2 % par an à l'échelle mondiale. La baisse cumulée entre 2015 et 2020 se chiffre à 11 %, soit un peu plus de la moitié de la cible fixée dans la Stratégie pour mettre fin à la tuberculose, qui visait une réduction de 20 % entre 2015 et 2020 (1).

On estime que le diagnostic et le traitement de la tuberculose ont permis de sauver 66 millions de vies entre 2000 et 2020. Dans le monde, près d'un ménage sur deux touché par la tuberculose doit faire face à des coûts supérieurs à 20 % de ses revenus selon les dernières données des enquêtes nationales sur les coûts de la tuberculose pour les malades. La communauté internationale n'a pas atteint son objectif intermédiaire pour 2020 selon lequel personne, parmi les malades de la tuberculose et leurs familles, ne devrait supporter de coûts catastrophiques liés à la maladie (1). Au total, 1,5 million de personnes sont mortes de la tuberculose en 2020 (dont 214 000 présentaient également une infection à VIH).

D'ici 2022, il faudra 13 milliards de dollars É.-U. chaque année pour la prévention, le diagnostic, le traitement et la prise en charge de la tuberculose en vue d'atteindre l'objectif mondial convenu en 2018 lors de la réunion de haut niveau des Nations Unies sur la tuberculose. Le financement dans les pays à revenu faible et intermédiaire, qui représentent 98 % des cas de tuberculose signalés, est bien loin de répondre aux besoins. En 2020, les dépenses se sont élevées à 5,3 milliards de dollars É.-U., soit moins de la moitié (41 %) de l'objectif mondial (1).

En 2020, le Mali a enregistré 6 922 cas incidents de tuberculose repartis entre les nouveaux cas de tuberculose pulmonaire bactériologiquement confirmés (4500) et cliniquement diagnostiqués (1060), les rechutes (242) et les nouveaux cas de tuberculoses extra pulmonaires (1120). Pour une incidence de 53 cas pour 100 000 habitants estimée par l'OMS (10 885 cas attendus), le Mali a enregistré un gap de 3 963 soit 36,40% de cas manquant (2).

Globalement, le taux de notification est de 34 cas pour 100 000 habitants en 2020 pour l'ensemble du Mali. Le taux le plus faible a été constaté dans la région de Kayes avec 20 cas pour 100 000 habitants et le taux le plus élevé a été observé à Bamako avec 79 cas pour 100 000 habitants. Le taux de détection de 70% a été atteint dans les régions de Tombouctou, Gao et le District de Bamako (2) .

En 2020, le taux de notification reste stationnaire par rapport à 2019 au niveau national respectivement 34 et 35 cas pour cent mille habitants. Il existe des disparités d'une région à une autre. Le taux le plus faible a été enregistré à Ménaka et le plus élevé dans le District de Bamako.

2.4 Agent responsable de la tuberculose

2.4.1 Classification taxonomique

La tuberculose est due à une bactérie de forme bacillaire de la famille des *Mycobacteriaceae* qui ne comporte qu'un seul genre *Mycobacterium*.

Etymologiquement, le terme *Mycobacterium* provient de deux racines empruntées au grec « Myces » pour champignon et « Bakterion » pour petit bâton. Les mycobactéries appartiennent à l'ordre des *Actinomycétales* et à la famille des *Mycobacteriaceae*. Le genre *Mycobacterium*, est caractérisé par sa propriété tinctoriale essentielle : d'où leur appellation de Bacilles Acido-Alcoolo Résistants (BAAR). Mais toutes les bactéries acido-résistantes ne sont pas des mycobactéries. En effet, les *Nocardia*, quelques Actinomycètes et quelques Corynébactéries, sont faiblement acido-résistantes (8). Le genre *Mycobacterium* est subdivisé en trois groupes d'espèces, les espèces de Mycobactéries du complexe *tuberculosis*, les espèces non *tuberculosis* ou Mycobactéries atypiques et l'espèce *leprae* ou bacille de Hansen responsable de la lèpre (8).

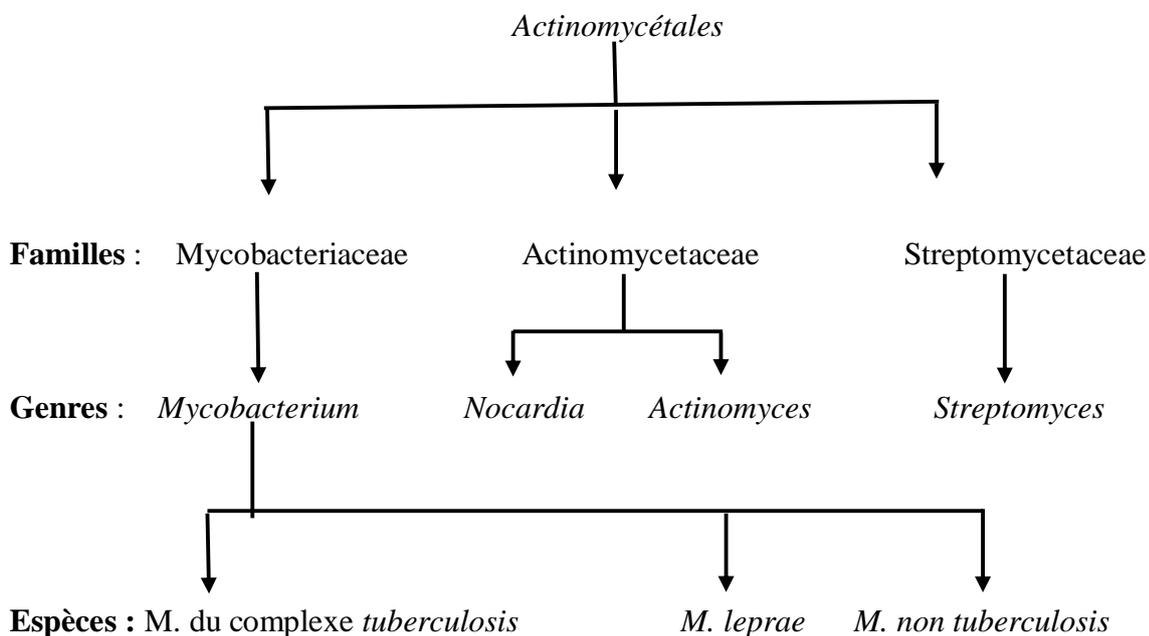


Figure 1 : Taxonomie des mycobactéries

Le complexe *tuberculosis*, comprend en plus de l'espèce humaine, qui est *Mycobacterium tuberculosis*, l'espèce bovine *M. bovis* responsable de la tuberculose bovine, l'espèce *africanum*, forme hybride entre les espèces bovine et humaine, (associée à la maladie

tuberculose en Afrique de l'Ouest), et les espèces *microti*, *canettii*, *caprae*, *pinnipedii*, *orygis*, et *munzi*.

Les espèces *leprae* et *ulcerans* provoquent des maladies chez l'Homme, respectivement la lèpre et l'ulcère de Buruli (8).

Les mycobactéries atypiques ou les mycobactéries non *tuberculosis* (MNT), regroupent de très nombreuses espèces et sous espèces dont les plus fréquemment isolées sont *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. goodii*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*...). Ces mycobactéries environnementales peuvent provoquer des infections mimant les signes de la tuberculose.

2.4.2 Habitat

Les mycobactéries du complexe *tuberculosis* et l'espèce *leprae* ne sont retrouvées que chez des hôtes animaux. Quant aux mycobactéries atypiques, elles sont retrouvées dans l'environnement hydro-tellurique à partir duquel l'homme et les animaux se contaminent (8).

2.4.3 Caractères bactériologiques

2.4.3.1 Morphologie

Les Mycobactéries se présentent sous forme de bacille fin, légèrement incurvé, de 2 à 5 µm de longueur sur 0,2 à 0,3 µm de largeur. Ses extrémités sont arrondies, il est immobile, capsulé, aérobic intra et extracellulaire non sporulé et se présente sous forme isolée ou en petits amas (9).

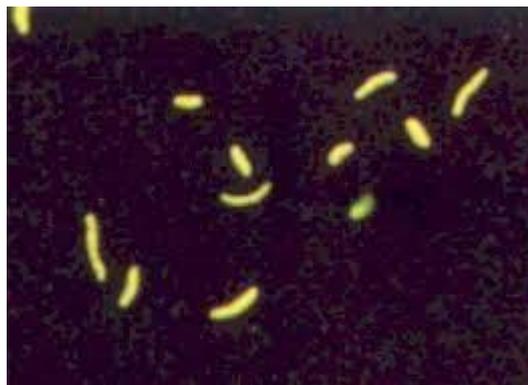


Figure 2 : Mycobactéries

2.4.3.2 Structure de la paroi

Sur le plan structural, les mycobactéries se caractérisent par une paroi riche en lipides (60 % des constituants) et dont la constitution explique, au moins partiellement, les propriétés tinctoriales, la pathogénicité et la résistance à divers antibiotiques. La paroi est constituée de trois couches : la plus interne est formée d'un peptidoglycane sur lequel est fixé un polymère

de molécules d'arabinose et de galactose (arabino-galactane) qui s'attachent par des liaisons esters à des acides mycoliques situés dans la couche intermédiaire (apparaissant comme un espace clair en microscopie électronique). La partie externe de la paroi, est formée d'une matrice de phospholipides, de molécules amphiphiles, de protéines dont certaines sont sans doute des porines et de mycosides (10).

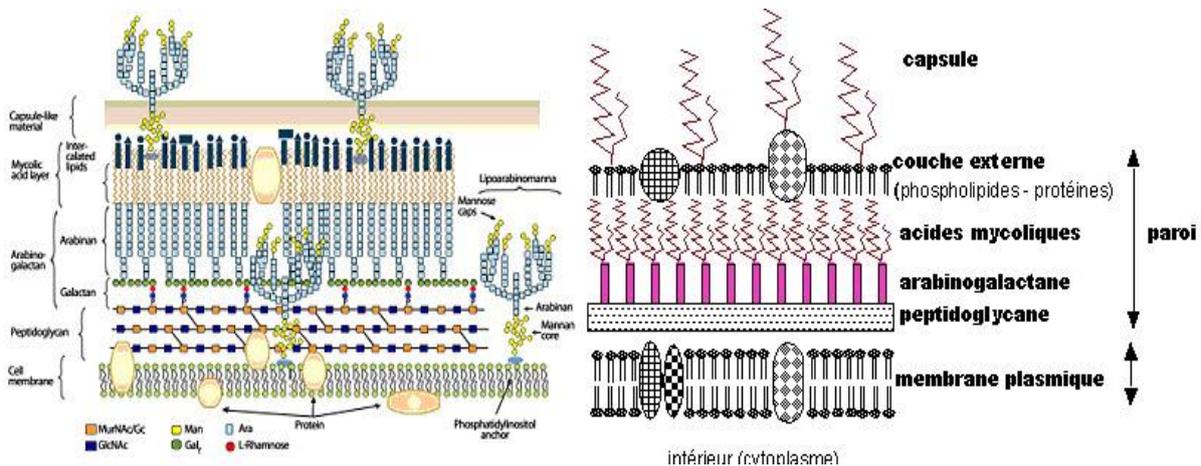


Figure 3 : Enveloppes cellulaires des mycobactéries

Cette complexité de la structure des Mycobactéries explique les propriétés biochimiques, culturales et de résistance aux antibiotiques

2.4.3.3 Propriétés tinctoriales

Les Mycobactéries bien que difficilement colorées par la coloration de Gram sont considérées comme Gram positif. La paroi des mycobactéries possède une structure plus complexe que la paroi des bactéries à Gram positif et sur un frottis coloré par la technique de Gram, les mycobactéries apparaissent souvent comme non colorées. Leur mise en évidence repose sur leur propriété particulière d'acido-alcool-résistante, d'où leur nom de B.A.A.R. (Bacilles Acido-Alcool Résistants) (10).

2.4.3.4 La résistance des mycobactéries aux agents chimiques

Les Mycobactéries sont résistantes aux alcalis (soude), aux acides (sulfurique, chlorhydrique...), les détergents (Lauryl sulfate de sodium, chlorure de cetylpyridinium...). Cette propriété est mise à profit lors de la mise en culture des produits pathologiques pour éliminer les bactéries commensales pouvant être présentes. Ces dernières beaucoup plus sensibles à ces substances sont éliminées après un contact de quelques minutes de l'échantillon

à analyser. C'est sur ce principe que reposent les méthodes de décontamination fluidification préalable nécessaire à la mise en culture des prélèvements contaminés (8).

2.4.3.5 La sensibilité particulière de Mycobactéries aux antibiotiques

Certaines molécules, actives sur les bactéries pyogènes, ne peuvent franchir la barrière hydrophobe de la paroi et ne peuvent atteindre leur cible, c'est par exemple le cas des bêtalactamines. D'autres molécules qui agissent en perturbant le métabolisme lipidique ou l'agencement complexe de la paroi ont une activité sur *Mycobacterium tuberculosis* et sont dénués d'efficacité sur les autres bactéries, c'est le cas par exemple de l'Isoniazide et de l'Ethambutol (8).

2.4.3.6 Caractères biochimiques

M. tuberculosis est aérobie strict. Il est catalase positive, 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* (11).

2.4.3.7 Caractères génétiques

Le génome de *Mycobacterium tuberculosis* a été entièrement séquencé en 1998 (12). Elle possède un chromosome circulaire de 4 411 529 paires de bases (GC%=65,6) pour 3 924 gènes. Un gène particulier semble essentiel au pouvoir pathogène chez l'Homme, gène absent chez le BCG et *Mycobacterium microti*. Il s'agit d'un gène codant une protéine *ESAT-6* (13), sécrétée par la bactérie et déclenchant une forte production d'IFN-Gamma (une cytokine).

2.4.3.8 Caractères cultureux

Selon les espèces, les exigences et le temps de génération des mycobactéries sont variables : les colonies ne sont visibles qu'après un temps d'incubation compris entre 2 jours et 10 semaines à 37°C en aérobose(13). Les colonies n'apparaissent qu'en 21 jours en moyenne avec un temps de division de *M. tuberculosis* de 20 heures. Celui-ci 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 LOWENSTEIN JENSEN. Sur ce milieu il donne des colonies de teinte crème-beige, sèches, à surface rugueuse, en chou-fleur, tout à fait caractéristiques (11).

2.4.3.9 Caractères immunologiques

L'injection intradermique de tuberculine permet de mettre en évidence, chez les sujets sensibilisés, l'existence d'une hypersensibilité de type retardée (8). La détection et la prévention

cibleront des situations d'immunodépression profonde et durable exposant au risque de réactivation. Dans la tuberculose, l'immunité est à médiation cellulaire et non humorale(11).

2.5 Histoire naturelle

2.5.1 Mode de transmission

La tuberculose est avant tout une infection des voies respiratoires. Le tuberculeux est le réservoir de microbes et, partager le même espace de respiration avec un malade infecté est de loin le facteur de risque le plus important de contamination. Le malade « cracheur » émet, en parlant, en toussant, un aérosol de très fines gouttelettes (dropletnucléi ou gouttelettes de Pflugge) dont certaines chargées de quelques bacilles sont mises en suspension dans l'atmosphère (8). Le nombre de gouttelettes infectantes projetées dans l'atmosphère par un malade est très élevé au cours d'un effort de toux (3500) ou d'un éternuement (1 million). Le risque de contagion est d'autant plus important que le contact est étroit, car il est lié à la densité des bacilles dans l'air respiré (14).

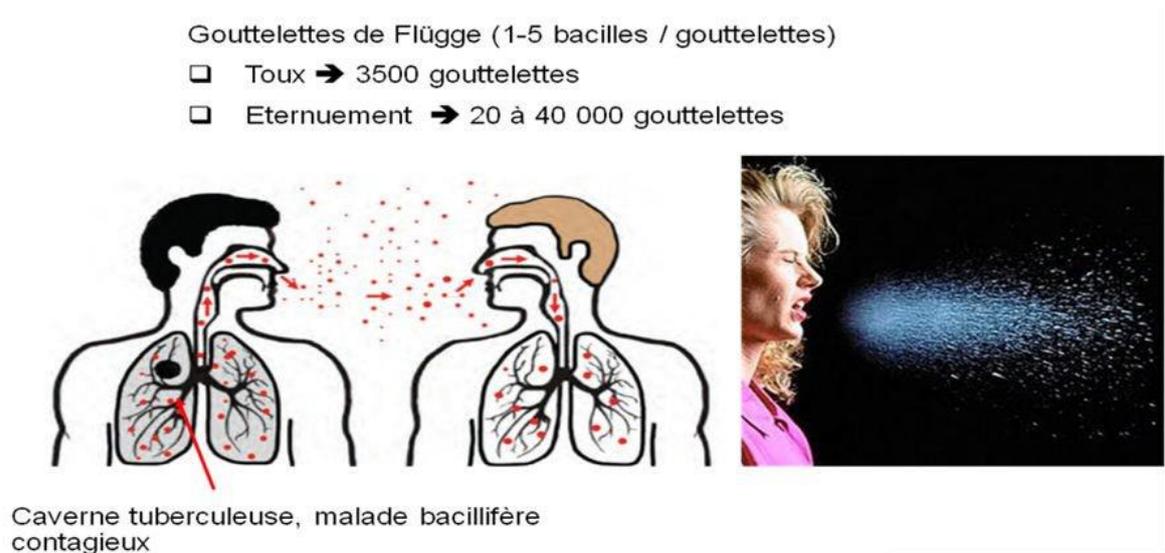


Figure 4 : Transmission aérienne du bacille tuberculeux (14)

2.5.2 Différentes phases de l'infection

L'infection tuberculeuse résulte de la première pénétration de bacille tuberculeux dans un organisme indemne de tout contact antérieur. Dans 90 % des cas, la primo-infection tuberculeuse est cliniquement inapparente, le bacille reste à l'état quiescent. Les sujets présentent alors une infection tuberculeuse latente (ITL) et peuvent développer à plus ou moins long terme une tuberculose maladie (15). Il existe trois (03) phases de l'infection par la tuberculose : la primo-infection, la tuberculose-infection-latente, et la tuberculose-maladie

2.5.3 Primo-infection

Une fois parvenus au niveau des alvéoles pulmonaires, les bacilles déclenchent une réaction inflammatoire et sont phagocytés par les macrophages alvéolaires. Au lieu d'être éliminées, les bactéries se multiplient à l'intérieur des phagocytes (inhibition de la fusion phago-lysosomiale), qui finissent par être lysés. Le foyer infectieux se développe et forme ainsi des follicules tuberculeux détectables par radiographie pulmonaire. A ce stade, les symptômes sont d'intensité variable et la maladie évolue généralement vers la latence, mais elle peut aussi se compliquer en méningite (ou autres atteintes). Les follicules contenant des macrophages géants multinucléés et des bactéries peuvent se nécroser et se transformer en « caséum » (masse solide). Celui-ci peut régresser (évolution vers une guérison) ou persister plusieurs années (10).

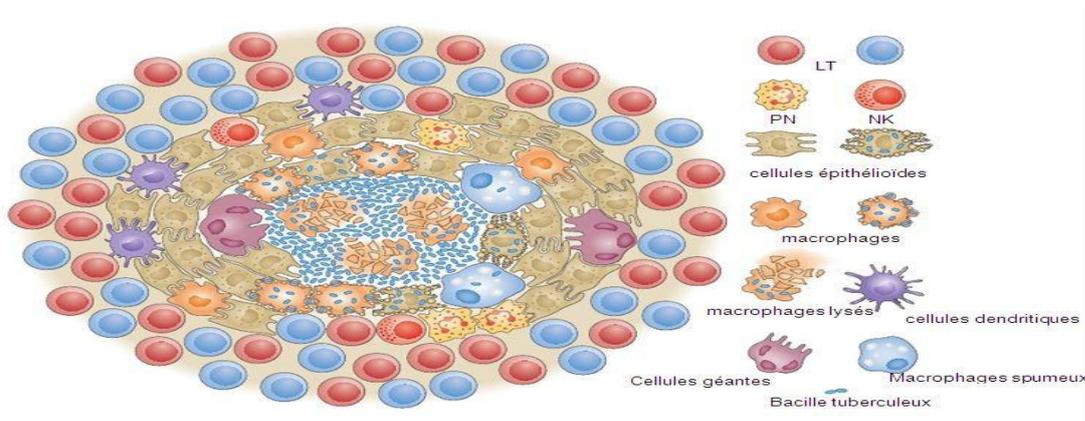


Figure 5 : Organisation des follicules tuberculeux

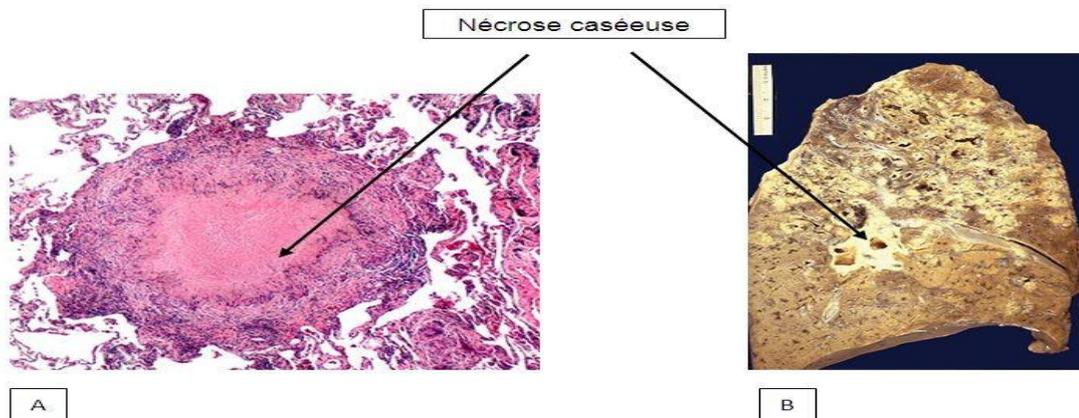


Figure 6 : Nécrose caséuse

2.5.4 La tuberculose latente

Ce foyer initial ou « chancre d'inoculation » est ensuite le siège d'une nécrose caséuse spécifique à la tuberculose. Il existe alors dans ce foyer 1000 à 10000 bacilles qui perdent progressivement leur viabilité et ont une multiplication très ralentie. Quelques bacilles peuvent persister quelques mois ou plusieurs années ; ce sont des « bacilles quiescents » (14). On parle alors d'une infection tuberculeuse latente (ITL). Selon l'OMS, l'ITL se définit comme un état caractérisé par une réponse immunitaire persistante à une stimulation par des antigènes de *Mycobacterium tuberculosis*, sans signes cliniques manifestes de tuberculose active (16). Le diagnostic d'une ITL repose sur le virage des réactions tuberculiques cutanées (IDR à la tuberculine) ou sur la positivité d'un test de détection de l'interféron. Pour parvenir aux objectifs de l'OMS qui sont de réduire le nombre de décès de 95% et le nombre de nouveaux cas de 90% d'ici 2035, il faudrait disposer de nouveaux tests diagnostiques pour prévenir l'émergence d'une tuberculose active parmi les personnes atteintes d'une ITL. En effet, tiers de la population mondiale (soit 2 milliards d'individus) sont considérés comme infecté par le bacille de la tuberculose, dont 5 à 10 % vont évoluer vers une tuberculose maladie. Il est inenvisageable (pour diverses raisons, les plus évidentes étant le coût et les risques de toxicité) de traiter tous les sujets de la planète ayant une ITL. L'identification de marqueurs du risque de passage de l'infection latente à la tuberculose maladie, permettant une intervention thérapeutique plus ciblée, serait donc très utile dans la lutte antituberculeuse (15).

2.5.5 La tuberculose maladie

Chez certains malades, au niveau pulmonaire, le caséum du follicule se ramollit, sous l'action de facteurs inconnus provoquant une réaction d'hypersensibilité exagérée, créant une « caverne » par évacuation du contenu dans le poumon. Les bacilles, jusqu'alors quiescents, retrouvent une bonne oxygénation se multiplient activement. La guérison est rare à ce stade et le malade est extrêmement contagieux. Les bacilles peuvent ensuite coloniser de nombreux sites de l'organisme (10). La tuberculose pulmonaire survient chez un sujet précédemment infecté en cas de contage massif et/ou de déficience immunitaire par l'un des trois mécanismes suivants :

- Soit de manière rare par aggravation progressive du foyer initial de la primo-infection ;
- Soit par réactivation endogène de bacilles restés quiescents après la primo-infection. En l'absence de traitement et d'immunodéficience ce risque a été estimé entre 5 et 10% dans les 3 à 5 ans qui suivent la primo-infection, et à 5% pour le reste de la vie ;
- Soit par réinfection exogène : les bacilles à l'origine de cette tuberculose proviennent d'une nouvelle contamination (9).

Tableau I: Les facteurs influençant le risque d'infection et de passage à la tuberculose maladie.

	Facteurs augmentant le risque d'infection	Facteurs augmentant le risque de progression vers la maladie
Lié au contamineur	Bacilloscopie : > 100 bacilles /champ, cavernes ; tabagisme.	
Liés à l'enfant	<ul style="list-style-type: none"> - Mauvaises conditions socioéconomiques ; - Lien familial de premier degré avec le contamineur ; <p>Tabagisme passif ou Actif.</p>	<p>Age < 5 ans, risque majeur avant 2 ans ;</p> <ul style="list-style-type: none"> - Immunodépression (acquise, congénitale ou médicamenteuse) - Insuffisance rénale ; - Diabète.
Lié aux conditions d'exposition	<ul style="list-style-type: none"> - Durée ; - Répétition ; - Confinement ; - Proximité nocturne (même domicile+, même chambre++, même lit+++). 	
Lié au statut clinique du malade		<p>Diabète ;</p> <p>Coïnfection TB/VIH.</p>

2.6 La tuberculose chez l'enfant

Tout enfant infecté par *M. tuberculosis* est susceptible de développer la tuberculose et chez la plupart d'entre eux, la maladie apparaît dans l'année qui suit l'infection. C'est pourquoi il est important de dresser un historique des contacts, et cela explique aussi pourquoi la charge de la tuberculose chez les enfants est le reflet d'une transmission persistante au sein d'une population (17). Parmi les facteurs de risque d'une apparition de la maladie suite à l'infection figurent le bas âge (moins de trois ans) et l'immunodéficience (due par exemple à une infection par le VIH, à la rougeole ou à une malnutrition sévère). L'adolescence constitue une autre période de risque accru d'apparition de la maladie. Le passage de l'infection à la maladie est marqué par l'apparition des symptômes. Le type de tuberculose le plus courant chez l'enfant est la tuberculose pulmonaire, le plus souvent à frottis négatif. La tuberculose extra pulmonaire

représente environ 20 à 30 % des cas pédiatriques, l'adénite tuberculeuse et l'épanchement pleural tuberculeux en sont les formes les plus courantes. La présentation de la tuberculose chez les enfants dépend de l'âge et de la réponse immunitaire. Les nourrissons et les jeunes enfants sont particulièrement sujets aux formes graves, disséminées et souvent mortelles de la maladie, pouvant se présenter sous forme de méningite tuberculeuse ou de tuberculose miliaire (17). Les adolescents présentent un risque particulier de contracter la tuberculose de type adulte (c'est-à-dire une forme de la maladie qui est souvent fortement contagieuse et à frottis positif). Le diagnostic de la tuberculose est établi de manière analogue chez les enfants séropositifs pour le VIH et chez les enfants séronégatifs d'un âge comparable (17). La plupart des difficultés à poser un diagnostic clinique chez l'enfant proviennent de la diversité des présentations cliniques de la tuberculose infantile, qui sont relativement peu spécifiques, qui sont dues en partie à un système immunitaire immature et à la mauvaise performance des tests microbiologiques traditionnels chez l'enfant (18).

2.7 La tuberculose associée au VIH/SIDA

L'infection par le VIH entraîne une destruction très étendue des mécanismes de défense de l'organisme humain. Par conséquent, l'infection à VIH a un effet amplificateur sur la tuberculose, le risque qu'une ITL évolue en tuberculose active est de 100 fois plus élevé chez les personnes coinfectedées par le VIH et l'ITL (19). Ces effets peuvent s'expliquer par les faits suivants :

- Elle favorise l'apparition de la tuberculose évolutive des infections récentes (tuberculose primaire) ;
- Elle accélère le développement vers la tuberculose évolutive des infections latentes ;
- Elle augmente les formes pulmonaires à frottis négatif et les formes extra pulmonaires.

Par ailleurs la tuberculose accélère l'évolution de l'infection à VIH dont elle est la première infection opportuniste mortelle (20).

Comme chez l'adulte, l'évolution de la tuberculose dépend du stade de l'infection par le VIH. Au stade précoce, lorsque l'immunité est encore bonne (nombre de CD4 supérieur à 200 par mm³), les symptômes sont similaires à ceux rencontrés chez un enfant non infecté par le VIH. A mesure que l'immunité décline (nombre de CD4 inférieur à 200 par mm³), les formes disséminées sont plus fréquentes, telles que la méningite tuberculeuse, la tuberculose miliaire ou ganglionnaire.

2.8 Diagnostic de la tuberculose

2.8.1 Rappels

La confirmation de la tuberculose chez un patient qui présente des symptômes ou des signes évocateurs de la tuberculose appelé cas présumé de tuberculose (auparavant cas suspect) est faite avec des preuves bactériologiques ou cliniques (21).

Un cas de tuberculose est dit bactériologiquement confirmé lorsque la positivité de l'échantillon biologique est établie par examen microscopique, mise en culture ou test de diagnostic rapide (TDR) approuvé par l'OMS ;

Un cas de tuberculose est dit cliniquement diagnostiqué chez un sujet qui ne remplit pas les critères de confirmation bactériologique, mais chez qui la forme évolutive a été diagnostiquée par un clinicien ou un autre praticien médical, lequel a décidé de mettre en place un traitement antituberculeux complet. Il s'agit des cas diagnostiqués sur la base d'anomalies radiographiques ou d'une histologie évocatrice et les cas extra pulmonaires non confirmés en laboratoire (21).

2.8.2 Diagnostic clinique

La tuberculose active prend principalement la forme pulmonaire et peut être soit primaire ou secondaire. La forme primitive survient peu de temps après l'infection initiale, alors que la tuberculose secondaire touche la personne précédemment infectée à la suite d'une réactivation endogène d'une infection latente ou d'une réinfection exogène. Une fois active, l'évolution de la tuberculose pulmonaire est très variable et les symptômes peuvent aller d'une toux légère et persistante insidieuse à un syndrome de type pneumonie aiguë, à un processus débilitant continu caractérisé par une toux chronique, une hémoptysie, des fièvres, des sueurs nocturnes et une perte de poids (22). Cependant, certains patients atteints de tuberculose active peuvent être asymptomatiques, surtout chez les jeunes enfants que chez les plus âgés. Quant à l'infection latente, elle ne présente aucune manifestation clinique et n'est ni contagieuse ni nocive.

Le dépistage systématique d'une tuberculose contagieuse de l'adulte, est porté :

- Sur la notion de contact avec un malade en phase active : critère déterminant ;
- Au stade d'infection tuberculeuse latente sur l'Intradermo réaction (IDR) à la tuberculine > 10 mm en l'absence de cicatrice de BCG. Une vaccination par le BCG à la naissance n'interfère pas avec l'interprétation des réactions tuberculiques après 3 ans ;
- au stade de tuberculose maladie sur la symptomatologie (fièvre, toux, perte de poids) : primo infection symptomatique fébrile, tuberculose pulmonaire ou extra-pulmonaire (adénopathies, localisations neurologiques, squelettiques, péritonéale, péricardique), chez l'enfant infecté par le VIH sur la clinique et les images radiologiques (miliaire, adénopathies périphériques, tuberculose des séreuses) avec IDR négative (15).

Quant à l'enfant, le diagnostic clinique demeure plus difficile à cause d'une spécificité faible des signes cliniques de la maladie et de l'association avec l'état immunitaire et la malnutrition.

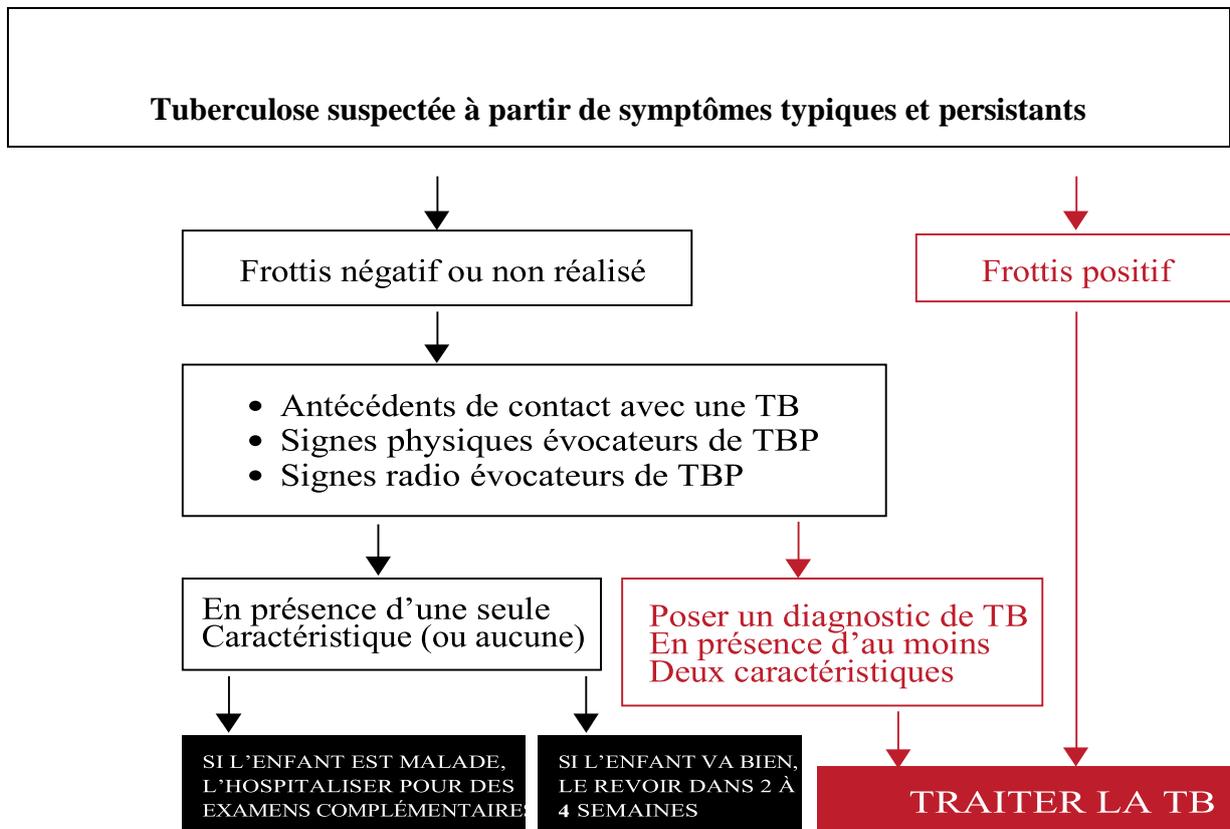


Figure 7 : Approche du diagnostic de la tuberculose chez l'enfant non infecté par le VIH.

L'examen physique est important dans le diagnostic de la tuberculose extra-pulmonaire. La présentation clinique de la tuberculose extra-pulmonaire est souvent trompeuse, ce qui entraîne un retard de diagnostic. Les signes cliniques sont variables et dépendent de la localisation de la maladie qui peut être lymphatique majoritairement et les autres formes incluent les formes pleurale, méningée, péricardique, osseuse, gastro-intestinale, génito-urinaire (22).

Les examens complémentaires pour le diagnostic clinique sont :

Les tests immunologiques explorant la réponse immune d'hypersensibilité retardée à médiation cellulaire induite par *M. tuberculosis* : l'intradermoréaction (IDR) à la tuberculine qui mesure la réponse in vivo et le test de libération de l'interféron (IFR) gamma (IGRA, pour IFR-gamma release assay) qui mesure la réponse in vitro. Les tests IDR à la tuberculine ou test de Mantoux et QuantiFERON TB (test de détection de l'interféron- γ) sont indiqués dans le diagnostic d'une tuberculose latente (ou infectieuse) mais doivent être associées à d'autres examens.

Ils sont utilisés :

- Pour le diagnostic de primo-infection après contact avec un cas de tuberculose infectieuse ;
- Lors du bilan initial de tout patient VIH en vue d'un éventuel traitement préventif ;
- Lors de l'examen d'embauche du personnel professionnellement exposé à la tuberculose afin d'avoir une base de comparaison avec des tests ultérieurs ;
- A titre de dépistage systématique chez les enfants provenant de pays à forte endémie tuberculeuse (23).

La radiographie pulmonaire qui est utile pour le diagnostic de la tuberculose chez les enfants mais les images sont difficiles à interpréter, ne sont pas spécifiques et ne doivent jamais constituer, à elles seules, le diagnostic ;

- La laparoscopie ou la laparotomie pour l'exploration et la confirmation histologique après biopsie péritonéale ;
- L'échocardiographie utilisée comme outil non invasif pour guider l'aspiration de fluide en cas de tuberculose péricardique ;
- L'imagerie tomodensitométrique ou scanner peut révéler des caractéristiques radiologiques de l'ascite, des lésions péritonéales et des adénopathies ;
- L'urographie intraveineuse (UIV) est un examen radiologique utile, présentant souvent des caractéristiques typiques compatibles à la tuberculose génito-urinaire ;
- La radiographie standard ou par imagerie par résonance magnétique (IRM) de la colonne vertébrale pour la tuberculose vertébrale ou spondylarthrite tuberculeuse.

2.8.3 Diagnostic bactériologique de la tuberculose

Le diagnostic de la tuberculose au laboratoire se fait par la mise en évidence de BAAR dans le prélèvement après lecture au microscope et du bacille tuberculeux par culture ou par biologie moléculaire. La multiplication des sites bacillaires impose la recherche de BAAR dans une grande variété de prélèvements classés selon leur origine, pulmonaire ou extra pulmonaire.

2.8.3.1 Echantillons d'origine pulmonaire

➤ Les expectorations ou crachats

Les expectorations sont des produits pathologiques provenant des voies broncho-pulmonaires et aériennes supérieures expulsées spontanément par la bouche, ou au cours d'un effort de toux. Elles constituent le prélèvement le plus utilisé pour le diagnostic de la tuberculose à cause de sa facilité d'obtention. Pour poser le diagnostic d'une tuberculose, 2 échantillons de crachats sont collectés auprès du malade.

➤ **Le liquide de tubage gastrique**

Le tubage gastrique est réalisé chez les personnes qui présentent des difficultés à expectorer particulièrement chez les enfants. Il se fait en milieu hospitalisé à l'aide d'une sonde nasogastrique chez un malade alité et à jeun afin de recueillir les crachats déglutis au niveau de l'estomac. Comme pour le crachat, 2 échantillons du liquide de tubage gastrique sont requis.

➤ **Les prélèvements sous fibroscopie**

L'aspiration bronchique, le brossage bronchique et le lavage broncho-alvéolaire sont obtenus sous contrôle visuel grâce à l'introduction d'un fibroscope permettant de réaliser des prélèvements au niveau des lésions, dilués dans l'eau stérile et recueillis dans un flacon stérile. Au laboratoire, si leur volume le nécessite, ils sont centrifugés puis traités comme un crachat (8).

2.8.3.2 Echantillons d'origine extra pulmonaire

Divers prélèvements sont utilisés pour le diagnostic de la tuberculose extra pulmonaire recueillis des différents organes pouvant être touchés par le bacille tuberculeux dont :

- Les urines prélevées le matin au réveil trois jours de suite,
- Les abcès, les lésions cutanées et des tissus divers
- Les liquides d'épanchement (liquides pleural, péricardique, péritonéal)
- Le liquide céphalorachidien etc.

2.8.3.3 La microscopie à la recherche de BAAR

L'examen microscopique à la recherche des BAAR est la première étape du diagnostic bactériologique de la tuberculose et parfois la seule dans les pays en développement. Elle se base sur la propriété d'acido-alcool-résistance des mycobactéries, c'est à dire leur capacité à former des complexes stables avec des colorants basiques, fuchsine ou fluorochromes phéniqués, qui persistent malgré la double action de l'alcool et des acides forts dilués (8). Elle est effectuée après étalement du produit pathologique qu'il soit d'origine pulmonaire ou extra-pulmonaire sur une lame suivi de la coloration du frottis confectionné.

➤ **Confection des frottis**

Les frottis sont confectionnés à partir de la partie purulente ou muqueuse quand il s'agit des expectorations. Pour les liquides une goutte du prélèvement ou du culot après centrifugation du prélèvement est étalée sur la lame. L'étalement se fait en mouvements de rotation régulière de manière à obtenir un frottis dont les dimensions recommandées sont de 20 mm sur 10 mm. Après l'étalement, le frottis est séché à l'air puis fixés.

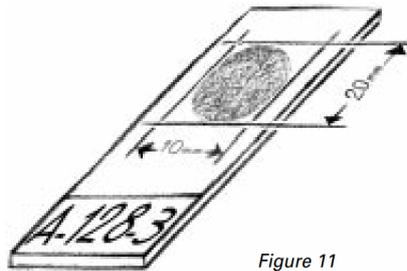


Figure 11

Figure 8 : Image d'un bon frottis (Guide technique, Diagnostic de la tuberculose par examen microscopique direct des expectorations dans les pays à faibles revenus)

- Méthodes de coloration

Il existe plusieurs méthodes de coloration du bacille de la tuberculose et il est important que la méthode ou les méthodes utilisées soient standardisées au niveau de chaque pays. Les méthodes de coloration les plus utilisées sont la méthode de Ziehl-Neelsen (ZN) à chaud utilisant la fuchsine phéniquée et la méthode utilisant les colorants fluorescents tels que l'auramine ou la rhodamine. La coloration de ZN à chaud est la technique de référence et permet une facilité de reconnaissance du bacille.

Selon les pratiques du pays, les laboratoires utilisent des colorants préparés à partir de poudre déshydratée ou des kits industriels prêts à l'emploi.

- Principe et méthodes de coloration

Pour mettre en évidence les mycobactéries, les méthodes de coloration se basent sur leur propriété d'acido-alcool-résistante, c'est à dire leur capacité à former des complexes stables avec des colorants basiques, fuchsine ou fluorochromes phéniqués, qui persistent malgré la double action de l'alcool et des acides forts dilués.

Il existe plusieurs méthodes de coloration du bacille de la tuberculose et il est important que la méthode ou les méthodes utilisées soient standardisées au niveau de chaque pays. Les méthodes de coloration les plus utilisées sont la méthode de Ziehl-Neelsen à chaud utilisant la fuchsine et la méthode utilisant les colorants fluorescents tels que l'auramine et la rhodamine.

- Lecture des frottis colorés au microscope

Approximativement, 40 à 50% des patients ayant une tuberculose pulmonaire ont un frottis positif. En effet, un crachat doit contenir plus de 1.000 bacilles (5000-10000/ml) par millilitre de crachats pour avoir 60% de chance d'identifier les bacilles et 10.000 ou davantage pour que cette chance soit de 95% (24).

Après coloration par la fuchsine, le frottis est lu à l'aide d'un microscope ordinaire à lumière transmise.

Les BAAR apparaissent rouges sur fond bleu, sous forme de fins bâtonnets droits ou légèrement incurvés de 2 à 4 µm de long sur 0.3 à 0.5 µm de large, isolés, en forme de V ou en touffes.

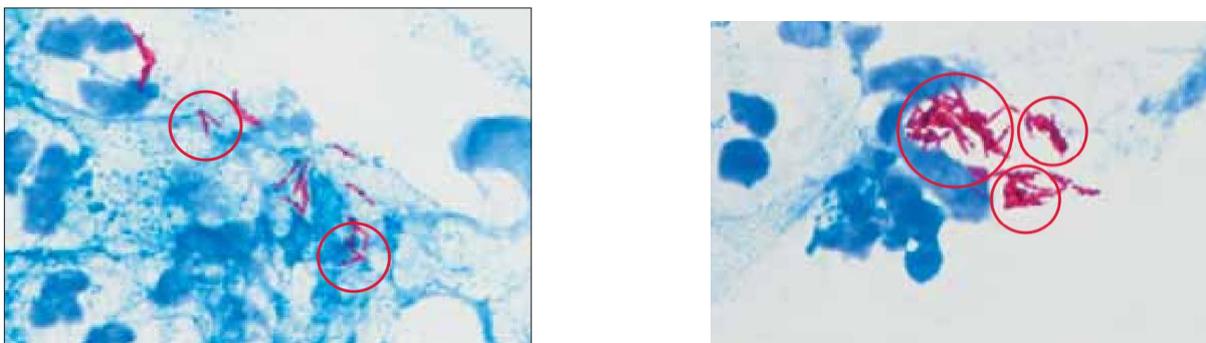


Figure 9 : Images des BAAR après coloration de ZN à chaud

Après coloration avec des fluorochromes (auramine ou rhodamine) les frottis sont lus au microscope à fluorescence LED. La méthode à fluorescence LED a été évaluée en 2009 en suivant les normes internationales et en 2011, l'OMS a recommandé que la microscopie à fluorescence conventionnelle soit remplacée par la microscopie à LED avec la coloration à l'auramine dans tous les contextes où la microscopie à fluorescence est actuellement utilisée. Cette méthode augmenterait la sensibilité de 10% par rapport à la microscopie ordinaire et permettrait une lecture entre 3 et 4 fois plus rapide des frottis. Après coloration à l'auramine, les BAAR apparaissent verts, jaunâtres et se présentent sous forme de bacilles longs et minces, légèrement incurvés ou sous formes de larges touffes.



Figure 10 : Images des BAAR après coloration à l'auramine

- Limites de la microscopie

Le taux de détection de la tuberculose contagieuse à l'examen microscopique reste faible, surtout chez les enfants en raison de la difficulté d'obtenir des échantillons de qualité et de leur pauvreté en bacilles. L'examen microscopique indique que des BAAR sont présents dans l'échantillon mais n'indique ni leur viabilité ni s'ils sont des bacilles du complexe *tuberculosis*. Les malades à microscopie négative et culture positive semblent être responsables d'environ 17% de transmission de la tuberculose.

2.8.3.4 Culture

La culture permet de poser le diagnostic de certitude de la tuberculose en isolant *M. tuberculosis* et en déterminant sa sensibilité aux antituberculeux et demeure la technique de référence. Elle permet de différencier *M. tuberculosis* des mycobactéries atypiques. La culture détecte plus de bacilles à partir des prélèvements pauci bacillaires que la microscopie et augmenterait ainsi le nombre des cas de tuberculose de 20 à 50% selon l'incidence locale. La sensibilité de la culture peut aller au-delà de 98% (22). Elle est l'examen idéal pour le suivi du traitement.

Deux types de milieux de culture sont utilisés :

- Les Milieux solides : il s'agit du milieu de culture de Löwenstein-Jensen (favorable à la détection de l'espèce *tuberculosis*) ou son variant enrichi avec du pyruvate de sodium (favorable aux espèces *bovis* et *africanum*), le milieu de Coletsos (pour les mycobactéries non *tuberculosis*) plus rarement le milieu solide de Middlebrook (pour l'obtention de souches pures).
- Le Milieu liquide de MGIT (Mycobacterium Growth Indicator Tube) qui est plus rapide et plus sensible que le milieu solide de LJ.

L'isolement des BAAR en culture, quel que soit le prélèvement est long et peut prendre 2 à 6 semaines souvent jusqu'à plus de 8 semaines pour aboutir à une culture positive

2.8.3.5 Diagnostic moléculaire

➤ Principe

Elle consiste après la dénaturation à haute température (94°C) de l'ADN double brins pour obtenir deux brins séparés, à faire plusieurs cycles (20 à 40 dépendant de la nature de l'échantillon) d'une succession de trois processus à température différente, la dénaturation à 94°C, l'hybridation avec des amorces ou séquences nucléotidiques courtes spécifiques de la région de l'ADN de *M. tuberculosis* qu'on veut amplifier, à température variante entre 55°C et 60°C selon le cas et l'élongation à l'aide d'une enzyme polymérase (Ampli Taq ADN polymérase) qui agit à 72°C en ajoutant les quatre désoxyribonucléotides : dATP (désoxyadéninetriphosphate) dCTP, dGTP et dTTP. Le fragment amplifié est ensuite détecté soit par migration dans un gel d'agarose suivi de sa visualisation aux ultra-violets (UV) par fluorescence, soit par de méthode où le produit amplifié est hybridé à une sonde nucléotidique complémentaire et ce complexe révélé par chimioluminescence ou par réaction enzymatique.

La détermination rapide de la présence du génome bactérien par les méthodes d'amplification de l'ADN constitue un progrès récent dans le diagnostic de la tuberculose mais ne représente pas encore la méthode de référence. En effet, les méthodes d'amplification sont en général positives dans les cas où la microscopie de l'expectoration est lui-même positif, mais la sensibilité de la technique reste imparfaite, de l'ordre de 60 à 70%, dans les cas où l'examen microscopique est négatif (25). Dans les cas graves de tuberculose, où l'établissement rapide d'un diagnostic et la mise immédiate sous traitement antituberculeux sont impératifs, par exemple dans un cas de méningite tuberculeuse, une technique d'amplification permet cependant dans quelques cas de gagner du temps en révélant la présence du bacille devant un examen microscopique négatif.

Les techniques d'amplification permettent de déterminer aussi si les mycobactéries visibles à la microscopie font partie du complexe *tuberculosis* ou s'il s'agit d'une mycobactérie non tuberculeuse (26). Deux tests sont couramment utilisés pour le diagnostic moléculaire de la tuberculose et sont recommandés par l'OMS, il s'agit des technologies TB-LAMP et Xpert MTB/RIF. Les méthodes d'amplification du génome de *M. tuberculosis* par des techniques PCR sont utilisées en plus du diagnostic rapide de la tuberculose mais aussi pour la détection rapide de la résistance aux antituberculeux.

➤ **Le test TB-LAMP**

Il est basé sur l'amplification isotherme induite par boucle (LAMP) qui est une méthode d'amplification de l'ADN unique, indépendante de la température et facile à lire dont les résultats s'affichent sous un format facile à lire. C'est une technique robuste, utilisable dans les centres périphériques et recommandé par l'OMS en diagnostic initial pour tous les groupes de patients quand le système GeneXpert n'est pas présent. Il détecte en plus 15% des cas de tuberculose à microscopie négative.

➤ **Le test moléculaire Line-Probe Assay ou test d'hybridation inverse sur bandelettes**

Le test LPA est basé sur l'extraction de l'ADN à partir d'isolats de *M. tuberculosis* ou directement à partir d'échantillons cliniques, suivie de l'amplification par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) de la région du gène en question qui détermine la résistance à l'aide d'amorces biotinylées. Après amplification, les produits de PCR marqués sont hybridés avec des sondes Oligo-nucléotidiques spécifiques immobilisées sur une bande. Les hybrides marqués capturés sont détectés par développement colorimétrique, ce qui permet de détecter la présence du complexe *M. tuberculosis*, ainsi que des sondes de résistance de type sauvage et de mutation. Si une mutation est présente dans l'une des régions cibles, l'amplicon ne s'hybridera pas avec la sonde correspondante. Les mutations sont donc détectées par manque de liaison aux sondes de type sauvage, ainsi que par liaison à des sondes spécifiques pour les mutations les plus courantes. La réaction post-hybridation conduit au développement de bandes colorées sur la bandelette au site de liaison de la sonde et est observée à l'œil nu (27).

Selon le kit utilisé, il permet de poser le diagnostic de la tuberculose et de la tuberculose multi-résistante et l'évaluation rapide de la résistance aux médicaments de deuxième intention parmi les patients atteints de tuberculose résistante à la rifampicine et de tuberculose-MR (28). Il permet aussi l'identification des espèces communes de mycobactéries atypiques.

➤ **Le test Xpert MTB/RIF de la plateforme GeneXpert**

Le GeneXpertDx System est composé d'un appareil, d'un ordinateur, d'un lecteur de code-barres et d'un logiciel préchargé pour effectuer des tests sur des échantillons prélevés et afficher les résultats. Le système requiert l'utilisation de cartouches jetables à usage unique qui contiennent les réactifs pour effectuer une procédure PCR.

Il permet la détection simultanée de *M. tuberculosis* et des mutations associées à la résistance à la rifampicine grâce à la PCR en temps réel avec détection en simultanée de plusieurs cibles (PCR multiplex) en deux heures. Le Xpert MTB/RIF est un test semi-quantitatif qui utilise comme principe la PCR avec amplification nichée en temps réel. La cible est le gène *rpoB* qui

est responsable de la résistance à la rifampicine en cas de mutation(s) sur le bacille tuberculeux. Ce gène est ensuite amplifié avec 5 sondes ciblant la séquence non mutée du gène rpoB. En absence de mutation, il n'y a pas d'hybridation d'une ou des sondes. La 6^e sonde incorporée ou contrôle Interne (SPC) sert de contrôle du traitement de l'échantillon. Le test Xpert MTB/RIF permet de détecter simultanément 6 fluorochromes pour diagnostiquer la tuberculose et la sensibilité à la rifampicine. La résistance à la rifampicine est un très bon marqueur de diagnostic de la TB-MR étant associée à celle de l'Isoniazide dans 98,4% des cas (association définissant la multi résistance TBMR) (15).

Selon les hypothèses en 2020, le test Xpert MTB/RIF sera délivré en tant que test diagnostique initial à toutes les personnes vivant avec le VIH et présentant des signes ou des symptômes de la tuberculose, à 100 % des enfants manifestant de tels signes ou de tels symptômes, à 100 % des personnes à risque atteints d'une tuberculose-MR, à 80 % des adultes séronégatifs non traités antérieurement présentant de tels signes ou symptômes et à 100 % des nouveaux cas de tuberculose en tant que test de pharmacosensibilité (29).

La recommandation avec réserve reconnaissant les limites diagnostiques et les implications majeures au niveau des ressources concerne :

- Les adultes qui n'ont pas de risque de développer une TB-MR ou une tuberculose associée au VIH ;
- Devant une radiographie et ou une clinique évocatrices associées à au moins une série de recherche de BAAR négative.

➤ **Limite des tests moléculaires**

Les tests moléculaires y compris le test Xpert MTB/RIF ne sont pas recommandés pour le suivi du traitement parce qu'ils détectent l'ADN des bacilles vivants et non vivants. Il s'agit donc de tests de diagnostic et non de suivi de l'efficacité du traitement. Il est donc important de retenir qu'il n'élimine pas la nécessité des examens classiques, microscopie, culture et détermination de la pharmacosensibilité, requis pour suivre les progrès du traitement.

2.8.3.6 Organisation du réseau de la tuberculose au Mali :

Le Programme National de Lutte contre la Tuberculose, coordonnée par la cellule sectorielle de lutte contre le VIH/SIDA, la tuberculose et les hépatites virales du ministère de la santé et du développement social est entièrement intégrée dans le système de santé à tous les niveaux.

Le réseau des laboratoires coordonné est constitué de 87 laboratoires fonctionnels dont 66 de CSRef, 18 de CSCom 2 de structures privées. Ces laboratoires sont organisés en laboratoires intermédiaires et en laboratoires périphériques. Les laboratoires du niveau intermédiaire sont

chargés de la 1ère relecture dans le cadre du Contrôle de Qualité Externe et de la préparation des colorants. Les laboratoires intermédiaires sont situés au niveau du Centre de Diagnostic et de Traitement de la tuberculose (CSRef) du chef-lieu des régions de Kayes, Koulikoro, Sikasso, Ségou, Mopti, Tombouctou et Gao.

2.9 Prévention

2.9.1 Contrôle de l'infection et mesures d'hygiène

La prévention de la tuberculose passe en premier lieu par un diagnostic précoce, un traitement adapté et l'application des mesures d'hygiène visant à réduire le risque de transmission.

- Exiger l'isolement des tuberculeux contagieux des autres malades ;
- Education de la transmission de tuberculose, sans stigmatiser les tuberculeux ;
- Encourager une bonne hygiène de la toux ;
- Assurer une ventilation naturelle et lumière du soleil dans le centre anti-tuberculose (20).

2.9.2 Chimio prophylaxie

Le risque de tuberculose nosocomiale est réel chez le VIH positif. Le traitement préventif de la tuberculose, qui est identique à celui de l'infection latente, est recommandé chez les sujets infectés par le VIH, ayant une IDR à la tuberculine positive et qui ne sont pas atteints de tuberculose évolutive. Le médicament de référence est l'INH en raison de 5 mg/kg/j pendant 6 à 9 mois. Le traitement préventif réduit le risque d'apparition de la tuberculose évolutive à court terme de 40% par rapport à ce qu'il aurait été sans le traitement (15). La chimio prophylaxie à l'INH est aussi recommandée chez l'enfant contact de moins de 5ans à la posologie de 10 mg d'INH/kg/jour pendant 6 mois (30).

2.9.3 Vaccination

Le Bacille de Calmette et Guérin (BCG) est une souche de *Mycobacterium bovis* dont la virulence est atténuée mais qui est capable de stimuler les défenses de l'hôte. Le BCG n'assure pas une protection totale contre la tuberculose active chez l'enfant mais protège contre les formes disséminées graves qui surviennent après l'infection. La vaccination par le BCG permet donc de réduire la mortalité infantile liée à la tuberculose et est obligatoire selon le protocole national et sous la responsabilité du centre national de l'immunisation (20).

L'OMS recommande une vaccination unique par voie intradermique le plutôt possible après la naissance sans contrôle tuberculique ou revaccination, y compris chez les nourrissons infectés par le VIH qui sont asymptomatiques. Par contre, la vaccination est contre-indiquée chez les

nourrissons symptomatiques, vu le risque de bécégite généralisée. La durée de la protection est de 10 à 20 ans (20).

2.10 Traitement

La tuberculose peut être soignée et guérie. La stratégie DOTS de l'OMS au début des années 90 regroupant les services essentiels nécessaires pour lutter contre la tuberculose, fondés sur le diagnostic et le traitement des cas infectieux et intégrant des outils de gestion essentiels ont été promus en tant que stratégie mondiale de lutte antituberculeuse. Cette stratégie mise en œuvre à grande échelle a enregistré des résultats remarquables et des améliorations de la lutte antituberculeuse sur des périodes relativement courtes.

Le traitement de la tuberculose a pour objectifs de :

- Soigner le patient tuberculeux ;
- Prévenir la mort des patients présentant une tuberculose active et ses effets tardifs ;
- Prévenir la rechute de la tuberculose ;
- Réduire la transmission de la tuberculose ;
- Prévenir le développement de résistance (17).

Afin d'enregistrer le malade dans la catégorie de traitement appropriée, les définitions de cas selon le site anatomique de la tuberculose, le résultat de l'examen bactériologique, la sévérité de la maladie tuberculeuse, l'histoire d'un traitement précédent sont considérés.

2.10.1 Traitement de la tuberculose sensible

Médicaments de première ligne utilisés au Mali sont au nombre de quatre, la rifampicine (R), l'isoniazide (H), le pyrazinamide (Z), l'éthambutol (E) présentés sous forme de combinaisons fixes : R+H, RHZ ou RHZE.

Le régime de traitement pour la tuberculose sensible qu'elle soit ou non associée au VIH est reparti en une phase intensive de deux mois de la combinaison RHZE et une phase de continuation de quatre mois de RH et est réservé :

- Aux nouveaux cas (patients qui n'ont jamais reçu un traitement contre la tuberculose) ;
- Aux cas en retraitement (patients ayant reçu un traitement auparavant sans résistance à la Rifampicine au test GeneXpert) (31).

Les traitements des formes osseuse et méningée ont une durée plus longue de 12 mois que les autres formes quel que soit l'âge du patient soit 2 mois de RHZE et 10 mois de RH (32).

2.10.2 Traitement de la tuberculose multi résistante

La tuberculose MR est causée par des bacilles résistants à au moins, le H et la R, médicaments antituberculeux de 1^{ère} ligne les plus efficaces. Le traitement requis est long, allant jusqu'à deux ans de traitement pour le schéma long et 9 mois pour le schéma court. Il est plus coûteux et peut entraîner de graves effets indésirables chez les patients. L'OMS a rédigé des recommandations qui ont été actualisées en 2011, pour le traitement des souches multi-résistantes : un aminoside injectable, le PZA, une fluoroquinolone et l'éthionamide doivent être systématiquement utilisés, l'ajout de l'acide para-aminosalicylique (PAS) ou de cyclosérine afin d'atteindre une pentathérapie au début du traitement étant également recommandé, sous réserve de sensibilité de l'une de ces deux molécules. Le traitement plus court est applicable aux patients atteints d'une tuberculose MR et n'ayant pas de résistance aux médicaments de 2^{ème} intention, les fluoroquinolones et les médicaments injectables (15).

3 Matériels et méthodes

3.1 Conception de l'étude

3.1.1 Type et période d'étude

Il s'agissait d'une étude transversale qui s'est déroulée de janvier à décembre 2020.

3.1.2 Cadre de l'étude

L'étude s'est déroulée au Laboratoire National de Référence de la tuberculose (LNR-TB) à l'Institut National de Santé Publique (INSP) et dans 17 laboratoires du réseau des laboratoires de tuberculose. Le réseau des laboratoires de tuberculose est composé des laboratoires des Centres de Santé de Référence, aussi centre de diagnostic et de traitement de la tuberculose du Mali, de Centres de Santé Communautaires disposant de laboratoires, de certains hôpitaux et du laboratoire national de référence de la tuberculose qui anime le dit réseau. Ce réseau est organisé par niveau : central (national), intermédiaire et périphérique. Les sites intermédiaires pour la plupart, les CSREF des chefs-lieux de cercle sont chargés de la préparation des solutions stocks de réactifs et du contrôle de qualité des colorants. Les sites périphériques, laboratoires de CSREF et de CSCOM préparent la solution d'auramine prête à être utilisée à partir des solutions stock préparées au niveau des sites de préparation.

3.1.3 Echantillonnage

3.1.3.1 Choix des sites

Les sites sélectionnés sont ceux ayant reçu les missions de supervision des activités de tuberculose au compte du 4^{ème} trimestre 2019.

➤ Sites intermédiaires

Cinq centres intermédiaires des régions ont été choisis pour la collecte des colorants stocks ainsi que celle des données sur les pratiques de préparation et de conservation.

➤ Sites périphériques

Douze districts sanitaires (centres périphériques du réseau) ont été choisis pour la collecte des colorants en cours d'utilisation sur sites en raison de deux districts par centres intermédiaires des régions et de Bamako.

3.1.3.2 Codification des sites

Les laboratoires de préparation des solutions stocks de colorants, centres intermédiaires du réseau des laboratoires de tuberculose ont été codifiés CI soit de CI-1 à CI-5. Pour les autres laboratoires, centres périphériques, utilisateurs des colorants préparés au niveau des centres intermédiaires, ils ont été codifiés CP soit CP-1 à CP-12.

Tableau II: Sites intermédiaires et périphériques évalués

Laboratoire de préparation (centre intermédiaire)	Codification	Sites périphériques	Codification
CSREF du chef-lieu de la région 1	CI-1	Site périphérique 1 Site périphérique 2	CP1 CP2
CSREF du chef-lieu de la région 2	CI-2	Site périphérique 1 Site périphérique 2	CP1 CP2
CSREF du chef-lieu de la région 3	CI-3	Site périphérique 1 Site périphérique 2	CP1 CP2
CSREF du chef-lieu de la région 4	CI-4	Site périphérique 1 Site périphérique 2	CP1 CP2
CSREF du chef-lieu de la région 5	CI-5	Site périphérique 1 Site périphérique 2	CP1 CP2
LNR-TB/INSP	LNR	Site périphérique 1 Site périphérique 2	CP1 CP2

3.1.3.3 Panel de frottis

➤ Critères généraux

Les expectorations utilisées pour la préparation des panels ont été choisies selon les critères généraux suivants :

- Dépourvus de débris solides ;
- Quantité supérieure à 2 ml ;
- Aspect non hématique.

➤ Critères de sélection des échantillons négatifs

Les expectorations utilisées pour la confection des frottis négatifs étaient :

- Recherche de BAAR négative à la microscopie à fluorescence (0 BAAR/ 3L)
- MTB non détecté par le test Xpert MTB/RIF.

➤ Critère de sélection des échantillons positifs

Les expectorations positives ont été choisies selon les résultats de charge bacillaire suivants :

- Faiblement positif F+ (1 à 19 BAAR/1 L)
- Positif à 1+ (20 à 199 BAAR/ 1L)
- Positif à 2+ (5 à 50 BAAR/champ)
- Positif à 3+ (>50 BAAR/champ)

3.2 Matériels

3.2.1 Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé était l'expectoration liquéfiée sans conservateur.

3.2.2 Petits matériels et consommables de laboratoire

Les matériels et consommables essentiels utilisés étaient :

- Lames neuves et propres
- Anse
- Bec bunsen
- Portoir de lames
- Pont de coloration
- Tube Falcon de 50 ml
- Boîtes de rangement de lames.

3.2.3 Réactifs utilisés pour la coloration

Les réactifs primaires utilisés par les sites de préparation des solutions stocks de coloration sont :

- Poudre d'auramine ;
- Cristaux de phénol ;
- Poudre de bleu de méthylène ;
- Solution d'acide chlorhydrique concentré ;
- Alcool.

Ces réactifs sont reconstitués avec l'alcool ou l'eau distillée pour la préparation des solutions stocks de coloration.

➤ Colorants collectés au niveau des centres intermédiaires

Les colorants collectés au niveau des centres intermédiaires étaient les suivants :

- Solution concentrée d'auramine à 1% dans l'alcool ;
- Solution de phénol à 3,3% dans l'eau distillée ;
- Solution d'acide-alcool à 0,5% ;
- Solution de bleu de méthylène à 0,3% dans l'eau distillée.

➤ **Colorants collectés au niveau des centres périphériques**

Les colorants collectés au niveau des centres périphériques étaient :

- Solution d'auramine à 0,1% dans le phénol (solution de travail),
- Solution d'acide-alcool à 0,5% ;
- Solution de bleu de méthylène à 0,3%.

➤ **Composition du Kit Fluo-RAL**

Le kit Fluo-RAL est un kit prêt à l'emploi composé de :

- | | |
|-----------------------------------|-------------|
| • Auramine phéniquée à 0,1% | 1 x 1000 ml |
| • Solution de décoloration à 0,5% | 1 x 1000 ml |
| • Bleu de méthylène à 0,3 % | 1 x 1000 ml |

Remarque : Selon le fabricant, le coffret permet de réaliser entre 600 et 800 lames.



Figure 11 : Kit Fluo-RAL

3.2.4 Equipements de laboratoires utilisés

➤ Microscope primo Star LED

Ce modèle de microscope est spécialement conçu pour offrir les meilleures performances, intègre dans un design compact, l'ensemble des fonctionnalités nécessaires à une observation de haute qualité :

- Conçu pour l'enseignement
- Statif avec éclairage de Köhler réglable.
- Livré avec éclairages LED et halogène 30W
- Platine à mouvements croisés 75x30 avec commande à droite et porte-objet avec levier à ressort à gauche
- Tube binoculaire incliné à 30°
- 2 oculaires 10x/ 20 avec pointeur oculaire
- 4 objectifs "Plan-Achromat", à l'infini, x4, x10, x40, x100 (immersion)

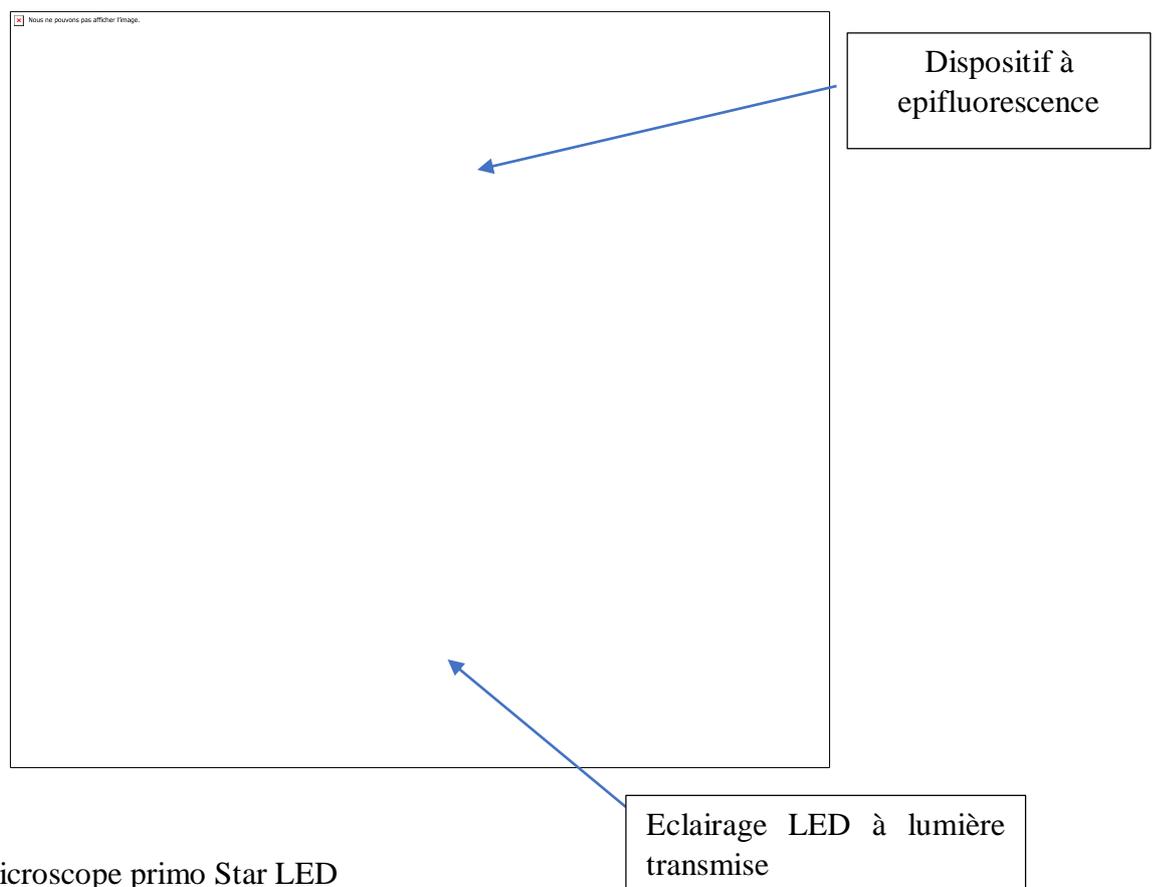


Figure 12 : Microscope primo Star LED

➤ GeneXpert

Le Xpert MTB/RIF est un test semi-quantitatif qui utilise comme principe la PCR avec amplification nichée en temps réel.



Figure 13 : GeneXpert

3.3 Méthode

3.3.1 Collecte des colorants au niveau des sites

Tous les colorants ont été homogénéisés avant d'être collectés dans un tube Falcon de 50 ml identifié au nom, à la concentration, au numéro de lot et à la date de préparation du colorant si disponibles.

- Au niveau des sites de préparation régionaux des colorants, les quantités suivantes ont été collectées :
 - 10 ml de solution d'auramine à 1% (solution concentrée) ;
 - 50 ml de phénol à 3,3% ;
 - 50 ml d'acide-alcool à 0,5% ;
 - 50 ml de bleu de méthylène à 0,3%.
- Au niveau des autres sites, nous avons collecté les solutions reconstituées en cours d'utilisation :
 - 50 ml d'auramine phéniquée à 0,1% (solution ;
 - 50 ml d'acide-alcool à 0,5% ;
 - 50 ml de bleu de méthylène à 0,3%.

3.3.2 Préparation des panels

3.3.2.1 Préparation des expectorations

Les expectorations choisies ont été déposées à température ambiante sur la paillasse pendant 24h à 72h. Après liquéfaction totale, elles ont été utilisées pour la confection des frottis.

3.3.2.2 Confection des frottis

Les frottis ont été étalés par mouvements de rotation réguliers sur une lame porte objet à l'aide d'une anse en respectant les dimensions de 2 cm/1 cm. L'uniformité et l'épaisseur du frottis ont permis de lire un journal à travers. Chaque crachat a permis de confectionner au moins 20 frottis.

3.3.2.3 Fixation des frottis

Après séchage complet à l'air libre, les frottis ont été fixés à la flamme d'un Bec Bunsen avant d'être colorés.

3.3.2.4 Validation des panels

Pour la validation de la reproductibilité du lot la procédure suivante a été suivie :

- Sélection uniforme de 6 frottis par panel ;
- Coloration par les réactifs à fluorescence en cours d'utilisation au LNR ;
- Lecture des 6 frottis par 6 techniciens différents ;
- Enregistrement des différents résultats obtenus dans un cahier ;
- Saisie des résultats exprimés en nombre de BAAR par longueur à l'aide d'un outil de calcul de la reproductibilité sous forme Excel développé par l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers pour les Programmes Nationaux de lutte contre la tuberculose.

Pour chaque lot, les moyennes sont calculées et apparaissent automatiquement dans les cases. Une décision « ACCEPT » OU « REJET » apparaît automatiquement basée sur la valeur de la moyenne +/- 2SD et les limites pour chaque jeu.

3.3.3 Contrôle de qualité des réactifs de coloration collectés

Pour les colorants collectés dans les centres intermédiaires, la solution de travail d'auramine a été préparée en appliquant le rapport 1 volume d'auramine pour 9 volumes de phénol soit 5 ml d'auramine concentré à 1% pour 45 ml de phénol.

Les frottis provenant du même lot ont été colorés par paire, un avec les colorants en cours d'utilisation au LNR et l'autre avec les colorants collectés par site selon la procédure de coloration suivante :

- Placer les lames portant les frottis fixés sur le pont de coloration (la face sur laquelle le frottis a été réalisé au-dessus). Laisser obligatoirement une distance d'au moins 1 cm (largeur de l'index) entre les lames.
- Couvrir le frottis de solution d'auramine phéniquée.
- **Ne pas chauffer.**
- Laisser agir pendant 20 minutes, puis laver à l'eau.
- Couvrir le frottis de solution alcool acide pendant 2 minutes, puis laver à l'eau.
- Couvrir le frottis de solution de bleu de méthylène pendant 1 minute, puis laver et sécher.

3.3.3.1 Contrôle de qualité des solutions d'auramine

Le contrôle de qualité de l'auramine consiste à vérifier la reproductibilité de résultats préalablement validés 1+ au LNR avec les solutions d'auramine collectées sur les sites.

3.3.3.2 Contrôle de qualité des solutions d'acide-alcool et de bleu de méthylène

Le contrôle de qualité des solutions d'acide-alcool et de bleu de méthylène consiste à vérifier l'absence de BAAR sur 3 frottis négatifs colorés successivement trois fois (3 cycles complets de coloration) et la netteté du fond de la préparation après coloration.

3.3.3.3 Interprétation

Le registre de contrôle de qualité des colorants a été renseigné. Les informations inscrites étaient :

- le numéro de lot du colorant ;
- la date du contrôle ;
- le nombre de BAAR observés et leur couleur ;
- le nombre de BAAR attendus ;
- l'aspect du fond de la préparation pour les frottis négatifs ;
- la conclusion de l'acceptation ou du rejet des colorants testés.

Nous avons interprété les résultats selon la procédure de contrôle de qualité interne des colorants en vigueur au LNR-TB/INSP :

- **Pour les frottis 1+ positifs déclarés négatifs ou BAAR faiblement colorés.**

Quand le résultat attendu de 1+ n'était pas obtenu ou quand les BAAR paraissaient pâles, nous avons repris la coloration avec un nouveau frottis à 1+ du panel. Quand le résultat n'était toujours pas celui attendu, le même frottis a été recoloré avec les solutions de coloration en cours d'utilisation au LNR-TB. Si ce nouveau résultat demeurait non satisfaisant, le panel était

incriminé et si le résultat obtenu était satisfaisant, le colorant testé était enregistré comme non conforme.

➤ **Pour les frottis contrôlés négatifs lus positifs**

En cas de présence de BAAR sur un frottis négatif, nous avons repris la coloration avec 3 nouveaux frottis négatifs d'un autre panel en suivant rigoureusement les indications suivantes :

- Utiliser l'eau distillée pour le rinçage ;
- Répéter le même cycle de coloration.

Au bout des trois cycles de coloration, le frottis est relu afin de vérifier la présence ou l'absence de BAAR.

3.4 Evaluation du kit de coloration RAL par rapport aux colorants préparés et utilisés au LNR-TB/INSP

3.4.1 Panels de frottis d'évaluation

Les frottis provenant des mêmes panels ont été testés avec les colorants RAL ou les colorants préparés au LNR soit au total 130 frottis testés dont :

- 40 frottis négatifs ;
- 25 frottis faiblement positifs F+ ;
- 25 frottis positifs à 1+ ;
- 20 frottis positifs à 2+ ;
- 20 frottis positifs à 3+.

3.4.2 Mode opératoire de coloration à partir du kit Fluo-RAL

- Placer le frottis fixé sur le support de coloration ;
- Recouvrir la lame avec l'auramine phéniquée (flacon 1) pendant 20 minutes ;
- Rejeter le colorant et rincer à l'eau courante ;
- Recouvrir la lame avec le décolorant (flacon 2) pendant 3 minutes ;
- Rejeter le décolorant et rincer à l'eau courante ;
- Recouvrir la lame avec le bleu de méthylène 0,3% (flacon 3) pendant 1 minute ;
- Rincer brièvement à l'eau courante ;
- Laisser sécher à l'abri de la lumière.

3.4.3 Interprétation

- La date du contrôle ;

- Le nombre de BAAR observés et leur couleur ;
- Le nombre de BAAR attendus ;
- La couleur du fond pour les frottis négatifs ;
- La conclusion de l'acceptation ou du rejet des colorants testés.

En présence de résultats non entendus comme (confère à l'interprétation des panel), Nous avons repris sur d'autres frottis ou revu les temps de coloration / décoloration.

- Absence de BAAR dans un frottis positif ;
- Observation de BAAR avec une coloration pâle ;
- Excès de fluorescence u fond noir.

3.5 Variables étudiées

Les variables étudiées dans l'étude étaient :

- Indicateurs de qualité des colorants et du processus de coloration (disponibilité des procédures opérationnelles POS, conservation des colorants, date de préparation et péremption, N° de lot, contrôle de qualité interne des colorants préparés et en cours d'utilisation) ;
- Qualité des réactifs de coloration des sites de préparation et d'utilisation ;
- Réalisation des contrôles de qualité des solutions stocks et de travail.
- Résultats des frottis test après coloration avec le kit Fluo-RAL ;
- Sensibilité et spécificité du kit par rapport au colorant ;
- Les valeurs prédictives positives et négatives.

3.6 Analyses des données

Une fiche d'enquête a été administrée aux différents sites (voir annexe 1 et 2) prenant en compte :

- Les procédures de préparation des colorants : existence de procédures de préparation des colorants ;
- La conservation des colorants en cours d'utilisation ;
- Le contrôle de qualité interne des colorants fraîchement préparés et en cours d'utilisation.

Les données analysées au niveau des sites étaient :

- La disponibilité des procédures opérationnelles et des réactifs de coloration ;

- La vérification de la qualité des solutions de coloration, auramine, phénol, acide-alcool et bleu de méthylène des colorants des sites par rapport à ceux du LNR ;
- Le contrôle des normes de conservations.

L'analyse des données de contrôle du kit a porté sur :

- Les pourcentages pour la sensibilité et la spécificité du kit par rapport aux colorants du LNR ;
- Les pourcentages de valeurs prédictives positive et négative.

Tableau III : Tableau de calcul de la sensibilité et de la spécificité

Test en cours d'évaluation	Test standard de référence		
	Positifs	Négatifs	Total
Positifs	a	b	a + b
Négatifs	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	

Sensibilité du test = $a/(a + c)$; spécificité du test = $d/(b + d)$; VPP = $a/(a + b)$; VAN = $d/(c + d)$. a = vrai positif, b = faux positif ; c = faux négatif ; d = vrai négatif

4 Résultats

4.1 Résultats de l'évaluation des pratiques de préparation et de conservation

Tableau IV: Evaluation des pratiques de préparation et de conservation au niveau des centres intermédiaires

Indicateurs	Centres intermédiaires				
	CI-1	CI-2	CI-3	CI-4	CI-5
Disponibilité des procédures opérationnelles de préparation des colorants	OUI	OUI	NON	OUI	NON
Disponibilité de solutions stock d'auramine et de phénol	OUI	OUI	OUI	OUI	NON

Parmi les centres intermédiaires enrôlés trois sur cinq disposaient des procédures opérationnelles écrites. Seul un centre ne disposait pas de solutions stocks.

Tableau V : Identification et conservation des colorants au niveau des centres intermédiaires

Indicateurs	Centres intermédiaires				
	CI-1	CI-2	CI-3	CI-4	CI-5
Conservation dans des bidons teintés	NON	OUI	NON	OUI	NON
Attribution du N° de lot	OUI	NON	NON	OUI	OUI
Dates de préparation et de péremption	OUI	OUI	NON	OUI	OUI

Trois centres sur cinq ne conservaient pas leurs colorants dans des bidons teintés, trois attribuaient un numéro de lot aux solutions préparées et quatre sur cinq notaient les dates de préparation et de péremption.

Tableau VI : Indicateurs d'utilisation et de conservation au niveau des centres périphériques

Centre intermédiaire (laboratoire de préparation)	CI-1		CI-2		CI-3		CI-4		CI-5		LNR	
Centres périphériques	CP-1	CP-2	CP-1	CP-2								
Indicateurs												
Disponibilité de procédure pour la coloration	NON	NON	OUI	OUI	OUI	NON	OUI	OUI	NON	OUI	OUI	OUI
Identification des colorants	NON	NON	NON	NON	NON	NON	OUI	OUI	NON	NON	OUI	OUI
Numéro de lot	NON	NON	NON	NON	OUI	NON	NON	NON	OUI	NON	OUI	OUI
Dates de préparation et ou de péremption	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	NON	OUI	OUI	OUI	OUI

La procédure opérationnelle de préparation de la solution de travail était disponible dans huit centres sur douze. Quatre centres identifiaient leurs bouteilles de colorants (noms et concentrations du colorant). Huit centres n'inscrivaient pas le numéro de lot sur les bouteilles, trois les dates de préparation et ou de péremption.

4.2 Contrôle de qualité interne des colorants fraîchement préparés et en cours d'utilisation

Tableau VII : Contrôle de qualité interne des colorants fraîchement préparés au niveau des centres intermédiaires

Indicateurs	Centres intermédiaires				
	CI-1	CI-2	CI-3	CI-4	CI-5
Existence de panel de frottis pour le contrôle interne (Négatif et 1+)	NON	OUI	NON	OUI	NON
Existence de cahier de contrôle de qualité	NON	OUI	NON	OUI	NON
Réalisation du CQI	NON	OUI	NON	OUI	NON

Seul deux centres disposaient de panel de frottis pour le contrôle de qualité interne, réalisaient le contrôle de qualité de leurs colorants et disposaient d'un cahier de contrôle.

Tableau VIII : Contrôle de qualité interne des colorants au niveau des centres périphériques

Centres intermédiaires	CI-1		CI-2		CI-3		CI-4		CI-5		LNR	
Centres périphériques	CP-1	CP-2										
Indicateurs												
Disponibilité de panel de frottis contrôle	NON	NON	NON	NON	OUI	NON	NON	OUI	NON	NON	OUI	OUI
Existence de cahier de contrôle	NON	NON	NON	OUI	OUI	NON	OUI	OUI	NON	OUI	OUI	OUI
Réalisation du contrôle de qualité des colorants	NON	NON	OUI	OUI	OUI	NON	NON	OUI	NON	OUI	OUI	OUI
Filtration des colorant avant coloration	NON	OUI	NON	NON	NON	NON	NON	OUI	NON	NON	OUI	OUI

Cinq centres ne réalisaient pas le contrôle de qualité des colorants à la réception des nouveaux lots ou celui des colorants en cours d'utilisation, cinq possédaient le panel de frottis test et sept disposaient de cahier de contrôle. Seulement quatre laboratoires filtraient les colorants.

4.3 Evaluation de la qualité des solutions prélevées

Tableau IX : Evaluation de la qualité de détection des BAAR des solutions d'auramine des centres intermédiaires

Centres intermédiaires	Résultat attendu sur 2 frottis	Résultat obtenu
CI-1	1+	1+
CI-2	1+	1+
CI-3	1+	F+
CI-4	1+	1+

Les résultats du contrôle de qualité des solutions d'auramine et de phénol des centres intermédiaires concordaient avec ceux attendus.

➤ **Les résultats de l'évaluation de la qualité des solutions d'acide-alcool et de bleu de méthylène des centres intermédiaires**

Les résultats de tous les centres intermédiaires concordaient avec ceux attendus.

Tableau X : Evaluation de la qualité des colorants des laboratoires périphériques

Laboratoire de préparation des solutions stock	Centre périphériques	Auramine (frottis 1+)	Acide-alcool et bleu de méthylène	Décision
Centre intermédiaire 1 (CI-1)	CP-1	F+ Nég	F+ F+ F+	Colorants non conformes
	CP-2	F+ Nég	Nég Nég Nég	Auramine non conforme Acide-alcool et bleu de méthylène conformes
Centre intermédiaire 2 (CI-2)	CP-1	1+ 1+	Nég Nég Nég	Colorants conformes
	CP-2	1+ 1+	Nég Nég Nég	Colorants conformes
	CP-1	1+ 1+	Nég Nég Nég	Colorants conformes

Centre intermédiaire 3 (CI-3)	CP-2	1+ 1+	Nég Nég Nég	Colorants conformes
Centre intermédiaire 4 (CI-4)	CP-2	1+ 1+	Nég Nég Nég	Colorants conformes
	CP-2	F+ Nég	Nég Nég Nég	Auramine non conforme Acide-alcool et bleu de méthylène conformes
Centre intermédiaire 5 (CI-5)	CP-2	1+ 1+	Nég Nég Nég	Concordant pour les 3 colorants
	CP-2	Nég Nég	Nég Nég Nég	Auramine non conforme Acide-alcool et bleu de méthylène conformes
LNR	CP-2	1+ 1+	Nég Nég Nég	Colorants conformes
	CP-2	1+ 1+	Nég Nég Nég	Colorants conformes

Pour le contrôle de qualité de l'auramine, huit centres enrôlés sur 12 avaient des résultats concordants avec ceux attendus. Pour le contrôle de qualité de l'acide-alcool et du bleu de méthylène un seul centre n'avait pas de résultats concordants.

4.4 Evaluation du Kit Fluo-RAL

4.4.1 Comparaison de la lecture des frottis tests par charge bacillaire

Tableau XI : Comparaison du kit Fluo-RAL aux colorants préparés au LNR

Panel	Nombres de frottis concordants	Taux de concordance
Négatif (40)	40	100%
Positif F+ (25)	25	100%
Positif 1+ (25)	22	88%
Positif 2+ (20)	20	100%
Positif 3+ (20)	20	100%

Le taux de concordance était de 100% pour tous les frottis sauf trois frottis du panel positif à 1+ lus F+ avec le kit Fluo RAL.

4.4.2 Résultat obtenu après modification du temps de décoloration

Après recoloration des frottis 1+ lus F+ avec le kit Fluo RAL, en diminuant le temps de décoloration progressivement de 1 minute, nous avons obtenu le résultat attendu de 1+avec une minute de temps de décoloration.

4.4.3 Sensibilité et spécificité du kit Fluo RAL

Tableau XII : Résultat de la sensibilité et de la spécificité du kit Fluo RAL

Kit Fluo-RAL	Colorants préparés au LNR		
	Positifs	Négatifs	Total
Positifs	90	0	90
Négatifs	0	40	40
Total	90	40	130

Le kit Fluo-RAL à une sensibilité et une spécificité de 100%.

5 Commentaires et discussion

5.1 Limites et avantages

Pour le calcul de coûts des deux types de colorants, nous n'avons pas évalué le prix du transport (qui évolue en fonction du nombre de colis). Les ressources humaines et les risques chimiques n'ont pas aussi été évalués.

La préparation des colorants fait maison demande plus de temps, plus de matériels et de précaution. Le kit Fluo-RAL est un kit prêt à l'emploi qui offre plus d'avantage par son conditionnement facilitant son utilisation et une protection contre l'inhalation des produits chimiques lors de la préparation.

5.2 Résultats de l'évaluation auprès des centres de préparation et d'utilisation des réactifs de coloration

5.2.1 Laboratoires intermédiaires chargés de la préparation des réactifs de coloration

Parmi les 5 centres intermédiaires évalués, trois possédaient des procédures opérationnelles soit 60%, l'absence de procédures opérationnelles dans 40% des centres peut être expliquée par une non connaissance de l'existence de procédure ou un manque de volonté de la part des techniciens de laboratoire.

Quatre centres soit 80% ne respectaient pas toutes les normes de conservation. Cela pourrait s'expliquer par la non disponibilité des matériels nécessaires ou par un manque de formation de techniciens sur les normes de conservation.

Trois centres soit 60% n'ont pas effectué le contrôle de qualité interne avant la répartition des colorants. Ceci peut être expliqué par un manque d'organisation ou une négligence du technicien.

5.2.2 Centres périphériques

Sur les douze centres périphériques quatre n'avaient pas de procédure opérationnelle de reconstitution des solutions stock soit 33,3%. Huit centres avaient les bouteilles de colorants bien identifiées soit 66,7% des centres et seulement 33,3% des centres mettaient le numéro de lot des solutions soit quatre centres. Ce résultat montre une fois de plus la non disponibilité de procédures écrites dans nos laboratoires.

Neuf des centres avaient marqué les dates de préparation et de péremption sur les bouteilles soit 75% des centres et quatre districts filtraient leurs colorants avant utilisation soit 33,3%. Cela peut s'expliquer par une connaissance des normes de conservation des colorant.

Sept centres n'ont pas réalisé de panel de frottis de contrôle pour les colorants soit 58,3%. Ceci pourrait être expliquer par une négligence du technicien ou d'une absence d'échantillon positif ou d'une absence du technicien. Cinq districts n'ont pas de cahier de contrôle de qualité soit 41,7%. Sur les douze centres cinq ne réalisaient pas un contrôle de qualité mensuellement soit 41,7% des centres.

5.3 Contrôle de qualité des site intermédiaires

Parmi les quatre centres intermédiaires le pourcentage des centres qui avaient des résultats concordants avec ceux du LNR est de 75%. Cela est expliqué à un respect des procédures de préparation. Seul un centre n'avait pas de résultats concordants avec une baisse de la charge bacillaire soit 25%. Cela peut être expliquer par l'absence de procédures opérationnelles et la non réalisation du contrôle de qualité des colorants.

5.4 Contrôle de qualité des districts sanitaires

Parmi les résultats du contrôle de qualité des districts sanitaire, 66,7% ont un résultat concordant avec ceux du LNR avec la présence de quelques cristaux dus au fait que les solutions n'étaient pas filtrées après leur préparation. 8,3% à un résultat négatif pour le contrôle de qualité positif qui est dû à un problème d'auramine phéniqué préparé, un centre avait un résultat positif pour les lames du contrôle négative, cela est expliqué par une contamination par les mycobactéries environnementale d'un des colorant (plus précisément le bleu de méthylène) ou l'eau de rinçage et un résultat F+ et négatifs sur les deux frottis 1+ validé soit 8,3%. Deux centres ont un résultat négatif et F+ pour les frottis 1+ confirmés au LNR soit 16,7%, cette différence de résultat peut être explique par le fait que le premier centre ne fait pas de contrôle de qualité de façon régulière et le second utilise de l'alcool-acide à 3% comme solution de décoloration.

5.5 Comparaison du kit Fluo-RAL

Sur 130 frottis négatifs et à différentes charges bacillaires (F+ à 3+), 127 frottis concordait avec ceux du LNR et parmi les frottis 1+, trois frottis sur les 25 étaient faiblement positifs au lieu d'être 1+, après une recoloration avec une diminution du temps de décoloration (de 3 minutes à 1 minute) nous avons obtenu des résultats positifs à 1+. Par contre les BAAR sur les frottis colorés avec le kit apparaissaient toujours plus fin que les frottis colorés avec le colorant préparés au LNR-TB. Ces résultats sont différents de ceux obtenu par Gérôme P ; Fabre M ;

Soler C qui avaient eu un résultat positif à 2+ avec le kit RAL pour une lame positive à 1+ avec la méthode de Degommier (33).

L'analyse des résultats par charge bacillaire donne une sensibilité et une spécificité avec le kit Fluo-RAL de 100% et les valeurs prédictives positive et négative sont de 100%

6 Conclusion

L'examen microscopique demeure une démarche incontournable pour le diagnostic et le suivi des patients sous traitement, le kit de coloration prêt à l'emploi utilisé a permis de disposer de résultats fiables en diminuant les erreurs dues à une contamination des colorants par les mycobactéries environnementales et aussi les risques d'exposition aux réactifs de coloration. Notre étude nous a permis de connaître la qualité, les normes de conservation et la réalisation des contrôles de qualité des colorants préparés et utilisés au niveau des centres de microscopie de la tuberculose.

Notre étude a montré que le kit Fluo-RAL a une sensibilité et une spécificité égale aux colorants préparés au LNR et peut être utilisé dans le réseau des laboratoires de tuberculose.

Perspective :

Possibilité d'évaluer toutes les charges avec un temps de décoloration diminuer.

Recommandations

A la fin de cette étude, nous formulons les recommandations suivantes :

- A la cellule sectorielle de lutte contre le VIH, la tuberculose et les hépatites virales de :
Veiller à la disponibilité permanente du kit.
- Au Laboratoire National de Référence de la tuberculose (LNR-TB) /INSP

Si le kit vient à être accepté de

- Revoir la procédure du test en augmentant le temps de coloration de l'auramine et en diminuant le temps de décoloration ;
- Mettre à disposition une procédure nationale aux utilisateurs avant l'utilisation des kits ;
- Faire un suivi de l'utilisation des kits dans les centres ;
- Initier le contrôle des colorants sur site.

REFERENCES

1. mondiale de la Santé O. Rapport sur la tuberculose dans le monde 2021. 2022.
2. Traoré S. Facteurs de risques associés aux décès des personnes vivant avec le VIH sur les sites de prise en charge antirétrovirale de Bamako, Mali. *Mali Santé Publique*. 2021;60-6.
3. Benatallah D, Hedjri Khedoudja A, Khames M. Etude rétrospective de la tuberculose humaine dans la wilaya de Médéa 2021.
4. Cambau E, Drancourt M. Steps towards the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* by Robert Koch, 1882. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014;20(3):196-201.
5. Pascaline BV. PLACE DE L'EXAMEN DES CRACHATS DANS LE DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE PULMONAIRE AU CSB II EKAR IMADY.
6. Loch C. La tuberculose, une histoire toujours d'actualité. Éditions EDK, Groupe EDP Sciences; 2016. p. 535-6.
7. Chevallard Y. La place des mathématiques vivantes dans l'éducation secondaire: transposition didactique des mathématiques et nouvelle épistémologie scolaire. 3e Université d'été Animath. 2004;2227.
8. Carbonnelle B, Dailloux M, Lebrun L, Maugein J, Pernot C. Mycobactéries–Mycobactérioses. *Cahier de Formation–Biologie médicale*. 2003;29.
9. Pichard É. *Malintrop Afrique: Manuel de maladies infectieuses pour l'Afrique*: John Libbey Eurotext; 2002.
10. Leclerc H, Gaillard J-L, Simonet M. *Microbiologie générale: la bactérie et le monde bactérien*: Doin; 1995.
11. Curie UPeM. *Bactériologie 2002-2003*. 122 p.
12. Cole S, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;396(6707):190-.
13. Brodin P, Rosenkrands I, Andersen P, Cole ST, Brosch R. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? *Trends in microbiology*. 2004;12(11):500-8.
14. Ait-khaled N, Enarson D. *Manuel pour les Etudiants en Médecine*. Organisation Mondiale de La Santé. 1999;149.
15. Aubry P, Gaüzère DB-A, Vandroux D. Orientation diagnostique devant une méningo-encéphalite aiguë infectieuse en zones tropicales. *Med Trop(Mars)*. 2019;1-10.
16. mondiale de la Santé O. Directives pour la prise en charge de l'infection tuberculeuse latente (ITL). 2014.
17. mondiale de la Santé O. Tuberculose de l'enfant: feuille de route: objectif zéro décès. 2016.
18. Cuevas LE, Browning R, Bossuyt P, Casenghi M, Cotton MF, Cruz AT, et al. Evaluation of tuberculosis diagnostics in children: 2. Methodological issues for conducting and reporting research evaluations of tuberculosis diagnostics for intrathoracic tuberculosis in children. Consensus from an expert panel. *Journal of Infectious Diseases*. 2012;205(suppl_2):S209-S15.
19. Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA, Schoenbaum EE, Vermund SH, Klein RS, et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *New England journal of medicine*. 1989;320(9):545-50.
20. Mali P. *Guide technique national pour le diagnostic et la prise en charge de la tuberculose chez l'enfant au Mali* 2017.
21. mondiale de la Santé O. Définitions et cadre de notification pour la tuberculose– Révision 2013. Organisation mondiale de la Santé; 2014. Report No.: 924250534X.
22. Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technology Assessment (Winchester, England)*. 2007;11(3):1-196.

23. Barben J, Hammer J. Diagnostic et traitement de la tuberculose latente chez l'enfant. *Paediatrica*. 2007;18(3):52-6.
24. Rieder H, Van Deun A, Kam K, Kim S, Chonde T, Trébuq A, et al. Priorities for tuberculosis bacteriology services in low-income countries. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2007. 2007.
25. Brändlia O, Prod'homb G, Rochatc T, Zellwegerd J-P, editors. Clinique et diagnostic de la tuberculose. *Forum Med Suisse*; 2003.
26. Della-Latta P. The mycobacteriology milestones: journeying to the new millennium. *Laboratory Medicine*. 1999;30(6):408-17.
27. Organization WH. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multi-drug resistant tuberculosis (MDR TB). Expert Group Report. World Health Organization and the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) World Health Organization, Geneva, Switzerland http://www.who.int/tb/features_archive/expert_group_report_june08.pdf. 2008.
28. mondiale de la Santé O. Conditions à remplir dans les pays pour la mise en oeuvre du système Xpert MTB. Organisation mondiale de la Santé; 2011.
29. mondiale de la Santé O. Cadre d'indicateurs et de cibles pour le renforcement des laboratoires en ligne avec la Stratégie pour mettre fin à la tuberculose. 2017.
30. Olivier C. Tuberculose: diagnostic des sujets contacts et chimioprophylaxie chez l'enfant. *Archives de pédiatrie*. 2003;10(9):847-52.
31. Tattevin P. Le traitement de la tuberculose en 2007. *Médecine et maladies infectieuses*. 2007;37(10):617-28.
32. Pertuiset E. Tuberculose osseuse et articulaire des membres. *EMC-Rhumatologie-Orthopédie*. 2004;1(6):463-86.
33. Gérôme P, Fabre M, Soler C. Évaluation du kit Fluo-RAL (RAL) pour la recherche de mycobactéries en microscopie à fluorescence. *Pathologie Biologie*. 2011;59(5):245-7.

Annexes

Annexe 1 : Fiche d'évaluation du laboratoire intermédiaire de préparation des colorants

Nom du site intermédiaire :

I- Prélèvement de solutions stocks préparées

Solutions	Auramine concentrée 1%	Phénol 3,3 %	Alcool-acide 0,5%	Bleu de méthylène 0,3% ou Permanganate de potassium à 0,5%
Quantité	10 ml	50 ml	50 ml	50 ml
Date de préparation				
Date de péremption				
N° de lot				

II- Evaluation du laboratoire intermédiaire

1- Avez-vous des procédures écrites sur la préparation des colorants ? Si oui (vérifier), prendre une photo. Si non comment préparez-vous ?

.....
.....

2- Les solutions stock sont-elles bien conservées (bouteilles teintées/conservées à l'abri de la lumière)

3-

4- Le contrôle de qualité des colorants est-il fait ? (Si oui, demander les résultats) et demander au technicien de décrire comment il le fait (constitution du panel, présentation des résultats)?

Annexe 2 : Fiche d'évaluation du laboratoire de microscopie périphérique

Nom du district sanitaire :

I- Prélèvement de solutions de travail

Solutions	Auramine phéniqué 0,1%	Alcool-acide 0,5%	Bleu de méthylène 0,3%/permanganate
Quantités	50 ml	50 ml	50 ml
Date de préparation			
Date de péremption			

II- Evaluation du laboratoire périphérique

1. Comment préparez-vous la solution de travail d'auramine ?

.....

2. Les solutions de colorants en cours d'utilisation sont-elles bien conservées (bouteilles teintées/conservées à l'abri de la lumière, numéro de lot, date de préparation ou de péremption)

.....

.....

3. Le contrôle de qualité interne des colorants en cours d'utilisation est-il fait ? Si oui comment ? Si non, pourquoi ?

.....

.....

Annex 3 : Registre de contrôle de qualité des colorants de la microscopie à fluorescence

7 Coloration des frottis

Pour la vérification de la contamination des colorants,

- Prendre 3 frottis de panel de lames **négatives** ;
- Fixer et colorer selon la technique de coloration à l'auramine en utilisant de l'eau distillée ou filtrée pour le rinçage ;
- Réaliser **trois cycles complets** de coloration ;
- Lire les frottis colorés au microscope LED 40X (200 champs).

Pour la capacité du colorant à colorer :

- Prendre 2 frottis de panel de lames **1+** ;
- Fixer et colorer selon la méthode de coloration à l'auramine en utilisant de l'eau distillée ou filtrée pour le rinçage ;
- **Effectuer un seul cycle de coloration** ;
- Lire les frottis colorés au microscope LED 40X (200 champs).

8 Interprétation

Pour la capacité du colorant à colorer, il faudra noter :

- La présence ou non de BAAR ;
- L'appréciation globale du frottis (fond du frottis surtout).

Pour la vérification de la contamination des colorants, il faudra noter :

- Le nombre de BAAR sur les 200 champs ;
- L'appréciation globale du frottis (couleur des BAAR, fond du frottis).

Lire et interpréter les résultats selon les procédures PA001 et PA002

9 Enregistrement

Lorsque le contrôle est satisfaisant, le registre de contrôle de qualité des colorants doit être rempli. Les informations à y inscrire sont :

- Le numéro de lot de la solution préparée attribué dans le registre de préparation des colorants ;
- La date du contrôle ;
- Le nombre de BAAR trouvés et leur couleur pour les frottis positifs ;

- Le nombre de BAAR attendus ;
- Négatif : absence de BAAR et couleur du fond pour les frottis négatifs
- Conclusions : **Colorants bons à utiliser** ou **Colorants à rejeter** ;
- Signature de celui du contrôleur et ses initiaux.

10 Démarches dans les cas de résultats non satisfaisants

- **Contrôles positifs déclarés négatifs ou BAAR faiblement colorés en rouge**

Les hypothèses qu'on pourrait émettre sont :

- Lames contrôles non-homogènes
- Mauvais colorant ou mauvais frottis
- Mauvaise technique de préparation

Conduite à tenir : Reprendre le contrôle avec une autre série de lames.

Si les deux contrôles positifs sont déclarés négatifs ou si l'on ne trouve que quelques BAAR dans chacun des frottis on peut conclure à **un problème de l'auramine phéniquée préparée.**

Conduite à tenir :

- Jeter ce nouveau lot. Noter toutes les informations dans le registre.
- Préparer un autre lot de solution d'auramine phéniquée en suivant correctement la procédure de préparation, et répéter les contrôles
- Si le problème persiste, il faudra mettre en question **la qualité de la poudre d'auramine et/ou du phénol.**

11 Contrôles négatifs déclarés positifs

Les hypothèses qu'on pourrait émettre sont :

- Eau de rinçage contaminée par des mycobactéries de l'environnement ;
- Un des colorants contaminés par des mycobactéries de l'environnement ;
- Contrôles négatifs confectionnés à partir d'un crachat contenant des rares BAAR.

Conduite à tenir :

- Reprendre 3 nouveaux panels de lames négatives avec un autre crachat connu négatif ;
- Utiliser l'eau distillée pour le rinçage ;
- Répéter le même cycle de coloration avec **le nouveau lot de colorant** et avec l'ancien lot de colorant ;

- Répéter la démarche avec une autre série de frottis négatifs qu'il faut colorer avec **l'ancien lot de solution d'auramine phéniquée et d'acide-alcool**, et avec le **nouveau lot de bleu de méthylène**, comme c'est le plus souvent le bleu qui est contaminé ;
- Arrêter la coloration après trois cycles d'auramine phéniquée et acide-alcool et vérifier si des BAAR sont visibles.
- Si non-visibles, répéter la procédure avec d'autres lames négatives, et des cycles de coloration complètes.

Annex 4 : Mode opératoire du kit Fluo-RAL :

- Placer le frottis fixé sur le support de coloration
- Recouvrir la lame avec l'auramine phéniquée (flacon 1) pendant 20 minutes
- Rejeter le colorant et rincer à l'eau courante
- Recouvrir la lame avec le décolorant (flacon 2) pendant 3 minute
- Rejeter le décolorant et rincer à l'eau courante
- Recouvrir la lame avec le bleu de méthylène 0,3% (flacon 3) pendant 1 minute
- Rincer brièvement à l'eau courante
- Laisser sécher à l'abri de la lumière

Annexe 5

FICHE SIGNALÉTIQUE

NOM : PEROU

PRENOM : Amadigué Josephine

E-mail : perou.josephine@yahoo.fr/ 77-58-70-97

TITRE DE LA THESE : Evaluation de la qualité des réactifs de coloration pour le diagnostic de la tuberculose par la microscopie à fluorescence au Mali

ANNEE ACADEMIQUE : 2021-2022

VILLE DE SOUTENANCE : Bamako

LIEU DE DEPOT : Bibliothèque de la Faculté de Médecine d'Odonto Stomatologie et Faculté de Pharmacie.

PAYS D'ORIGINE : MALI

SECTEUR D'INTERET : Bactériologie, Infectiologie

RESUME

Introduction :

Bien que les techniques de diagnostic moléculaires plus rapides et plus sensibles soient de plus en plus recommandées pour le diagnostic de la tuberculose, la microscopie à la recherche de BAAR demeure l'une des techniques les plus utilisées dans les pays en voie de développement. Elle est la technique la plus accessible pour le suivi des patients sous traitement antituberculeux. La microscopie à fluorescence recommandée par l'OMS est la plus utilisée dans les laboratoires de tuberculose du Mali avec l'option de l'utilisation de colorants préparés localement à partir de poudres déshydratées. Cependant les kits industriels comme le Kit Fluo-RAL constituent une alternative avec une simplicité d'utilisation évitant des préparations parallèles.

Objectifs :

Evaluer la qualité des réactifs de coloration à fluorescence utilisés dans le réseau des laboratoires de tuberculose au Mali et la performance du kit Fluo RAL pour la recherche de BAAR.

Matériels et méthodes :

Notre étude transversale s'est déroulée de janvier à décembre 2020 à l'INSP à partir de colorants collectés dans 17 laboratoires de diagnostic de la tuberculose dont 5 sites de préparation de solutions stocks de colorants. En plus de la collecte des colorants, nous avons évalué la préparation et la conservation au niveau des sites de l'étude. Les colorants ont été contrôlés à

l'aide de frottis négatifs et positifs à 1+. Le kit Fluo RAL a été comparé aux colorants préparés localement au LNR-TB à partir des panels de paires de frottis négatifs et positifs à différentes charges bacillaires.

Résultats :

Parmi les dix-sept centres évalués, 35,3% ne possédaient pas de procédures opérationnelles de préparation des colorants, 80% ne respectaient pas toutes les normes de conservation, 59% ne mentionnaient pas le numéro de lot des solutions, 23,5% ne marquaient pas les dates de préparation et de péremption sur les bouteilles et 64,7% ne réalisaient pas le contrôle de qualité interne des colorants. Pour le contrôle de qualité externe des colorants prélevés, les résultats étaient satisfaisants pour les solutions d'auramine à 64,7% et à 88,2% pour les solutions de décoloration et de contre coloration. Les résultats étaient concordants pour l'évaluation du kit Fluo RAL par rapport aux colorants préparés au LNR avec une couleur des BAAR légèrement plus faible pour le kit. En diminuant le temps de décoloration à 1 minute, nous avons obtenu des résultats similaires.

Conclusion :

Notre étude a montré qu'une attention particulière doit être portée sur la qualité des colorants préparés et utilisés dans le réseau des laboratoires de tuberculose du pays. Le kit Fluo-RAL pourrait être une alternative pour la coloration des frottis surtout dans les laboratoires à charge de travail faible à modérée et ou difficilement accessibles.

Evaluation of the quality of staining reagents for the diagnosis of tuberculosis by fluorescence microscopy in Mali

Summary

Introduction:

Although faster and more sensitive molecular diagnostic techniques are increasingly recommended for the diagnosis of tuberculosis, microscopy for AAR bacilli remains one of the most widely used techniques in developing countries. It is the most accessible technique for monitoring patients on TB treatment. Fluorescence microscopy, recommended by the WHO, is the most commonly used technique in the TB laboratories of Mali, with the option of using locally prepared dyes from dehydrated powders. However, industrial kits such as the Fluo-RAL Kit are an alternative with ease of use avoiding parallel preparations.

Objectives:

To evaluate the quality of fluorescence staining reagents used in the network of tuberculosis laboratories in Mali and the performance of the Fluo-RAL kit for the detection of AAR bacilli.

Materials and methods:

Our cross-sectional study took place from January to December 2020 at the INSP using stains collected in 17 tuberculosis diagnostic laboratories, including 5 sites where stock solutions of stains were prepared. In addition to the collection of the dyes, we evaluated the preparation and storage at the study sites. The dyes were checked using 1+ negative and positive smears. The Fluo RAL kit was compared with dyes prepared locally at the NRL-TB from panels of smear-negative and smear-positive pairs at different bacillary loads.

Results:

Of the seventeen centers evaluated, 35.3% did not have operational procedures for the preparation of dyes, 80% did not comply with all conservation standards, 59% did not mention the batch number of the solutions, 23.5% did not mark the preparation and expiry dates on the bottles and 64.7% did not carry out internal quality control of the dyes. For external quality control of the dyes collected, the results were satisfactory for auramine solutions at 64.7% and 88.2% for decolorization and counterstaining solutions. The results were consistent for the evaluation of the Fluo RAL kit compared to the dyes prepared at the NRL with a slightly lower AAR bacilli colour for the kit. By decreasing the staining time to 1 minute, we obtained similar results.

Conclusion:

Our study showed that special attention should be paid to the quality of the stains prepared and used in the network of TB laboratories in the country.

The Fluo-RAL kit could be an alternative for smear staining especially in laboratories with low to moderate workloads and or difficult access.

SERMENT DE GALIEN

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

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art
et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur
enseignement ;
- D'exercer dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec
conscience et de respecter non seulement la législation en
vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du
désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le
malade et sa dignité humaine.

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

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

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

Je le jure !