Ecole Nationale de Medecine et de Pharmacie du Mali

Année 1981 N° 8

Nouvelle contribution à l'étude bacteriologique de la Tuberculose au Mali

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 1982
devant l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie du Mali

par Samba Djougou SANGARE
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'Etat)

Examinateurs:

PRESIDENT : Professeur Jean DUVAL

Professeur Souleymane SANGARE

MEMBRES Docteur Seydou Ousmane DIALLO

Professeur Bréhima KOUMARE

ECOLE NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI

ANNEE ACADEMIQUE 1980-1981

Directeur Général	: Professeur Aliou BA
Directeur Général Adjoint	: Professeur Bocar SALL
Sécretaire Général	: Monsieur Sory COULIBALY
Econome	: Monsieur Dioncounda SISSOKO
Conseiller Technique	: Professeur Agrégé Philippe RANQUE

PROFESSEURS MISSIONNAIRES

Professeur	Sadio SYLLA	: Anatomie
"	Francis MIRANDA	: Biochimie
"	Michel QUILICI	: Immunologie
"	Humbert GIONO-BARBER	: Pharmacodynamie
"	Jacques JOSSELIN	: Biochimie
"	Jean Paul MARTINAUD	: Phisiologie
"	Michel POUSSET	: Matière Médical
Docteur	Bernard LANDRIEU	: Biochimie
"	Gérard TOURAME	: Psychiatrie
"	Jean DELMONT	: Santé Publique
"	Boubacar GISSE	: Toxicologie - Hydrologie
"	Mme Paula GIONO-BARBER	: Anatomie - Physiologie Humaine
"	Mme Térèse FARES	: Pharmacodynamie

PROFESSEURS TITULAIRES RESIDANT A BAMAKO

Professeur	Aliou BA	: Ophtalmologie
"	Bocar SALL	: Anatomie - Othopédie - Traumatologie - Sécourisme
"	Mamadou DEMBELE	: Chirurgie Générale
"	Mohamed TOURE	: Pédiatrie
"	Souleymane SANGARE	: Pneumo-Phtisiologie
"	Mamadou KOUMARE	: Pharmacologie - Matière Médicale
"	Mamadou Lamine TRAORE	: Obstétrique - Médecine Légale
"	Aly GUINDO	: Gastro-entérologie
"	Abdoulaye AG-RHALY	: Médecine Interne
"	Didi Yaya SIMAGA	: Santé Publique
"	Siné BAYO	: Histologie - Embryologie - Anatomie Pathologie
"	Abdel Karim KOUMARE	: Anatomie - Chirurgie Générale.

Professeur	Bréhima KOUMARE	: Bactériologie
"	Mamadou K. TOURE	: Cardiologie
"	Philippe RANQUE	: Parasitologie
"	Bernard DUFLO	: Pathologie Médicale - Thérapeutique-Physiologie Hématologie.
"	Robert COLOMAR	: Gynécologie Obstétrique
"	Oumar COULIBALY	: Chimie Organique
"	Adama SISSOKO	: Zoologie
"	Bouba DIARRA	: Microbiologie
"	Salikou SANOGO	: Physique
"	Niamanto DIARRA	: Mathématiques

ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Docteur	Abderhamane Sidéyé MAIGA	: Parasitologie
"	Sory KEITA	: Microbiologie
"	Yaya FOFANA	: Microbiologie Hématologie
"	Sory I. KABA	: Santé Publique
"	Moctar DIOP	: Sémiologie Chirurgicale
"	Balla COULIBALY	: Pédiatrie
"	Bénitiéni FOFANA	: Obstétrique
" B	Boubacar CISSE	: Dermatologie
"	Souleymane DIA	: Pharmacie Chimique
"	Yacouba COULIBALY	: Stomatologie
"	Sanoussi KONATE	: Santé Publique
"	Issa TRAORE	: Radiologie
"	Mme SY Assitan SOW	: Gynécologie

CHARGES DE COURS

Docteur	Gérard GAUCHOT	: Microbiologie
"	Gérard TRUSCHEL	: Anatomie-Sémiologie Chirurgicale
"	Boulkassoum HAIDARA	: Galénique-Diététique
"	Philippe JONCHERES	: Urologie
"	Hamady Mody DIALL	: Chimie Analytique
"	Aliou KEITA	: Galénique
"	Saïbou MAIGA	: Galénique
Monsieur	Cheick Tidiani TANDIA	: Hygiène du Milieu
Docteur	Abdoulaye DIALLO	: Gestion Législative
Professeur	N'Golo DIARRA	: Botanique-Cryptogamie-Biologie Végétale
"	Souleymane TRAORE	: Physiologie Générale.

JE DEDIE CE TRAVAIL

A MON PERE

A MA MERE

A MA FEMME

A MES FRERES ET SOEURS

A TOUS MES ONCLES ET TANTES

A TOUS MES COUSINS ET COUSINES

A TOUS MES AMIS ET CEUX QUI ME SONT CHERS

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

A TOUT LE PERSONNEL DU DISPENSAIRE ANTITUBERCULEUX DE BAMAKO

A TOUT LE PERSONNEL DU SERVICE DE BACTERIOLOGIE DE L'I.N.R.S.P. BAMAKO

A TOUT LE PERSONNEL DU SERVICE DE BACTERIOLOGIE DU C.H.U. PITIE - SALPETRIERE PARIS

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

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

AU CORPS PROFESSORAL DE L'ECOLE NATIONALE DE
MEDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI

A TOUTE LA DIRECTION DE L'ECOLE NATIONALE
DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

A MONSIEUR VATHINE DIALLO

A TOUS LES ETUDIANTS DE L'ECOLE NATIONALE DE
MEDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI

En temoignage de ma reconnaissance.

A NOTRE PRESIDENT DE JURY

MONSIEUR JEAN DUVAL
PROFESSEUR DE BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE C.H.U.PITIE-SALPETRIERE
PARIS

A travers le Professeur KOUMARE, nous avons sû apprécier vos immenses qualités humaines. Avec l'honneur que vous nous faites de présider cette thèse, nous vous prions de trouver ici le témoignage de notre gratitude et l'assurance de notre respectueux attachement.

A § NOTRE MAITRE DE THESE

MONSIEUR BREHIMA KOUMARE

PROFESSEUR DE BACTERIOLOGIE A L'ECOLE NATIONALE

DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI

CHEF DE SERVICE DE BACTERIOLOGIE DE L'INSTITUT NATIONAL

DE RECHERCHE EN SANTE PUBLIQUE A BAMAKO

Vos immenses qualités professionnelles nous ont guidé vers la Bactériologie.

Trouvez ici l'expression de notre profonde gratitude.

A MONSIEUR SOULEYMANE SANGARE

PROFESSEUR DE PNEUMO-PHTISIOLOGIE A L'ECOLE NATIONALE

DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI

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

Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude et soyez assuré de notre indéfectible attachement.

AU DOCTEUR SEYDOU OUSMANE DIALLO

CONSEILLER TECHNIQUE AU MINISTERE DE LA SANTE PUBLIQUE

ET DES AFFAIRES SOCIALES

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

Soyez-en remercié.

S O M M A I R E

INTRODUCTION

Au Mali l'endémie tuberculeuse pose un problème majeur de Santé publique. En effet 50 % des jeunes de 20 ans ont une réaction tuberculinique positive et on évalue à 3 % l'incidence annuelle de l'infection tuberculeuse, à 11000 cas l'incidence annuelle de la morbidité (17).

Ces données épidémiologiques expliquent aisément l'importance et l'urgence d'une action de lutte efficace parfaitement intégrée dans notre stratégie globale des soins de Santé primaires.

Le Comité Antituberculeux Malien (C.A.M) en collaboration avec certains organismes internationaux, notamment l'Union Internationale de Lutte Contre la Tuberculose (U.I.C.T) et l'Organisation pour la Coopération et la Coordination contre les Grandes Endémies (O.C.C.G.E) a donc entrepris une vaste action de lutte à l'échelle nationale basée sur la prophylaxie, le dépistage et le traitement de la tuberculose.

Dans ce contexte, les données bactériologiques concernant notamment la nature des espèces bactériennes responsables de la maladie et leur sensibilité aux antibiotiques, en cela qu'elles conditionnent l'efficacité du dépistage et du traitement, revêtent une importance capitale.

Très peu d'études ont été faites dans ce domaine et c'est dans le souci d'apporter notre contribution à la lutte antituberculeuse au Mali que nous avons réalisé ce travail.

Il porte sur 233 malades dont les expectorations contenant des bacilles acido - alcoolo - résistants visibles à l'examen microscopique, après coloration par la méthode de Ziehl-Neelsen, ont été collectées au Dispensaire Antituberculeux de Bamako (D.A.T) et étudiées dans le service de Bactériologie de l'Institut National de Recherches en Santé Publique (I.N.R.S.P).

Le plan que nous avons adopté est le suivant :

I. Historique
II. L'infection tuberculeuse
III. Etude bactériologique du genre Mycobacterium
IV. Les médicaments antituberculeux
V. Sujets matériels et méthodes
VI. Résultats
VII. Discussion
VIII. Conclusion.

I - HISTORIQUE

L'infection tuberculeuse a existé depuis les âges les plus reculés. En effet, HIPPOCRATE fait mention d'infections broncho-pulmonaires et pleurales parmi lesquelles les phtisies occupent une place importante. Comme GALIEN et plus tard COELUIS AURELIUS, il décrit les divers aspects cliniques de la maladie. A l'âge rayonnant de l'Empire Romain, ARETEE DE CAPPADOCE consacre à la pathologie pleuro-pulmonaire des lignes remarquables. En Europe à l'époque de la renaissance GIROLAMO FRACASTOR de Verone a renové entièrement la notion traditionnelle de phtisie en plaçant celle-ci dans le même cadre que les autres maladies infectieuses. Il est le premier a avoir incriminé les microorganismes dans la pathogénicité et la transmission inter-humaine de la maladie.

Mais il a fallu attendre le XIXè siècle pour voir éclore une série de publications qui portent en germe les premiers fruits de la méthode anatomo-clinique : GASPARD LAURENT BAYLE "Recherche sur la phtisie pulmonaire" ; THEOPHILE RENE MARIE HYACINTHE LAENNEC "De l'auscultation médiate" ; LOUIS en 1825 "Recherche anatomo-clinique sur les phtisies".

Sur le plan expérimental VILLEMIN en 1865 (48) démontre le caractére infectieux de la maladie en inoculant au jeune lapin un broyat de lésion tuberculeuse. La maladie ainsi provoquée est transmissible d'un animal à un autre.

En 1882, ROBERT KOCH décrit le bacille tuberculeux (Mycobacterium tuberculosis) et franchit ainsi l'étape bactériologique.

La découverte de celle-ci est rapidement suivie par celle d'autres espèces notamment Mycobacterium bovis agent de la tuberculose bovine mais également humaine et Mycobacterium avium agent de la tuberculose de la poule.

A partir de 1895, WILHEM CONRAD ROTGEN découvre les rayons X facilitant le diagnostic de la tuberculose qui prendra dès lors son aspect contemporain. VON PIRQUET en 1907 découvre les réactions cutanées tuberculiniques. L'élaboration du vaccin B.C.G de 1908 à 1921 par CALMETTE et GUERIN marque une étape importante dans la prophylaxie de la maladie. En 1944 WAKSMAN en découvrant la Streptomycine inaugure l'ère actuelle de la lutte antituberculeuse, celle qui permet d'espérer l'éradication totale de la maladie.

II - L'INFECTION TUBERCULEUSE

1 - Aperçu clinique. (35).

Les manifestations cliniques de la tuberculose humaine sont très variées du fait que les Mycobacteries pathogènes peuvent envahir tous les organes.

L'organe le plus souvent atteint est le poumon d'où la fréquence plus grande de la tuberculose pulmonaire aiguë ou chronique chez l'homme.

Les autres localisations (cutanée, ganglionnaire, osseuses, séreuses et organique) sont relativement moins fréquentes. On peut observer des cas de meningites tuberculeuses isolées en l'absence de tout autre signe de tuberculose.

L'infection tuberculeuse est caractérisée par un état de fatigue accusée, une faiblesse générale, une perte de poids et de la fièvre qui sont les signes révélateurs de la maladie.

Chaque localisation organique a sa propre symptomatologie.

2 - Physiopathologie de la tuberculose (35).

Les lésions tuberculeuses chez l'homme sont très polymorphes et sont déterminées par plusieurs facteurs : le nombre de bacilles infectants et leur multiplication au niveau des différents foyers, la résistance de l'hôte et les phénomènes d'hypersensibilité au cours de l'infection.

La tuberculose pulmonaire qui est de loin la plus fréquente de toutes les localisations évolue selon plusieurs stades :

- après pénétration des bacilles par les voies aériennes dans un alvéole pulmonaire, il y a captation de ces bacilles par les macrophages tissulaires et sanguins. Si à ce moment-là, la multiplication est arrêtée, il y a formation d'un follicule tuberculeux constitué par des cellules épithélioïdes, des cellules géantes et des lymphocytes. Ce follicule évolue généralement vers la résorption ou la sclérose. Si la multiplication bacillaire n'est pas arrêtée, la lésion évolue et on peut observer deux types de lésions :

. un type exsudatif : caractérisé par une réaction inflammatoire aigü avec liquide d'oedème, présence de macrophages, de polynucléaires et plus tard de monocytes autour des bacilles tuberculeux. Si la multiplication s'arrête à ce stade, il y a évolution vers la résorption totale ou la sclérose; si la multiplication continue, on aboutit au stade suivant.

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

Plus tard, la zone centrale se . nécrose et il se produit une homogénéisation solide qui aboutit à la caséification qui est le processus fondamental de la tuberculose.

Alors qu'au début de la caséification, il existe un très grand nombre de bacilles dans la lésion, on assiste à une diminution importante de bacilles vivant lorsque la caséification est achevée.

La lésion caséeuse solide peut évoluer soit vers la résorption ou la sclérose, soit vers la liquefaction. Cette liquefaction du caseum est un caractère important de la tuberculose maladie. Ce ramollissement peut s'accompagner d'une véritable flambée bacillaire et les particules ramollies chargées de bacilles pénétrent dans les bronches et vont disséminer l'infection dans d'autres parties pulmonaires. L'élimination des parties ramollies provoque la formation d'une caverne délimitée par une coque scléreuse qui la sépare du parenchyme pulmonaire.

C'est la caverne pulmonaire qui explique la chronicité de la tuberculose, sa marche envahissante et sa contagiosité. En effet, cette caverne ne guérit pas spontanément et il se produit une multiplication bactérienne intense dans le revêtement nécrotique de sa coque et ces bacilles se répandent par les bronches dans le tissu pulmonaire.

Le genre Mycobacterium appartient à la classe des actinomycetales à l'ordre des Mycobacteriales et à la famille des Mycobacteriaceae.

I - Définition et classification des espèces du genre (35).

Ce genre comprend des microorganismes qui se présentent sous la forme de bâtonnets droits ou légèrement incurvés, parfois filamenteux mais sans renflement ni conidies asporulés aciliés et immobiles, difficilement colorables par les méthodes usuelles Gram positif et acido-alcoolo-résistants.

La classification des espèces est difficile, on distingue deux grands groupes :

- bacilles non cultivables sur des milieux artificiels pathogènes pour l'homme et certains rongeurs :

Mycobacterium leprae : agent de la lèpre humaine (HANSEN).

Mycobacterium leprae muris : agent de la lèpre murine (STEFANSKY).

- bacilles cultivables sur des milieux artificiels que l'on peut subdiviser en plusieurs groupes :

. bacilles cultivables uniquement sur des milieux artificiels additionnés de bacilles acido-alcoolo-résistants tués ou d'extraits de ces bacilles (mycobactine).

Mycobacterium paratuberculosis : agent de l'entérite hypertrophiante des bovidés (JOHNEI).

. bacilles cultivables sur des milieux artificiels à pousse lente, habituellement pathogènes pour les animaux à sang chaud :

Mycobacterium tuberculosis varité hominis : espèce typique du genre, agent de la tuberculose humaine (KOCH).

Mycobacterium tuberculosis variété bovis : agent de la tuberculose bovine (SMITH).

Mycobacterium tuberculosis variété africanum : espèce qui présente des caractères intermédiaires entre la variété bovis poussant lentement sur le milieu de LOWENSTEIN-JENSEN et dont la croissance est stimulée par le pyruvate de sodium. Elle est responsable de la tuberculose humaine en Afrique centrale et occidentale.

Mycobacterium avium : agent de la tuberculose aviaire (STRAUSS et GAMALEIA).

Mycobacterium microti : agent de la tuberculose du campagnol (WELLS).

. bacilles cultivables sur des milieux artificiels à pousse lente éventuellement pathogènes pour l'homme :

Photochromogènes : présentant une pigmentation jaune-orange par photoinduction : Mycobacterium kansasii.

Scotochromogènes : présentant une pigmentation jaune-orangé à l'obscurité: Mycobacterium aquae.

- Dans les autres infections, on prélève : L.C.R., urines, sang et fragments de tissus prélevés par biopsie ou exérèse.

Tous ces prélèvements doivent être effectués à plusieurs reprises avant la mise en route du traitement antibiotique.

Conservation et transport des expectorations.

Dans les pays en voie de développement, le manque de personnel qualifié pour le diagnostic bactériologique de la tuberculose fait que les prélèvements effectués dans les centres de Santé ruraux, ne peuvent être cultivés sur place et doivent donc être véhiculés dans les centres urbains. Il est donc nécessaire de trouver un antiseptique capable d'inhiber la pullulation des germes saprophytes tout en ayant une faible action toxique sur le bacille tuberculeux. On recueille alors les prélèvements dans des milieux de transport. Les plus utilisés sont :

Le bromure de cétyl-pyridinium : sa valeur a été jugée dans un travail fait par Fadila BOULAHBAL et Jacques GROSSET (10) sur des prélèvements provenant de deux unités antituberculeuses, l'une située à 650 Kms et l'autre à 450 Kms d'Alger respectivement à l'Est et au Sud et portant sur 180 échantillons de crachat.

Dans le centre de Santé chaque malade crache dans deux récipients, l'un vide et l'autre contenant environ 5 ml de solution à 1 % de bromure de cétyl-pyridinium.

Résultats :

Prélèvements avec antiseptiques	Prélèvements sans antiseptiques	Nombre
Ziehl 0	Ziehl 0	15
Ziehl +	Ziehl +	55
Ziehl 0	Ziehl +	13
Ziehl +	Ziehl 0	0
Ziehl non faits	Ziehl non faits	7
	Total	90
Culture 0	Culture 0	5
Cultures+	Cultures +	42
Cultures +	Cultures 0	1
Cultures 0	Cultures +	6
Cultures +	Cultures contaminées	19
Cultures contaminées	Cultures +	6
Cultures contaminées	Cultures 0	2
Cultures 0	Cultures contaminées	3
Cultures contaminées	Cultures contaminées	6
	Total	90

Le tableau fait ressortir :

- l'examen microscopique est plus fréquemment positif dans les prélèvements transportés sans antiseptique que les prélèvements avec antiseptique. Inversement les cultures apparaîssent plus fréquemment positives avec les prélèvements contenant du bromure de cétyl pyridinium.

Le phosphate trisodique : il empêche également la pullulation des germes saprophytes. On utilise le phosphate trisodique à 10 % ajouté aux expectorations à la concentration finale de 23 %.

2. Examen microscopique.

a). confection des frottis : (33).

Passer l'anse de platine à la flamme et la laisser refroidir. Prélever une parcelle purulente de crachat. Faire un frottis fin sur les deux tiers de la lame à 1 cm de chaque extrémité et 0,5 cm de chaque bord. Stériliser l'anse à la flamme (un frottis fin permet de voir à travers les lettres noires d'une page imprimée).

Cette confection des frottis est laborieuse et demande souvent de la patience. Elle est déterminante pour les résultats de l'examen microscopique.

Fixation :

Laisser sècher le frottis.

- Fixation à la chaleur : prendre la lame avec une pince et le frottis étant tourné vers le haut, passer la lame trois fois à travers la zone chaude de la flamme d'un bec bunsen.

- Fixation à la chaleur : verser II gouttes d'alcool sur le frottis et flamber.

b). Méthodes de coloration :

Diverses méthodes de coloration ont été employées. Nous nous limitons aux colorations les plus couramment utilisées.

- Méthode de Ziehl Neelsen selon l'U.I.C.T.

a). Réactif:

. Fuchsine phéniquée de Ziehl

Solution alcoolique saturée de fuchsine

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

Solution de travail

Cristaux de phénol : 5,0 g. Chauffer doucement dans un flacon pour faire fondre et amener ce volume à 90 ml en ajoutant de l'eau.

Ajouter 10 ml de la solution de fuchsine sur :

. Acide sulfurique avec 25 %
Acide sulfurique ..... 100 ml
Eau distillée..... 300 ml.

Verser toujours l'acide très lentement dans l'eau, ne jamais verser l'eau dans l'acide.

. Contre colorant au bleu de méthylène :

Chlorure de bleu de méthylène ou
bleu de méthylène hydrosoluble: 0,3 g
Eau distillée..... 100 ml.

b). Technique :

1. couvrir le frottis de fuchsine phéniquée de Ziehl'
2. chauffer très doucement jusqu'à émission des vapeurs. En aucun cas le colorant ne doit bouillir ou se déssécher sur la lame.
3. laisser agir le colorant pendant 5 minutes.
4. rincer la à l'aide d'un filet d'eau du robinet.
5. couvrir la lame avec de l'acide sulfurique à 25 % pendant 3 minutes.
6. rincer comme en 4.
7. recouvrir le frottis avec le bleu de méthylène à 0,3 %.
8. laisser agir le colorant pendant 1 à 2 minutes.
9. rincer comme en 4.
10. laisser sécher à l'air libre.

- Coloration à froid (KINYOUN modifié).

a). Réactif :

- Fuchsine phéniquée de Kinyoun

. dissoudre 4 g de fuchsine basique dans 20 ml d'étanol à 90 - 95° et additionner 100 ml d'une solution aqueuse de phénol à 8 %

- Acide-alcool

. additionner lentement 3 ml d'acide chlorhydrique dans 97 ml d'étanol.

- Contre colorant au bleu de méthylène

. dissoudre 0,3 g du bleau méthylène dans 100 ml d'eau distillée.

b). Technique :

. Faire comme la technique au Ziehl-Neelsen sauf que la fuchsine de Kinyoun se laisse pendant 5 minutes sans chauffer.

- Coloration fluorescente :

Les colorants fluorescents sont des substances organiques qui sont excitées par une lumière de longueur d'onde déterminée et qui après excitation, emettent une lumière de longueur d'onde plus élevée.

Les colorants les plus courants sont excités par la lumière rouge ou verte.
Exemple : fluorescéine, rhodamine, orange d'acridine, auramine et rouge thiazine.

Méthode de coloration.

La technique consiste à colorer les mycobacteries par des fluorochromes qui après excitation par une lumière de longueur d'onde déterminée émettent une lumière de longue d'onde plus élevée.

Plusieurs techniques ont été décrites parmi elles la méthode de SMITHWICK modifiée.

a). Colorant :

Auramine phéniqué : dissoudre 0,1 g d'auramine dans 10 ml d'éthanol à 90-95 % puis additionner à une solution à 3 g de phénol dans 87 ml d'eau distillée.
Stocker dans une bouteille de verre foncé.

Acide-alcool : additionner 0,5 ml d'acide chlorhydrique dans 100 ml d'alcool à 70 %.

Contre colorant : dissoudre 0,01 g d'orange d'acridine ou 0,1 g de rouge de thiazine dans 100 ml d'une solution aqueuse à 0,1 % de phosphate disodique anhydre (N_{a2} H PO_4).

b). Technique :

1. couvrir le frottis avec la solution d'auramine phéniquée et laisser colorer pendant 15 minutes

2. rincer avec un filet d'eau du robinet

3. couvrir le frottis avec la solution d'acide-alcool pendant 2 minutes

4. rincer avec un filet d'eau du robinet

5. couvrir le frottis avec le contre colorant pendant 2 minutes

6. rincer et laisser sécher en l'air.

c). Lecture des lames : (40).

- Observation microscopique.

. après coloration par la méthode de Ziehl-Neelsen :

la recherche des bacilles acido-alcoolo-résistants exige un bon microscope et demande de la patience. On utilise un objectif à immersion (x 100) et des oculaires de 10. L'objectif ne doit pas toucher le frottis de crainte d'éventuelles souillures des lames suivantes.

L'examen systématique de la lame se fera en aller et retour successif sur toute la hauteur de l'étalement. La lecture d'une lame prend 20 à 30 minutes.

. après coloration en fluorescence :

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

- Aspect microscopique des mycobacteries.

. après coloration par la méthode Ziehl-Neelsen : cette méthode basée sur l'acido-alcoolo-résistance est spécifique des mycobateries. Seuls les bacilles acido-alcoolo-résistants apparaîssent comme de fins bâtonnets rouges francs longs de 0,5 à 4 U et large de 0,5 à 0,6 U droits ou légèrement incurvés, tigrés ou non isolés ou en amas avec des extrémités arrondies.

. après coloration en fluorescence : la coloration fait apparaître les bacilles acido-alcoolo-résistants en jaune pâle avec un contraste de fon variant avec les méthodes.

d). Expression des résultats.

Les malades positifs à la microscopie étant la source de transmission de la tuberculose et une notion quantitative de la concentration bacillaire étant utile pour suivre l'évolution pendant le traitement, il est donc nécessaire qu'un laboratoire utilise une méthode uniforme de préparation, coloration et observation des frottis. Les résultats sont alors notés selon une échelle comme par exemple ci-dessous :

NOMBRE DE BACILLES ACIDO-ALCOOLO-RESISTANTS	NOTER	REPONDRE	CONCENTRATION BACILLAIRE PAR CRACHAT
0/300 champs	Négative	(-)	(-) de 1000
1-2/300 champs	Nombre observé	(±) ou ?	environ 5000
1-10/100 champs	Nombre par 100 champs	(+)	environ 5000 à 10 000
1-10/10 champs	Nombre/ 10 champs	(++)	environ 50 000
1-10/ champs	Nombre/champs	(+++)	environ 100 000
10 ou plus/champs	Supérieur à 10 par champs	(++++)	500 000 ou plus

B - Isolement des mycobacteries à partir des produits pathologiques.

1). Culture : les mycobacteries sont des microorganismes à croissance lente. Aérobies strictes, elles cultivent à une température optimum de 35-37° et à un pH optimum de 6,7 - 6,9.

- Milieux de culture :

Du fait de la lenteur de leur croissance et de leur exigence nutritive, les milieux utilisés pour l'isolement des mycobacteries doivent, d'une part inhiber la croissance des autres germes saprophytes qui se développent plus vite, d'autre part être riches et capables d'apporter assez d'éléments stables nécessaires à leur métabolisme. Ce qui explique l'utilisation de milieux complexes semi-synthétiques ou synthétiques enrichis.

La première culture du bacille tuberculeux a été obtenue par Robert KOCH en 1882 à partir du serum de boeuf coagulé. En 1887, NOCARD et ROUX obtiennent une croissance satisfaisante du bacille par l'adjonction de glycérine en proportion convenable (5 à 8 %). Depuis lors, de nombreux milieux ont été étudiés. On distingue deux groupes : les milieux liquides et les milieux solides.

. Les milieux liquides :

En 1884 PROSKAUER et BECK mettent au point une formule simple constituée d'une solution tampon dans laquelle le carbonate d'ammonium est la source d'azote et la glycérine celle du carbone. SAUTON, en 1912 ajoute un acide aminé et du fer. YOUMAN en 1947 réalise un milieu semin-synthétique en ajoutant au milieu de PROSKAUER et BECK 10 % de serum de boeuf :

Asparagine ..... 5 g
Phosphate diacide de potassium.. 5 g
Citrate de magnésium (à 14 H_2O). 1,5g
Sulfate de potassium 0,5g
Glycérol..... 20 g
Eau distillée q.s.p. .....1000 g

Ajuster le pH à 7,2 avec de la soude au 1/10.

Milieu de DUBOS :

Milieu simple intentionnellement pauvre. Le bacille tuberculeux y pousse facilement alors que les autres germes poussent mal.

Hydrolysat de caséine (poudre)... 2 g
Citrate de fer ammoniacal..... 0,05 g
Chlorure de calcium ..... 0,0005 g
Sulfate de magnésium(à 7 H_2O). 0,01 g
Sulfate de zinc..... 0,0001 g
Sulfate de cuivre..... 0,0001 g
Eau distillée..... 900 cm3.

Amener à pH 6,8. Stériliser à + 115°C pendant 20 minutes.

Tween 80 en solution à 10 %..... 5 cm3
Albumine de boeuf(fraction V de Cohn) en solution à 5 %..... 100 cm3

stérilisée par filtration sur bougie ou membrane stérilisante.

Pour effectuer la culture de souches pures de Mycobacterium tuberculosis avec un bon rendement, on enrichit ce milieu par adjonction par litre de :

Asparagine ..... 2 g
Phosphate mono acide de Na($12H_2O$)6 g
Phosphate diacide de potassium.. 1 g
Glucose (ou glycérol)..... 4 g.

MIDDELBROOK (34) en 1954 et 1968 met au point les milieux $7H_9$, $7H_{10}$ et $7H_{11}$. On observe dans la préparation enrichie par la Pyridoxine, la Biotine, l'albumine bovine et la Catalase. La présence du vert malachite qui a un léger pouvoir antiseptique. La différence entre les trois milieux réside dans la composition minérale et par l'absence dans le $7H_9$ de l'acide obléique et par la présence dans le $7H_{11}$, d'hydrolysat de caséine.

Le milieu de SULA enrichi en alanine, le seul d'ailleurs, contient du vert malachite.

. Milieux solides :

L'isolement des mycobacteries à partir des produits . : pathologiques se fait surtout sur des milieux solides.

Actuellement les milieux solides les plus couramment utilisés sont :

le milieu de LOWENSTEIN-JENSEN et le milieu de COLETSOS.

Milieu de LOWENSTEIN-JENSEN

Solution I

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

On chauffe jusqu'à dissolution. On stérilise à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes. Ajouter 30 g de fécule de pomme de terre (stérile) à la solution I et chauffer à 100°C pendant 15 minutes ; puis maintenir à 56°C. Mélanger à cette solution I 1 litre d'eau (cassés stérilement) et 20 ml de vert malachite à 2 % (oxalate).

Il existe actuellement des milieux de LOWENSTEIN-JENSEN déshydratés sur le marché préparés jusqu'au stade des oeufs qu'il suffit d'ajouter.

Le milieu de COLETSOS (13) base est enrichi avec des oligo-éléments du pyruvate, du glutamate et d'osseine. Il permet une croissance rapide des mycobatéries et est particulièrement indiqué pour la culture du Mycobacterium bovis et Mycobactérium africanum.

- Ensemencement des produits pathologiques.

• Produits non contaminés :

Les produits pathologiques non contaminés n'ayant eu aucune communication avec le milieu extérieur (L.C.R, pleurésies séro-fibrineuses puis ganglionnaires, etc...) peuvent être ensemencés directement sur les milieux de culture sans traitement. Cependant les liquides purulents seront dilués au 2/5 avec de l'eau distillée stérile.

• Produits contaminés :

L'isolement des mycobacteries à partir des produits pathologiques nécessite une décontamination énergique qui se fait en deux temps :

- un premier temps de liquefaction du mucus qui permet à la substance d'atteindre la flore associée.

- un deuxième temps de destruction des bacteries saprophytes.

Ces deux temps qui sont simultanés représentent le traitement du crachat appelé improprement homogénéisation.

Décontamination : plusieurs méthodes ont été préconisées.

Méthode de PETROFF (38).

Réactifs :

Solution 1 N de soude : dissoudre 4 g de soude dans 100 ml d'eau distillée. Stériliser à l'autoclave.

Solution à 4 % de H_2SO_4 : ajouter lentement l'acide dans l'eau.

Solution aqueuse de bleu de tournesol ou bleu de bromothymol.

Technique :

Les crachats placés dans le tube à centrofuger fermant hermétiquement sont mis en contact avec 2 à 4 fois leur volume de soude à 4 % selon leur viscosité. Après agitation, on met à l'étuve pendant 15-20 minutes. On neutralise le culot de centrifugation par quelques gouttes de H_2SO_4 ou HCl à 4 % en présence d'un indicateur de pH. Le produit neutralisé est ensuite ensemencé à raison de quelques gouttes par tube de milieu de culture.

Méthode de PETROFF modifiée :

2 ml de crachat sont placés dans un tube à centrifuger. On ajoute 3 ml d'une solution 1 N de soude. On agite pendant 30 minutes sur agitateur de KAHN, ensuite on ajoute une solution d'acide phosphorique à 0,6 % en présence de 2 ml de bleu de bromocrésol au 1/150è jusqu'à apparition de nuages jaunes persistant au sein de la coloration bleu. On centrifuge à 3000 tours par minute pendant 30 minutes. On ensemence le culot à raison de quelques gouttes par milieu de culture.

Procédé au Lauryl sulfate de sodium TACQUET et TISON (45).

Réactifs :

. Produits décontaminant :

Lauryl sulfate de sodium pur	30 g
Hydroxyde de sodium pur en pastille.....	10 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

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

. Solution de neutralisation :

Poudre de bromocrésol à 1/250	2 ml
Acide phosphorique pur	1,5 ml
Eau distillée q.s.p.....	1000 ml

Technique :

. Fluidification-neutralisation :

A 2 ml de produit pathologique on ajoute 3 ml de solution mouillante alcaline. Le mélange peut être fait directement dans un tube à centrifuger conique, stérile de 45-50 ml bouché. On agite une demi-heure sur un agitateur de KAHN au minimum.

. Lavage-neutralisation:

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

. Centrifugation :

On centrifuge pendant 30 minutes à 3000 tours/minute. On jette le surnageant. On ensemence l'ensemble du culot sur plusieurs tubes.

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

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

- Méthode au Bromure de Cétyl-pyridinium.

Technique :
Les crachats sont traités pendant 24 heures à l'étuve à 37°C par 4 fois leur volume de Cétyl-pyridinium à 1 % en eau distillée. Pour renforcer l'homogénéisation, on procède à 5 ou 6 agitations manuelles durant l'incubation. Centrifuger et jeter le surnageant. Le culot est repris par un faible volume d'eau distillée stérile. On ensemence le produit final dans des tubes de milieu de culture à raison de quelques gouttes par tube.

- Aspects culturaux des colonies.

Les mycobateries exceptées Mycobaterium leprae donnent sur les milieux de culture des colonies dont l'aspect est caractéristique et variable d'un milieu à un autre.

Culture sur le milieu LOWENSTEIN-JENSEN :

Mycobacterium tuberculosis : il donne des colonies eugoniques rugueuses sèches, de teinte crème-beige de 1 à plusieurs millimètres de diamètre.

Les colonies âgées peuvent prendre l'aspect en choux-fleur.

Il existe de rares colonies dysgoniques.

Mycobaterium africanum : il donne des colonies dysgoniques rugueuses poussant lentement sur LOWENSTEIN-JENSEN dont la croissance est stimulée par l'addition de Pyruvate de sodium. Les colonies sont plates, mâtes avec un mamelon central sur les vieilles cultures.

Mycobacterium bovis : il donne des colonies dysgoniques lisses blanchâtres.

Les Mycobacteries atypiques : elles donnent des colonies d'aspect variable selon les espèces.

2). Inoculation aux animaux .

Inoculation au cobaye : le cobaye est l'animal de laboratoire le plus sensible à l'infection tuberculeuse. Pour le diagnostic, deux animaux sont utilisés pour chaque produit pathologie. L'injection est sous-cutanée à la face interne de la cuisse.

Produits non contaminés.

1 à 2 ml de produit sont inoculés sans autre traitement que la centrifugation. Si le produit est trop épais, on le dilue par l'eau physiologique stérile.

Produits contaminés.

2 ml de produit ou son culot de centrifugation dilués si c'est nécessaire dans l'eau physiologique sont mis en présence de 1 cg (maximum) d'Auréomycine en poudre prélevée avec une spatule de platine. On mélange à l'aide de la seringue destinée à l'inoculation par aspiration et refoulement. Après 20 à 30 minutes de contact par séjour dans la seringue, on l'inocule.

Technique : on épile une partie du flanc de l'animal. On choisit une région bien propice qui permet une lecture facile. L'animal étant maintenu par un aide, on pince la peau entre le pouce et l'index. Cette surface ferme et bien maintenue est prête pour l'injection intra-dermique. On utilise une seringue au 1/20è de cm3 dite "Tuberculine" et une aiguille de 6/10è, la plus courte possible n'ayant pas tendance à se courber. L'aiguille est enfoncée sous le derme de façon à avoir une papule bien visible. On injecte lentement 1/10è de ml de tuberculine brute humanobovine diluée au 1/10è.

Lecture : elle se fait 24 à 48 heures. La positivité est déclarée s'il y a escarre s'affirmant le 2ème jour.

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

. Infection expérimentale à bacille tuberculeux de virulence normale : les cobayes meurent en 4 ou 6 semaines. 10 à 14 jours après l'injection de bacille virulent, un nodule puis une ulcération se développe au point d'inoculation. L'ulcère reste ouvert jusqu'à la mort. A l'autopsie, on constate une hypertrophie des ganglions trachéo-bronchiques, régionaux et lombo-aortiques. A la coupe, on voit qu'ils sont remplis d'une substance nécrotique qui a l'apparence du fromage "caseum). De petites lésions nodulaires dans les poumons, le foie et la rate.

. Infection expérimentale à bacille tuberculeux de virulence diminuée : deux éventualités se présentent :

* tuberculose généralisée mais spontanément regressive : la mort peut survenir au cours de la phase d'extension initiale (premiers mois). La regression peut être partielle une lésion viscérale unique évoluant à son propre compte. La regression peut être complète.

* Tuberculose non extensive : atteinte ganglionnaire locale à tendance regressive.

Inoculation aux autres animaux de laboratoire :

Le lapin : l'inoculation au lapin permet de différencier Mycobacterium tuberculosis avec une tuberculose spontanément regressive de Mycobacterium bovis qui provoque une tuberculose d'évolution mortelle. On injecte 0,01 mg sous un volume de 1 ml dans les veines marginales de l'oreille.

La souris : la souris est l'animal de choix pour l'étude de la chimiothérapie antituberculeuse. Son inoculation permet l'identification de Mycobacterium kansasii, Mycobacterium marinum et Mycobacterium ulcerans. On inocule 0,1 à 1 mg sous un volume de 0,2 ml dans l'une des veines marginales de la queue.

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

C - Identification des Mycobacteries responsables de tuberculose (33).

1). Généralités :

L'identification des Mycobacteries responsables de la tuberculose repose sur :

- les caractères morphologiques et culturaux
- les caractères biochimiques et enzymatiques
- l'inoculation aux animaux de laboratoire.

Caractères culturaux et morphologiques : la rapidité d'apparition des colonies est un critère fidèle. Sauf exception, les colonies de Mycobacterium tuberculosis apparaîssent en 14 à 21 jours, tandis que celles de Mycobacterium bovis n'apparaîssent jamais à l'isolement en moins de 28 jours. Mycobacterium africanum apparaît plus lentement (28 à 42 jours voire même 60 jours).

La morphologie et la pigmentation des colonies sont-elles aussi décisives. Il faut opposer les colonies bien développes (eugoniques) rugueuses sèches et de teinte crème-beige de Mycobacterium tuberculosis aux colonies mal développées (dysgonique) lisses, bombées, humides et blanches de Mycobaterium bovis et aux colonies dysgoniques rugueuses plates et mâtes de Mycobacterium africanum.

Quand au B.C.G. variant de Mycobacterium bovis, il donne des colonies similaires à celles de Mycobacterium tuberculosis. Son identification repose donc sur des tests biochimiques. Elle est orientée par l'origine du prélèvement (adénopathie axillaire ou suppuration chronique du bras ou de l'avant-bras chez un vacciné récent) (22).

Caractères biochimiques et enzymatiques : La discrimination entre les Mycobacteries atypiques et les bacilles de la tuberculose BCG compris repose sur l'étude de :

. l'activité catalasique à 22°C et après 15 minutes de chauffage à 70°C. Cette étude doit être effectuée sur des cultures jeunes et abondantes (moins de 1 mois).

. l'activité nitrate réductasique doit également être effectuée sur une culture jeune et abondante.

. l'étude de la production de niacine qui doit être effectuée sur une culture abondante suffisamment âgée pour que la production soit suffisante, c'est-à-dire d'un mois à un mois et demi.

. l'étude de la sensibilité à l'hydrazide de l'acide thiophène carboxylique (TCH) et aux principales substances antibiotiques dont l'acide para-amino-salicylique (PAS) et la cyclosérine.

Les Mycobacteries atypiques sont comme Mycobacterium tuberculosis et à l'inverse du Mycobacterium bovis et Mycobacterium africanum et du BCG résistantes au TCH. Elles sont également résistantes à la plupart des antibiotiques antituberculeux usuels, notamment aux PAS à l'inverse des bacilles de la tuberculose.

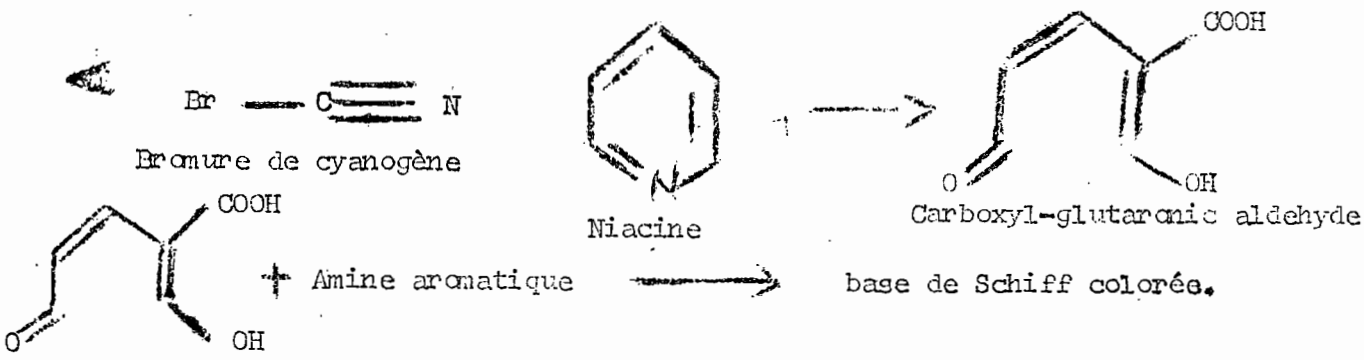
Quant à la résistance isolée à la cycloserine, elle est presque pathognomonique du BCG (22).

2). Techniques d'identification.

Recherche de la niacine : (6).

La niacine est un composant des coenzymes NAD et NADP qui jouent un rôle essentiel dans les réactions d'oxydo-réduction des organismes vivants. Chez l'homme et d'autres animaux, elle n'est pas synthétisée et doit être apportée à l'alimentation. Pour certains organismes comme les bacteries qui exigent la niacine comme facteur de croissance, sa fonction physiologique est d'être un précurseur de la biosynthèse des coenzymes. Chez les mycobacteries le NAD et le NADP paraîssent être synthétisés soit à partir de l'acide nicotinique soit à partir de l'acide quinoléique endogène. Dans ces bacteries le tryptophane n'est pas un précurseur de la niacine et la chaîne de synthèse est similaire à celle décrite pour bacillus subtilis.

Habituellement la niacine est mise en évidence en la faisant réagir avec le bromure de cyanogène en présence d'une amine aromatique. Le produit de la réaction réagit avec l'amine aromatique en donnant un composé coloré. (33).



Dans la méthode des bandelettes réactives, le Bromure de cyanogène est remplacé par du chlorure de cyanogène formé au cours de la réaction :

Chloramine T + Thiocyanate de potassium ⟶ Chlorure de cyanogène.

Amines aromatiques :

Aniline	jaune
Benzidine	violet rose
Ortho-toluidine	rouge
P.A.S.	jaune
P.A.B.	jaune.

Matériels : tubes à essai à vis stériles 16 x 125 mm.

Réactifs :
Eau distillée stérile ou solution saline physiologique
Solution à 4 % d'aniline
Ajouter 40 ml d'aniline incolore à 960 ml d'alcool éthylique à 95 %
Solution à 10 % de bromure de cyanogène
Dissoudre 5 gr de bromure de cyanogène dans 50 ml d'eau distillée. Conserver dans un flacon au frigidaire. Si un précipité se forme, chauffer à la température de la pièce pour le mettre en solution.

Technique :

Méthode I : A une culture d'au moins 4 semaines sur milieu de LOWESTEIN-JENSEN, ajouter 1 ml d'eau distillée ou de solution saline physiologique stérile. Si la culture est confluente, briser la masse cellulaire pour faciliter l'extraction du milieu (la niacine est extracellulaire et s'accumule dans le milieu).

Incliner le tube de façon à ce que le liquide couvre toute la surface du milieu. Laisser l'extraction se faire pendant au moins 60 minutes.

Prélever 0,5 ml de l'extrait et transférer dans un tube à essai à vis.

Ajouter 0,5 ml de la solution d'aniline. Ceci doit être incolore.

Puis ajouter 0,5 ml de la solution de bromure de cyanogène.

On doit observer la formation d'une couleur jaune immédiatement si la réaction est positive.

Dans le cas des bandelettes réactives, procéder comme pour la méthode I jusqu'à extraction. Puis introduire dans le tube les bandelettes avec la flèche dessous. Visser le tube immédiatement. Le développement d'une couleur jaune dans le liquide indique une réaction positive.

Recherche de la catalase.

Toutes les mycobacteries synthétisent des catalases sauf certaines souches isoniazido-résistantes de Mycobacterium tuberculosis et Mycobacterium bovis. Les catalases sont des enzymes solides intracellulaires. Il en existe différents types que l'on peut distinguer en particulier par leur sensibilité thermique.

Matériels :
Pipettes Pasteur ou pipettes de 1 et 5 ml stériles, tubes à essai à vis, bain - marie ou bloc sec de température, anse.

Réactifs :
Solution à 30 % (ou 110 V) d'eau oxygénée (superoxol, perhydrol). Conserver au frigidaire.

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

Substrat : immédiatement avant d'utiliser, mélanger des volumes égaux d'eau oxygénée et de solution de Tween 80.

Tampon phosphate M/15, pH 7. Mélanger 61,1 ml de M/15 phosphate disodique (9,47 de Na_2HPO_4 dans 1000 ml d'eau) avec 38,9 ml de M/15 phosphate monopotassique (9,07 g de KH_2PO_4 dans 1000 ml d'eau distillée).

Technique :
Test qualitatif à la température de la pièce : ajouter 1 ou 2 gouttes du mélange de Tween 80 - eau oxygénée à la culture sur milieu stérile. On doit observer la formation de bulles, ce qui peut prendre jusqu'à 5 minutes.

Test à pH 7 : 68°C et à la température du laboratoire : avec une pipette stérile, mettre 0,5 ml de tampon phosphate M/15 pH7 dans 2 tubes à essai à vis (16 x 125mm). Avec une anse, prélever la masse bactérienne du milieu solide et l'émulsionner dans le tampon phosphate.
Placer un des tubes dans un bain-marie chauffé à 68°C pendant 20 minutes.
Retirer le tube du bain-marie et laisser refroidir à la température de la pièce.

Ajouter 0,5 ml du mélange Tween 80 - eau oxygénée dans chaque tube.
On doit observer la formation de bulles apparaîssant à la surface du liquide.
Attendre jusqu'à 20 minutes avant de considérer le résultat comme négatif.

Test de la réduction des nitrates. (9).

VIRTANEN a étudié la capacité des mycobacteries à réduire le nitrate en nitrite. Il a observé que les mycobateries diffèrent quantitativement dans leur pouvoir de réduction, ce qui pourrait être utilisé pour leur identification. En particulier Mycobacterium tuberculosis réduit fortement les nitrates alors que Mycobacterium bovis donne une réaction négative ou très faible.

Matériels : tubes à essai à vis (16 x 125 mm), pipettes Pasteur stériles ou pipettes de 1 ml, anse, bain-marie à 37°C ou bloc sec à température constante.

Réactifs :
Substrat : 0,01 M nitrate de sodium dans 1/45 M tampon phosphate :

$NaNO_3$	0,85 g
KH_2PO_4	0,117 g
Na_2PO_4 12 H_2O	0,487 g
Eau distillée.....	1000 ml.

Réactif n°1 : une dilution à 1/2 d'acide chlorhydrique dans l'eau (10 ml HCl + 10 ml H_2O).

Réactif n°2 : 0,2 mg de sulfanilamide dans 100 ml d'eau distillée.
Réactif n°3 : 0,1 g de bichlorhydrate de N-(1-naphthyl- éthylène-diamine dans 100 ml d'eau distillée.

Conserver le substrat et les réactifs à l'obscurité au frigidaire. Si un précipité se forme ou s'il y a changement de couleur, jeter.

Technique :
Mettre dans un tube à essai stérile 2 ou 3 gouttes d'eau distillée.
Emulsionner dans l'eau une anse pleine de culture prélevée à la surface du milieu solide.
Ajouter 2 ml de la solution $NaNO_3$
Agiter pour mieux mélanger et incuber à 37°C au bain-marie pendant 2 heures.

Enlever du bain-marie et ensuite ajouter 1 goutte de réactif n°1, 1 goutte de réactif n°2, 1 goutte de réactif n°3.
On doit observer un virage à la couleur rouge si la réaction est positive. Dans le cas contraire soit la réaction est négative soit les nitrates ont été réduits jusqu'au stade d'azote et dans ce cas ajouter de la poudre de zinc qui catalyse la réduction des nitrates en nitrites. Si la couleur rouge apparaît c'est la réaction qui est réellement négative. Si la solution reste incolore c'est que la réaction est positive car tous les nitrates ont été réduits jusqu'au stade d'azote.

Vitesse de croissance.

Prelever avec une spatule une parcelle de la culture sur milieu solide.
Bien émulsionner dans l'eau distillée stérile.
Préparer des dilutions et ensemencer des milieux de LOWESTEIN-JENSEN de façon à obtenir des colonies isolées.
Incuber à l'étuve à 36 - 37°C.
Observer pendant 3 à 7 jours et ensuite chaque semaine.

Résultat : les mycobacteries qui poussent en moins de 3 jours sont des mycobacteries à croissance rapide (groupe IV).

Production de pigment.

Préparer des dilutions d'une suspension bactérienne de façon à obtenir des colonies isolées.
Ensemencer les tubes de culture en double. Marquer un tube L (lumière) et l'autre O (obscurité). Protéger le tube O de l'action de la lumière.
Incuber les cultures à 36-37°C. Quand la croissance est visible dans le tube L, illuminer le tube O pendant 1 heure sous une lampe à fluorescence placée à environ 30 cm du tube de culture. Remettre à l'étuve et observer le lendemain.

Résultats : si la culture L est jaune et la culture O est aussi jaune avant illumination : la souche est scotochromogène (groupe II). Si la culture L est incolore et la culture O se maintient sans couleur après illumination c'est une souche non chromogène. Si la culture est incolore avant illumination et devient jaune après illumination c'est une souche photochromogène (groupe I).

3). Principaux caractères différentiels des mycobacteries tuberculeuses et des mycobacteries atypiques.

Mycobacteries tuberculeuses :

a. Mycobacterium tuberculosis : décrit par KOCH en 1882, il est le plus souvent responsable de tuberculose pulmonaire chez l'homme mais peut donner des lésions diverses. Il est l'espèce type du genre néotype A.T.C.C. 25291.

Sur le milieu de LOWESTEIN-JENSEN sa croissance est lente et donne des colonies rugueuses sèches teinte crème-beige eugoniques. Il produit de forte quantité de niacine, a une catalase, une péroxydase et une nitrate réductase. Il est résistant au TCH sensible au Pyrazinamide (P.Z.A), sensible au P.A.S.

b. Mycobacterium bovis (8) : décrit par KARLSON et LESSEL en 1870 il est l'agent de la tuberculose bovine. Peut provoquer la tuberculose pulmonaire chez l'homme. Croissance lente sur LOWESTEIN-JENSEN, il donne des colonies lisses, blanches dysgoniques. Il est niacine (-), catalase +, nitrate (-). Il est sensible au TCH et résistant au PZA.

c. Mycobacterium africanum (12,25) : décrit en 1968 par M. CASTETS et coll. il est responsable de tuberculose chez les noirs africains de l'Afrique centrale et occidentale. Il est de croissance très lente sur LOWESTEIN-JENSEN mais stimulé par l'addition de pyruvate de sodium au milieu. Donne des colonies dysgoniques plates de teinte mâte sur LOWESTEIN-JENSEN. Il a des caractères intermédiaires entre mycobacterium tuberculosis et mycobacterium bovis. On distingue trois types : type Dakar, type Yaoundé et le type Rwanda avec Rwanda I et Rwanda II.

Mycobacteries	Catalase		Nitrates	Niacine	Cobaye	Résistance à :		
	22°C	70°C				TCH	PAS	C.S.
M. atypique	+++	+	+ ± ou 0	0	0	+	+	+ ou 0
M. tuberculosis	+	0	+	+	+	+	0	0
M. africanum	+	0	±	±	+	0	0	0
M. bovis	+	0	-	0	+	0	0	0
B.C.G.	+	0	-	0	0	0	0	+

TABLEAU 1 : Principaux caractères de discrimination entre les Mycobacteries atypiques, les bacilles tuberculeux et le B.C.G.

Espèces	Niacine	Nitrate TACQUET	Nitrate VIRT	Croissance sur TCH	LEBECK prof.	P.Z.A ase	Stimul Pyrw.	Gluco-sidase
M. bovis	0	0	0	0	+	0	+	0
(type Dakar	0 à +	0	0	0	+	0	+	0
(type Yaoundé	0	+	0	0	+	0	+	0
(Rwanda I	0	+	0	+	+	0	+	0
(Rwanda II	0	+	+	+	+	0	+	0

TABLEAU 2 : Caractères de différenciation entre les trois types de Mycobacterium africanum et Mycobacterium bovis.

Mycobacteries atypiques.(22).

a. Groupe I : Mycobacteries photochromogènes.

Ce groupe comprend deux espèces dont les caractères différentiels sont précisés dans le tableau 3.

Mycobacterium kansasii : responsable d'infections pulmonaires, rarement commensal. A la coloration de Ziehl-Neelsen il apparaît souvent comme un gros bacille tigré. En général sensible à la Rifampicine, l'Ethambutol, la Streptomycine, l'Ethionamide la Cycloserine et le Tb 1.

Mycobacterium marinum (4) : responsable d'infections cutanées, rarement isolé chez l'homme. Mycobacterie à croissance rapide, ne cultive à l'isolement qu'à 30°C ne peut donc être isolé à 37°C. Il est sensible à la Rifampicine, l'Ethambutol, la Cycloserine, l'Ethionamide et la Kanamycine (Tableau 3).

Espèces	Origine du prélèvement	Croissance Vitesse	Croissance Températures 30	37	42	Nitrates	Tb 1 (ml) 2	50
M. kansasii	pulmonaire ganglionnaire	14 jrs	+	++	±	+	S	S
M. marinum	cutané	3 jrs	+++	± à 0	0	0	R	R

TABLEAU 3 : Caractères différentiels des mycobacteries atypiques du groupe I.

b. Groupe II - Mycobacteries scotochromogènes.

Ce groupe comprend quatre espèces :
Mycobacterium scrofulaceum : décrit en 1956 a été isolé initialement d'adénites cervicales. Mycobacterie à croissance lente donnant de petites colonies lisses jaune-orange. On distingue trois types sérologiques.

Mycobacterium flavescens : mycobacterie non pathogène, colonies assez caractéristiques, rugueuses, orange vif. Vitesse de croissance rapide (7 jours) pousse sur gelose ordinaire.

Mycobacterium gordonae (anciennement mycobacterium aquae) non pathogène isolé fréquemment comme contaminant des produits pathologiques.

Mycobacterium szulgai : espèces pathogène, identifiée en 1972. L'identification repose sur la mise en évidence d'une nitrate réductase forte sur une hydrolyse tardive du Tween 80 et sur une résistance à la Cycloserine. Bonne sensibilité à la Rifampicine, L'Ethionamide, la Streptomycine, l'Ethambutol et une résistance partielle à l'INH.

Espèces	Croissance				Aspect des colonies	Nitrate	Urèase	Phosphatase	Tb_1
	Vitesse	Température							
		30°	37°	42°					
M. scrofulaceum	21 jrs	+	++	0	S dysgon.	0	+	0	S
M. gordonae	14 jrs	++	+	0	S. eugon.	0	+ ou 0	0 ou +	R
M. flavesc.	7 jrs	++	++	+	R. eugon.	+	0	0	R

TABLEAU 4 : Caractères différentiels des Mycobacteries du groupe II.

c. Groupe III : Mycobacteries non photochromogènes.

Ce groupe comprend huit espèces dont quatre sont pathogènes.
Mycobacterium avium : individualisation en 1890, agent de la tuberculose chez les oiseaux. Donne à la température optimum de 41 - 43°C des colonies blanchâtres lisses dysgoniques se pigmentant souvent en jaune en vieillissant. Résistant à tous les antibiotiques antituberculeux sauf la Cycloserine. Fréquemment responsable d'infections pulmonaires dans certains pays. Il est très proche de Mycobacterium intracellulare.

Mycobatrium simiae : a été isolé pour la première fois en 1965 chez le singe puis chez l'homme comme commensal et dans quelques cas comme responsable d'une infection pulmonaire. Donne des colonies faiblement photochromogènes qui produisent une quantité importante de Niacine. Résistant à tous les antibiotiques antituberculeux sauf la Cycloserine.

Mycobacterium xenopi (7,24) : isolé en 1957 à partir des lésions d'un crapaud, il est responsable d'infections pulmonaires chez l'homme mais peut être isolé comme simple commensal. Colonies caractéristiques : petites, têtes d'épingle, elles se développent très lentement parfois en plus de deux mois à l'isolement. Thermophiles, leur croissance est optimale à 45°C et encore possible à 52°C. Scotochromogènes, elles sont pigmentées d'abord en jaune-pâle puis virent à l'orange en vieillissant. L'examen microscopique donne des bacilles longs et fins (chevelus) de plus de 10 µ de long coloré en rose, eux aussi caractéristique. Il est sensible in vitro aux antibiotiques antituberculeux : Streptomycine, Kanamycine, Ethionamide, Cycloserine et parfois Rifampicine et Ethambutol et souvent même à l'INH.

Mycobacterium ulcerans : responsable d'infections cutanées dans les pays tropicaux.

Mycobacteries non pathogènes du groupe III : Mycobacterium gastri ou terrae ou triviale, Mycobacterium johnei. (voir tableau 5). (18).

d. Groupe IV : Mycobacteries à croissance rapide.

Ce groupe comprend de très nombreuses espèces qui peuvent être isolées du milieu extérieur (terre, eau, poussière, etc). Seules les Mycobacteries du complexe M. fortuitum présentent un intérêt clinique car potentiellement pathogènes (voir tableau 6).

Espèces	Ziehl	CROISSANCE Vitesse	30°	37°	42°	Colonies	Nitrates	Uréase	Béta galac-	Phospha-	Ethambu-
Groupe aviaire											
. avium	b. courts 1 U	21 j	+	+	++						R
. intracellul.		14 j	+	++	0						
. xenopi	b. longs et fins (10 µ)	30 j (30-60 j à l'isolement)	+	+	+	S dysgon. scotoch.	0	0	0	0	R
Groupe radish											
. gastri ou terrae ou triviale	id à M. tuberculosis	7-14 j	++	+	+	S ou R	+	0	+	+	S
Ulcerans	id à M. tuberc.	30 j	++	± à 0	0	S	0	0	0	0	R
M. Johnei enterite hypertrophiante des bovidés	Pas de culture sur LOEWENSTEIN - JENSEN										

TABLEAU 5 : Caractères différentiels des Mycobacteries atypiques du groupe III.

Une espèce très proche scotochromogène, niacine fortement positive a été décrite à Cuba en 1971 : Mycobacterium Habana = M.simiae.

Espèces	Catalase à 70°	Nitrate réductase	Phosphatase	Uréase	Béta galactosidase
terrae	+	+	+	0	+
triviale	+	± à 0	+	0	0
gastri	0	0	+	+	0

Caractères différentiels des Mycobacteries atypiques du complexe terrae.

Espèces	Température de croissance			Aspect des colonies	Nitrates	C. F. A.	Béta galactosidase
	30°	37°	42°				
fortuitum	+	+	+	S(verte)	+	+	+
chelonei	+	+	± à 0	S ou R	0	0 (à +)	+
dicrhoferi	+	+	0	S pigmentation beige brunâtre.	+	+	0
vaccae aurum parafortuitum	+	+	0	S chromogène	+	+	+
phlei	+	+	+ (+ à 52°)	R photochromogène	+	+	0

TABLEAU 6 : Caractères différentiels des Mycobacteries atypiques du groupe IV.

D - Tests de sensibilité aux antibiotiques.

Il existe plusieurs méthodes mais celle dite méthode des proportions de CANETTI RIST et GROSSET est la plus tutilisée et a été codifiée (11).

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

2. Préparation des dilutions bacillaires - ensemencement :

a). Antibiogramme indirect.

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

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

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

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

b). Antibiogramme direct.

Le frottis étant fait on place 3 à 4 ml de crachat dans un mortier stérile. On y ajoute une quantité égale de NaOH à 6 % et 3 gouttes de teinture de tournesol. Le mélange est broyé au pilon pendant 1 à 2 minutes puis enveloppé d'un papier stérile et placé à l'étuve à 37°C pendant 50 minutes. Il est ensuite neutralisé avec quelques gouttes d'acide sulfurique à 15 %. Le produit ainsi obtenu n'est pas centrifugé il constitue la dilution I.

Les dilutions à préparer à partir de là et les dilutions à ensemencer dépendent du nombre de bacilles visibles sur le frottis à l'examen microscopique. Elles sont indiquées dans le tableau ci-dessous :

Nombre de bacilles visibles à l'examen microscopique (objectif à immersion)	DILUTIONS A ENSEMENCER	
	Sur les tubes temoins	Sur les tubes avec antibiotiques
Moins de 1 bacille par champ	Pas de titrage direct	
de 1 à 10 bacilles par champ	1 , 10^{-2}, 10^{-3}	1 et 10^{-2}
plus de 10 bacilles par champ	10^{-1} et 10^{-2}	10^{-1} et 10^{-2}

TABLEAU : Titrage direct : Dilution à ensemencer en fonction du nombre de bacilles visibles à l'examen microscopique.

Le mode de préparation des dilutions, le nombre de tubes de milieu à ensemencer par dilution, le volume de la semnece par tube enfin la manipulation des tubes après ensemencement sont exactement les mêmes.

3. Lecture des résultats , interprétation.

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

La lecture consiste à :

- compter le nombre de colonies apparues dans les différents tubes.
- à partir de là déduire la proportion des bacilles résistants qui existent dans la souche.
- confronter cette proportion avec la proportion critique adoptée pour l'antibiotique correspondant afin de voir si elle se situe en deçà (souche sensible) ou au-delà (souche résistante).

Calcul de la proportion de bacilles résistants contenus dans la souche : exemple : test indirect pour l'I.N.H.

Dilution	Tubes temoins	Tubes INH concentration Mcg/ml		
		0,1	0,2	1
10^{-3}	∞	∞	∞	80
10^{-5}	30 36	34	4	1

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

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

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

Avec la concentration 0,1 Mcg/ml on trouve 34 colonies donc : $\frac{34}{33}$ = 100 % des bacilles de la souche sont résistants à l'INH à concentration de 0,1 Mcg/ml ou encore la souche renferme 100 % de bacilles résistants à 0,1 Mcg/ml d'INH.

Avec la concentration 0,2 Mcg/Ml on trouve 4 colonies donc $\frac{4}{33}$ = 12 % des bacilles de la souche sont résistants à 0,2 Mcg/ml d'INH.

Avec la concentration 1 Mcg/ml une colonie donc $\frac{1}{33}$ = 3 % de bacilles résistants à l'INH à 1 Mcg/ml.

La proportion critique étant pour l'INH à 0,2 Mcg/ml égale à 1 % et la souche testée résistante à 12 %, elle est donc résistante à l'INH.

4. Résultats des tests de sensibilité.

Une souche normale de bacilles tuberculeux est sensible aux principaux antibiotiques antituberculeux (Isoniazide, Rifampicine, Ethambutol, Streptomycine, Ethionamide, P.A.S). Les souches BCG sont naturellement résistantes à la D cycloserine.

Les mycobacteries atypiques sont résistantes au P.A.S.

Mycobacterium bovis a une résistance naturelle partielle au P.A.S. et Tb_1 totale au Pyrazinamide.

IV - MEDICAMENTS ANTITUBERCULEUX

I - BASES BACTERIOLOGIQUES DES TRAITEMENTS DE LA TUBERCULOSE (40).

a. Les différentes populations bacillaires des lésions tuberculeuses.

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

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

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

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

b. Efficacité des principaux antibiotiques antituberculeux.

La Streptomycine, l'Isoniazide et la Rifampicine sont les antibiotiques les plus efficaces sur les bacilles à multiplication active dans les parois cavitaires (première population). Le Pyrazinamide, l'Isoniazide et la Rifampicine sont les plus efficaces sur les bacilles qui sont dans un environnement acide à l'intérieur des macrophages (deuxième population). Seule la Rifampicine est efficace sur les bacilles à multiplication ralentie au sein des foyers caséeux.

Antibiotiques	Activité sur les bacilles		
	à multiplication active	à pH acide	à pH neutre
Streptomycine	+++	0	0
Isoniazide	++	+	0
Rifampicine	++	+	+
Ethambutol	±	±	0
Pyrazinamide	0	++	0

Activité des principaux antibiotiques antituberculeux selon l'état métabolique des bacilles.

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

± = activité bactériostatique.

0 = pas d'activité bactériostatique.

II - LA RESISTANCE DU BACILLE TUBERCULEUX ET SES CONSEQUENCES.

Comme les autres bacteries, le bacille tuberculeux est capable d'acquérir une résistance aux différentes drogues antibacillaires. Ces phénomènes sont fondamentaux pour la conduite du traitement (16).

a). La résistance du bacille tuberculeux : cette résistance est actuellement considérée comme de nature chromosomique. Aucune résistance plasmidique n'a jusqu'ici été démontrée ou suspectée.

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

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

1 p. 10^5 bacilles pour l'Isoniazide

1 p. 10^5 bacilles pour la Streptomycine

1 p. 10^3 bacilles pour l'Ethionamide

1 p. 10^6 bacilles pour l'Ethambutol.

Mais seulement de 1 p. 10^8 pour la Rifampicine.

Le nombre de bacilles présents dans les lésions donc de mutants résistants, dépend du type anatomique de celles-ci:

- les cavernes évolutives sont très riches en bacilles : une caverne de 2cm de diamètre peut en contenir 10^7 à 10^9.

- un foyer caséeux ouvert dans les bronches, moins bien oxygéné contient environ 10^4 à 10^6.

Les nodules et autres foyers caséeux fermés sont au contraire pauvres en bacilles : 0 à 10^3.

Une caverne de 2 cm de diamètre due à une souche normale peut donc contenir d'emblée :

10^2 à 10^4 bacilles réistants à l'Isoniazide
10^2 à 10^4 bacilles résistants à la Streptomycine
10^4 à 10^6 bacilles résistants à l'Ethionamide
10 à 10^3 bacilles résistants à l'Ethambutol
0 à 10 bacilles résistants à la Rifampicine.

D'où l'explication du grand risque de sélection de mutants résistants en cas de traitement insuffisant ou mal adapté.

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

b). Prévention de la résistance :l'émergence de souches résistantes étant la conséquence directe de la sélection par les antibiotiques des mutants présents dans les populations bacillaires, certaines règles sont à respecter scrupuleusement dans la prescription de ces drogues;

- éviter la monothérapie. En effet compte-tenu de ce qu'on vient de voir ci-dessus, une monothérapie sera suivie inéluctablement de la sélection d'une souche résistante dans une lésion riche en bacilles. Par contre la prescription de deux antibiotiques réduit considérablement cette possibilité si du moins la souche infestante est normale : exemple : dans une souche normale la proportion de mutants résistants à l'INH et la Streptomycine est pour chaque antibiotique 10^{-5}. La proportion de mutants résistants à ces deux antibiotiques est donc 10^{-10} en raison de l'indépendance des mutations ; dans une caverne contenant 10^{7} à 10^{9} bacilles, il est donc peu probable qu'il existe un mutant double. Mais ce mode de prévention n'est efficace que si la souche est normale ; si au contraire elle comporte un nomble plus élevé de mutants, la prescription de deux antibiotiques peut-être insuffisante. D'où la nécessité de :
- pratiquer les tests de sensibilité in vitro et dans leur attente de prescrire de préférence trois antibiotiques. Pour les antibiotiques mineurs dont le taux de mutation est plus élevé, il est impératif d'administrer même vis-à-vis d'une souche normale, trois antibiotiques simultanément pour éviter la sélection.

D'où deux règles fondamentales :
- la nécessité de l'antibiogramme
- la nécessité aussi de prescrire une association médicamenteuse comportant au moins deux antibiotiques majeurs et plutôt trois au début du traitement.

III - LES DIFFERENTS ANTITUBERCULEUX.

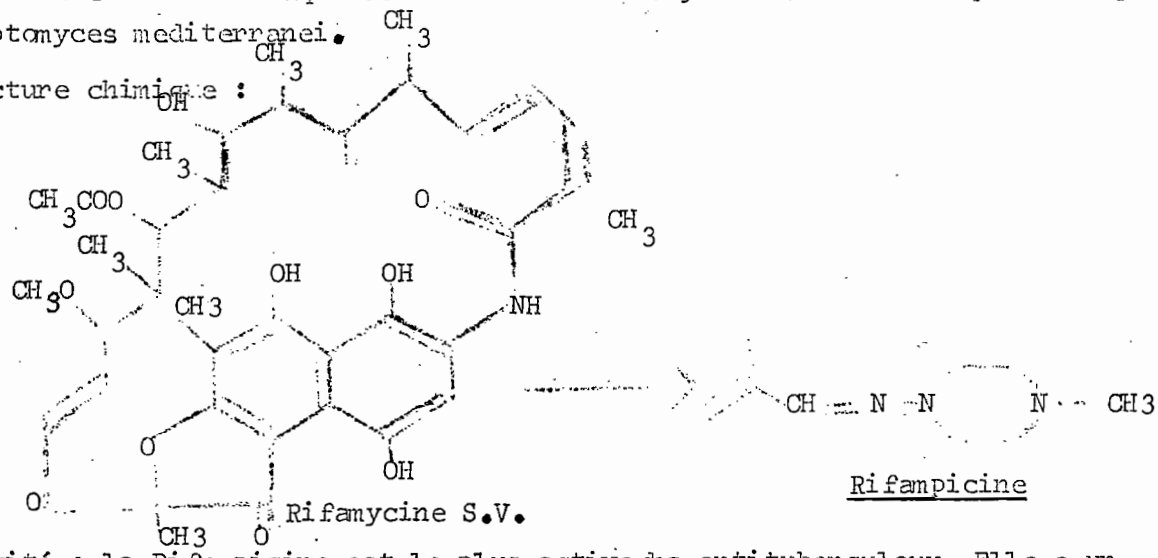
La hiérarchie des antituberculeux est établie en tenant compte des phénomènes de résistance du bacille tuberculeux à ces divers produits ainsi que des propriétés pharmacocinétiques de ceux-ci.

Ainsi on distingue les médicaments de première ligne qui regroupent la Rifampicine, l'Isoniazide ; les médicaments de deuxième ligne regroupant l'Ethambutol et la Streptomycine ; les médicaments de troisième ligne : la Kanamycine, l'Acide para-amino-salicylique (P.A.S), la Viomycine, la Cycloserine, la Pyrazinamide, la Capréomycine, le Thiosemicarbazone (Thioacétazone ou Tb_1).

a). Les médicaments de première ligne :

La Rifampicine : La Rifampicine est un dérivé semi-synthétique de la Rifamycine SV qui provient de la réduction de la Rifamycine S, issue de la transformation en solution aqueuse aérée de la Rifamycine B substance produite par Streptomyces mediterranei.

Structure chimique :



Activité : la Rifampicine est le plus active des antituberculeux. Elle a un pouvoir bactéricide non seulement sur les populations à multiplication active, mais aussi sur les formes intracellulaires et intracavitaires à multiplication lente des bacilles tuberculeux. La proportion de mutants résistants est très faible 10^{-8}.

Pharmacocinétique :

- diffusion tissulaire et intracellulaire bonne ;
- taux sérique après 600 mg per os 10 -20 Mcg/ml ;
- demi-vie variant de 1h.30 à 5 h ;
- liaison protéique : 75-85 % ;
- coefficient de dépassement moyen CDm = 74 ($CDm = \frac{\text{taux sérique moyen}}{C.M.I.}$

C.M.I. =concentrations minima inhibitrices).

C.M.I. de l'ordre de 0,1 Mcg/ml.

- élimination hépatique ;
- traverse mal la barrière hémo-méningée.

Posologie, voie d'administration, spécialités:

Posologie 600 mg/jour chez l'adulte et 12 à 15 mg/kg chez l'enfant à jeun en une prise quotidienne.

Voies d'administration : voie orale ou intraveineuse (perfusion de 1 h.30) à la dose quotidienne de 600 mg chez l'adulte et 10 à 20 mg chez l'enfant.

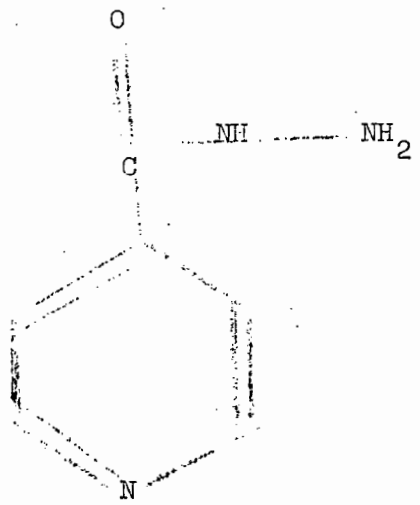
Spécialités : Rifadine*, Rimactan*.

Toxicité :

- inhibe par compétition l'entrée dans l'hépatocyte divers anions organiques choléphiles dont la bilirubine et surtout la bromesulfonephtaléine (BSP). D'où arrêt de l'antibiotique un à deux jours avant l'épreuve.
- ictères en association avec l'INH par induction enzymatique ; en effet l'induction enzymatique entraîne une formation de métabolites instables de l'INH toxiques causes de l'ictère. D'où arrêt de l'INH et non la Rifampicine en cas d'ictère.
- insuffisance rénale aiguë, purpura thrombopénique, anémie hémolytique, immuno-allergie.
- interactions avec les hormones.

L'Isoniazide : c'est l'hydrazide de l'acide isonicotinique (INH) décrit en 1912 par MEYER et NALLY. Propriétés antituberculeuses connues en 1952.

Structure chimique :



Activité : pouvoir bactéricide sur le bacille tuberculeux, à action spécifique. Actif sur les formes à multiplication active et sur les formes intracellulaires. Mais pas d'action sur les formes cavitaires à multiplication lente.

La proportion de mutants résistants est de 10^{-5}. La C.M.I. égale à 0,04 à 0,05 Mcg/ml.

Pharmacocinétique : excellente diffusion tissulaire et dans les macrophages. Traverse les méninges.

Taux sérique après 200 mg per os = 1,6 Mcg/ml à la 3ème heure et 0,7 à la 6ème h.
Fixation protéique : 20 à 30 %.
C.D.m. = 25-75.

L'Isoniazide est métabolisé au niveau des hépatocytes qui le transformen en acétyl-isoniazide inactif mais très toxique pour le foie. Cette dégradation se fait plus ou moins rapidement chez les sujets ce qui retentit sur le taux sérique. On définit ainsi l'indice d'inactivation $I3 = \frac{C_3}{} + 0,6$ où C_3 = concentration sérique en INH actif exprimé en mcg/ml et mesurée 3 heures précises après la prise buccale du médicament; D = dose d'Isoniazide buccale exprimé en mg/kg.

On distingue ainsi :
$I_3 < 0,40$: inactivateur rapide
$I_3 > 0,65$: inactivateur lent
$0,40 < I_3 < 0,65$: inactivateur indéterminé.

L'élimination est surtout urinaire sous trois formes : Isoniazide libre, dérivés acétylés et hydrazones.

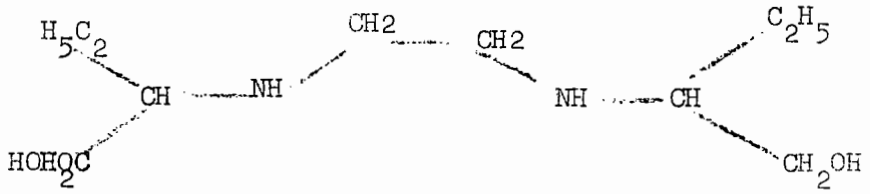
Posologie, voies d'administraion et spécialités : l'Isoniazide (Hexoniazide, Rimifon, Iso-benzacyl) s'administre habituellement par voie orale à la dose quotidienne de 5 mg/kg chez l'adulte, 10 mg/kg chez l'enfant et le nourrisson.

Toxicité : l'Isoniazide est le moins toxique des antituberculeux. Cependant divers types d'accident ont été signalés :
- polynévrites par hypovitaminose B_6
- algo-dystrophie des épaules
- accidents neuro-psychiques très rares,
- gastrite, atteinte hépatique.

b). Les médicaments de deuxième ligne.

L'Ethambutol.

Structure chimique : ce produit est l'isomère dextrogyre du 2, 2-(éthylène diamino)di 1-butanol.



Activité : il est bactériostatique et inhibe les bacilles tuberculeux à la concentration de 1 à 2 mcg/ml. Le taux de mutation est relativement faible 10^{-6}. Actif sur les formes à multiplication active et intracellulaires.

Pharmacocinétique : bonne diffusion tissulaire ; le pic sérique atteint 4 à 5 mcg/ml. ; CDm = 4,7 ; la demi-vie est de 6 à 8 heures chez les sujet normal; la fixation protéique est négligeable ; élimination totale réno-urinaire.

Posologie, voies d'administration et spécialités : l'Ethambutol (Dexambutol, Myambutol) est habituellement utilisé par voie orale à raison de 25 mg/kg pendant les deux premiers mois du traitement, puis 15 mg/kg ensuite. On peut aussi l'employer par voie intramusculaire ou intraveineuse à la même posologie. En cas d'insuffisance rénale majeure, on administre cette dose toutes les 48 heures.

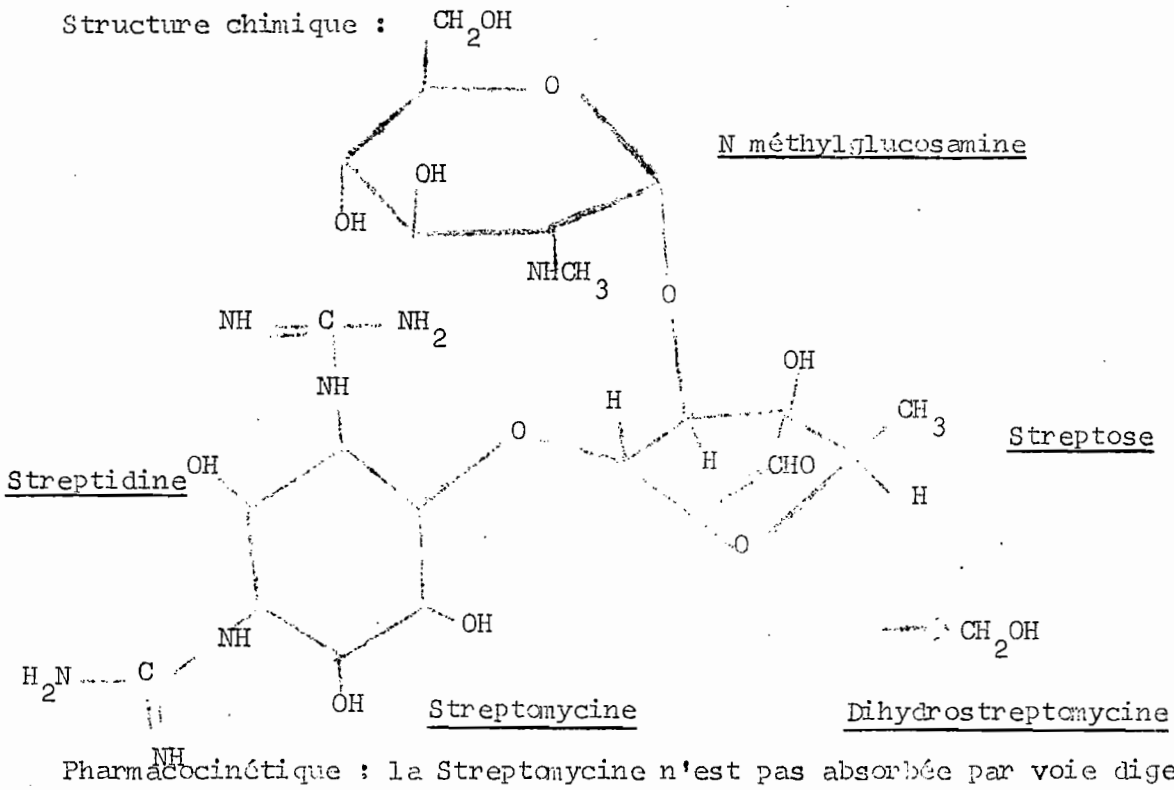
Toxicité : atteinte du nerf optique (névrite optique rétrotubulaire) en cas de surdosage ou chez l'insuffisant rénal.

La Streptomycine :

C'est le premier antibiotique du groupe des oligo-saccharides ou aminosides ou aminoglucosides. C'est en outre le premier des antituberculeux. Elle a été isolée en 1944 par WAKSMAN et coll. de Streptomycens griseus.

Activité : la Streptomycine a un pouvoir bactéricide sur les formes à multiplication active. Mais elle est inactive sur les formes intracellulaires et sur les formes à multiplication lente. Son activité sur le bacille tuberculeux est dix fois plus faible que celle de l'Isoniazide. Son taux de mutation atteint 10^{-5}.

Structure chimique :



Pharmacocinétique : la Streptomycine n'est pas absorbée par voie digestive. Elle n'est donc utilisée dans le traitement de la tuberculose que sous forme injectable.

Après injection de 0,50 g/voie intramusculaire, le taux sérique atteint 20 mcg/ml.

C.D.m = 38.

Le passage intrarachidien est très faible. La liaison aux protéines du plasm est de 20 à 30 %. L'élimination est urinaire (filtration glomérulaire) sous forme active.

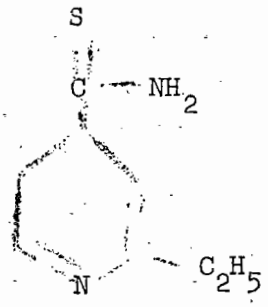
Posologie, voies d'administration et spécialités : La posologie est de 1 g par jour chez l'adulte et 25-50 mg/kg chez l'enfant.

Toxicité : accidents allergiques ; accidents toxiques vrais (atteinte labyrintique et auditive, convulsions, atteintes de la 8ème paire de nerf crânien).

c). Les médicaments de troisième ligne.

L'Ethionamide : l'Ethionamide est un dérivé de l'Acide isonicotinique, il s'agit de l'alpha-éthylthio-isonicotinamide.

Structure chimique :



Activité : l'activité sur le bacille tuberculeux est supérieure à celle de la Streptomycine et inférieure à celle de l'Isoniazide; C.M.I. = 1-2 mcg/ml. Cependant les souches résistant à cette dernière sont sensibles à l'Ethionamide. Le taux de mutation est 10^{-3}.

Pharmacocinétique : les concentrations sanguines après absorption de 500 mg atteignent 2,6 mcg/ml à la 3ème heure et 3,5 mcg/ml à la 6ème heure. Diffuse bien notamment dans le caséum.

Posologie, voies d'administration et spécialités : l'Ethionamide (Trécator) est prescrit habituellement par voie orale à la dose quotidienne de 500 à 750 mg chez l'adulte et 15 à 25 mg/kg chez l'enfant. L'utilisation est possible en perfusion intraveineuse dans du serum bicarbonaté ; la voie rectale est à éviter.

Toxicité : troubles digestifs ; rares ictères, lesions cutanées, très rares troubles dépressifs et gynécomastie.

Protionamide : homologue de l'Ethionamide dont l'activité antituberculeuse est similaire, il possède une résistance croisée totale avec elle.
La posologie habituelle du Protionamide (Trévintix) est de 500 mg par jour chez l'adulte et 20 mg/kg chez l'enfant par voie orale.

Pyrazinamide : utilisé sous forme de Pyrazinamide pur (Piraldine) à la dose de 2 g par jour ou sous forme de N-morpholinométhyl-pyrazinamide ou morphozinamide (Piazoline) à la dose de 3 g/jour.

Il est toujours utilisé en association avec un antituberculeux majeur.

Il est hépatotoxique et présente une interférence avec le métabolisme de l'acide urique.

Les Thiosémicarbazones : le composé le plus actif est le Thioacétazone ou Tb_1. Son activité sur le bacille tuberculeux est voisine de celle de l'Acide para-amino-salicylique.

Il peut provoquer des réactions allergiques cutanées à type de rashes ou plus graves (syndrome de Lyel). Des troubles digestifs ont été décrits.

L'Acide para-amino-salicylique (P.A.S) : l'activité est faible car seulement bactériostatique. La posologie quotidienne est de 15 g en perfusion veineuse et de 10 à 30 g per os chez l'adulte. Chez l'enfant on emploie 1,5 à 2 g par cette voie. Les spécialités pharmaceutiques l'associent à l'Isoniazide (Paraniazide, Pasiniazide).

Toxicité : troubles digestifs et réactions allergiques.

IV - APPERCU SUR LE TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE AU MALI.

Au Mali, deux régimes sont utilisés pour le traitement de la tuberculose. Un régime de première ligne qui comporte les antituberculeux à prix de revient bas mais efficaces qui dure 12 mois et un régime de deuxième ligne ou régime de réserve qui utilise les antituberculeux majeurs (17).

Régime de première ligne : tout malade nouvellement dépisté est obligatoirement soumis à ce régime de première ligne. Il comporte deux phases : une première phase dite phase initiale qui dure 2 mois et une deuxième phase dite phase d'entretien qui dure 10 mois. Il existe ainsi plusieurs schémas thérapeutiques standard :

	Phase initiale : 2 mois		Phase d'entretien : 10 m.	
I	INH : 300 mg Streptomycine : 1 g Ethionamide : 500 mg Trécator	7/7	INH : 600 mg Streptomycine : 1 g	2/7
II	INH : 300 mg Streptomycine : 1 g Ethionamide : 500 mg Trécator	7/7	INH : 300 mg Ethionamide : 500 mg Trécator	7/7
III	Trécaplix : 2 comprimés Streptomycine : 1 g	7/7	Trécaplix : 2 comprimés	7/7
IV	INH : 300 mg) + Tb$_1$: 500mg) 1 comp. Streptomycine : 1 g	7/7	INH : 300 mg) ° Tb$_1$: 500 mg) 1 comp.	7/7
V	INH : 300 mg) ° Tb$_1$: 150 mg) 1 comp. Streptomycine : 1 g.	7/7	Streptomycine : 1 g INH : 600 mg	2/7

Légende :

7/7 = 7 jours sur 7 ; 2/7 = 2 jours sur 7.

Actuellement au D.A.T. le schéma V est utilisé.

Régime de deuxième ligne :

Ce régime est adopté dans le cas où le malade reste bacillifère après les 12 mois de traitement régulier au régime de première ligne. Ce régime n'est disponible que dans les dispensaires antituberculeux qui s'occupent de la surveillance du malade au cours du traitement. Ce régime comporte deux phases : une phase initiale de 2 mois et une phase d'entretien de 10 mois. Il présente le schéma suivant :

Phase initiale : 2 mois		Phase d'entretien : 10 mois	
Rifampicine : 600 mg Ethambutol : 1200 mg	7/7	Rifampicine : 600 mg Ethambutol : 2400 mg	2/7

Le traitement antituberculeux au Mali est donc basé sur des schémas thérapeutiques standard. On ne peut douter de son efficacité, cependant il serait préférable et dans le souci d'utiliser les antibiotiques à bon escient, qu'il soit basé sur le résultat des tests de sensibilité aux médicaments antibacillaires des différentes souches isolées chez les malades.

Et c'est cela que notre travail vise.

V - SUJETS ETUDIES, MATERIELS ET METHODES

1). Sujets étudiés :

Ce travail porte sur 233 malades répartis de la façon suivante :

a. Repartition en fonction du sexe :

Sexe masculin	163	70 %
Sexe féminin	70	30 %
Total	233	100 %

b. Repartition en fonction de l'âge :

0 - 20 ans	28	14,1 %
20 - 30 ans	76	38,4 %
30 - 40 ans	51	25,8 %
40 - 50 ans	30	15,1 %
50 - 60 ans	9	4,5 %
plus de 60 ans	4	2,1 %
Total	198	100 %
Ages non déterminés	35.	

c. Repartition en fonction des ethnies :

Bambara	64	27,4 %
Malinké	16	6,8 %
Peulh	63	26,6 %
Soninké	25	10,7 %
Sonrhaï	20	8,5 %
Kassonké	10	4,2 %
Maure	10	4,2 %
Somono	9	3,8 %
Bobo	4	1,7 %
Minianka	4	1,7 %
Dogon	8	3,4 %
Total	233	100 %

d. Repartition en fonction de la provenance :

District de Bamako :	87 :	44,4 %
Région de Koulikoro:	26 :	13,7 %
" de Kayes	17 :	8,9 %
" de Ségou :	8 :	4,2 %
" de Sikasso :	14 :	7,4 %
" de Mopti :	23 :	12,1 %
" de Tombouctou	11 :	5,8 %
" de Gao :	3 :	3,5 %
Total	: 189 :	100 %.
Provenance non déterminée	: 44	

2). Matériels :

Du 15 mai 1981 au 15 octobre 1981, nous avons collecté chez 233 malades atteints de tuberculose pulmonaire des expectorations contenant des bacilles acido-alcoolo-résistants visibles à l'examen direct au Dispensaire Antituberculeux de Bamako. Ces expectorations sont transportées au service de Bactériologie de l'Institut National de Recherches en Santé Publique.

3). Méthodes :

a. Procédure générale : Au Dispensaire Antituberculeux un frottis est fait sur les expectorations des malades suspects de tuberculose. Les crachats positifs à la bacilloscopie sont immédiatement transportés au service de Bactériologie de l'I.N.R.S.P. où chaque échantillon est décontaminé par la soude à 4 %. Le culot de centrifugation est ensemencé en totalité sur deux tubes de milieu LOEWENSTEIN-JENSEN ordinaire. Les tubes sont placés à l'étuve à 37°C et on note la date d'apparition des colonies. On les observe le 4ème jour puis le 7ème jour et ensuite chaque semaine. Les souches isolées ont été identifiées et leur sensibilité testée aux principales drogues antibacillaires au laboratoire de l'I.N.R.S.P.

b. Technique : examen microscopique : au D.A.T. l'examen direct des frottis se fait par la microscopie par la lumière transmise après coloration par la méthode Ziehl-Neelsen à froid.

Culture : les échantillons positifs à la bacilloscopie sont mis en culture après traitement par la soude à 4 %. Le culot de centrifugation est ensemencé sur 2 tubes de milieu de LOEWENSTEIN-JENSEN ordinaire. En juillet le milieu de Coletsos a été utilisé en plus du milieu de LOEWENSTEIN-JENSEN. Les tubes ensemencés sont mis à l'étude à 37°C. Un premier contrôle est fait du 4ème jour au 7ème jour ; puis chaque semaine.

Identification biochimique : les tests biochimiques utilisés sont :
- la recherche de la Niacine par la méthode des bandelettes réactives effectuée sur les tubes temoins de l'antibiogramme au 42ème jour.
- la recherche de la Nitrate réductase par la technique de VITAMIN au 28ème jour effectuée aussi sur les tubes temoins de l'antibiogramme.
- la recherche de la Catalase à 22°C et après chauffage à 70°C pendant 15 minutes au 28ème jour et sur les tubes temoins de l'antibiogramme.

Les tests de sensibilité aux principales drogues antibacillaires : la méthode choisie est celle des proportions décrites par CANETTI, RIST et GROSSET. Le milieu utilisé est celui de LOEWENSTEIN-JENSEN avec antibiotique incorporé avant coagulation, préparé par nous même au laboratoire. Les antibiotiques ont été fournis par les laboratoires : LEDERLE (Ethambutol) ; ROCHE S.A. (INH) ; LE PETIT (Rifamycine) ; SPECIA (Streptomycine).

Les tests de sensibilité comportent l'étude de la sensibilité à l'Isoniazide (0,2 mcg/ml) ; la Streptomycine (4 mcg/ml) ; le P.A.S. (0,5 mcg/ml) ; la Rifampicine (40 mcg/ml) ; l'Ethambutol (2 mcg/ml) et le TCH (2 mcg/ml).

Conformément à cette méthode une suspension bacillaire en eau distillée stérile ajustée à l'opacité de l'étalon BCG 1 mg/ml est préparée à partir de la primo-culture. A l'aide de cette suspension deux dilutions ont été préparées pour chaque échantillon, 10^{-1} et 10^{-3}, et ensemencées à raison de 0,2 ml par tube.

Deux tubes temoins l'un milieu de LOEWENSTEIN-JENSEN ordinaire et l'autre LOEWENSTEIN-JENSEN plus Pyruvate ont été ensemencés pour chaque dilution.

1). Culture.

Elle a duré 5 mois du 15 mai 1981 au 15 octobre 1981. Elle a donné les résultats suivants :

sur les 233 expectorations, 173 (74,2 %) ont donné lieu à des cultures positives. 11 ont été contaminées. Ce pourcentage de cultures positives peut être du soit à des difficultés d'ordre technique soit lié à l'expectoration qui pourrait contenir des bacilles morts.

2). Identification.

Elle a été effectuée en même temps que les tests de sensibilité. Ainsi sur les 173 cultures positives, 113 ont été testées et 72 ont pu donner lieu à une identification précise et un antibiogramme interprétable.

2 ont été contaminées par des mycobacteries atypiques du groupe fortuitum. Une souche n'a pas pu être identifiée ; le reste n'a pas poussé au repiquage. Cet échec d'un pourcentage important d'antibiogramme peut s'expliquer par le fait que les tests ont été effectués en retard à cause du manque d'étalon BCG qui n'a été reçu qu'en novembre.

Nous avons ainsi identifié 54 (75 %) mycobacterium tuberculosis, 17 (22,22 %) Mycobacterium africanum et un (2,78 %) de Mycobacterium bovis. Le nombre peu élevé de Mycobacterium africanum s'explique par le fait que nous n'avons pas utilisé le Coletsos au début de notre travail. Ainsi si nous considérons la période d'utilisation de Coletsos nous avons 44 souches dont 30 (68,18 %) Mycobacterium tuberculosis, 13 (29,54 %) Mycobacterium africanum et 1 (2,28%) Mycobacterium bovis.

Espèces	Nombre	Pourcentage
M. tuberculosis	54	75
M. africanum	17	22,22
M. bovis	1	2,78
Total	72	100

TABLEAU I : Nature des souches identifiées.

Espèces	Nombre	Pourcentage
M. tuberculosis	30	68,18
M. africanum	13	29,54
M. bovis	1	2,28
Total	44	100

TABLEAU II : Nature des souches isolées pendant la période d'utilisation du Coletsos.

En considérant la période d'utilisation du Coletsos, nous avons 29,54 % de M. africanum. Ce pourcentage est proche de celui trouvé dans une étude faite en 1972-73 par GROSSET (J.) et SANGARE (S.) (23) : 32,5 % et celle faite par I.M. TOURE et SANGARE (S.) en 1979-80 (47) : 30,4 %.

Remarquons que M. bovis a été isolé durant cette période. D'où l'importance du milieu Coletsos dans l'isolement des M. africanum et M. bovis

Sexe	Total		M. tuberculosis		M. africanum		M. bovis	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Masculin	53	73,6	40	76,9	12	70,6	1	100
Féminin	19	26,4	14	23,1	5	29,4	-	-
Total	72	100	54	100	17	100	1	100

TABLEAU III : Répartition des souches en fonction des sexes des malades.

Ce tableau montre que quelque soit l'espèce, la fréquence de la tuberculose est plus élevée chez les hommes que chez les femmes. Effectivement parmi nos sujets étudiés, nous avons plus de sexe masculin que de féminin (70 % contre 30 %).

Ages	Total		M. tuberculosis		M. africanum		M. bovis	
	N	%	N	%	N	%	N	%
0-20 ans	5	8,7	5	11,3	0	0	0	0
20-30 ans	24	42,1	18	40,9	6	42,9	0	0
30-40 ans	16	28,1	13	29,5	3	21,4	0	0
40-50 ans	9	15,8	5	11,3	4	28,5	0	0
50-60 ans	2	3,4	2	4,5	0	0	0	0
+ de 60 ans	1	1,9	0	0	1	7,2	0	0
Total	57	100	44	100	14	100	0	0
Indéterminé	15		10		3		1	

TABLEAU IV : Repartition des espèces en fonction de l'âge.

Le tableau IV nous montre une fréquence élevée de la tuberculose chez les sujets âgés de 20 à 30 ans, 30-40 ans, 40-50 ans. En effet parmi nos sujets on a une fréquence élevée de cette tranche d'âge.

Ethnies	Total		M. tub.		M. afr.		M. bovis	
Bambara	20	27,7	16	29,6	4	23,5	-	-
Malinké	5	6,9	4	7,4	1	5,9	-	-
Peulh	20	27,7	16	29,6	3	17,6	1	100
Soninké	8	11,11	6	11,11	2	11,8	-	-
Sonrhaï	6	8,3	3	5,5	3	17,6	-	-
Kassonké	3	3,7	3	5,5	-	-	-	-
Mauré	3	3,7	2	3,6	1	5,9	-	-
Somono¼	3	3,7	2	3,6	1	5,9	-	-
Dogon	2	2,7	-	-	2	11,8	-	-
Bobo	1	1,3	1	1,8	-	-	-	-
Minianka	1	1,3	1	1,8	-	-	-	-
Total	72	100	54	100	17	100	1	100

TABLEAU V : Repartition des différentes souches en fonction des ethnies.

La fréquence de la tuberculose est plus élevée chez les Bambara et les Peulhs, viennent ensuite les Soninké, les Sonrhaï, les Malinké suivis des Kassonké, Maure, Somono. Les ethnies les moins atteintes dans notre échantillonnage sont les Dogon, les Bobo et les Minianka. L'unique Mycobacterium bovis identifié se rencontre chez les Peulhs ce qui a du rapport avec le mode de contamination de Mycobacterium bovis essentiellement par le lait provenant de vaches tuberculeuses.

Provenance	Total		M. tuberc.		M. africanum		M. bovis	
	N	%	N	%	N	%	N	%
District de Bamako	28	48,2	22	50	6	46,1	-	-
Région de Koulikoro	8	13,7	6	13,6	2	15,3	-	-
Région de Kayes	5	8,6	5	11,3	-	-	-	-
Région de Ségou	2	3,4	-	-	2	15,3	-	-
Région de Sikasso	4	6,8	4	9	-	-	-	-
Région de Mopti	7	12	4	9	2	15,3	1	100
Région de Tombouct.	3	5,1	2	4,5	1	8	-	-
Région de Gao	1	1,7	1	2,6	-	-	-	-
Total	58	100	44	100	13	100	1	100

TABLEAU VI : Repartition des différentes souches en fonction de la provenance.

3). Test de sensibilité.

ANTIBIOTIQUES	SOUCHES RESISTANTES							
	Total		M.tubercul.		M.afric.		M. bovis	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Isoniazide	8	11,1	7	12,7	1	5,8	-	-
Streptomycine	4	5,5	4	7,4	-	-	-	-
P.A.S.	-	-	-	-	-	-	-	-
Rifampicine	1	1,3	1	1,8	-	-	-	-
INH + Streptomycine	15	20,8	11	20,3	4	23,5	-	-
INH+Strepto+Rifamp.	1	1,3	1	1,8	-	-	-	-
Total	29	36,4	24	44,4	5	29,4	-	-

TABLEAU VII : Résultats globaux des résistances.

Ce tableau montre une résistance relativement élevée à l'association INH + Strepto. Nous n'avons pas observé de résistance au P.A.S. Nous avons observé une résistance trop élevée à l'Ethambutol ; il se peut que l'antibiotique s'est inactivé dans le milieu ; nous nous bornons de publier les résultats.

TABLEAU VIII: Proportion de la résistance prim.second.et globale.

	Résistance globale		Résistance"primaire"		Résistance"secondaire"	
	N	%	N	%	N	%
	29	40,27	6	18,18	23	58,97
Total	72	100	33	100	39	100

Parmi les 72 souches, 33 proviennent de malades n'ayant jamais reçu de traitement antituberculeux dont 24 souches de M.tuberculosis et 9 souches de M.africanum. Dans ce lot, il y a 6 souches résistantes à l'INH et/ou Strepto soit 18,18 % dont 5 tuberculosis et 1 africanum. 29 souches sont résistantes au total ; 23 souches résistantes proviennent de malades déjà traités soit 58,97 % de résistance secondaire.

Le tableau VIII montre un pourcentage élevé de résistance globale (40,27 %). Sur les 72 souches, 29 sont résistantes. Sur 33 souches provenant de malades non traités, 6 souches sont résistantes soit 18,18 % de résistance primaire. Ce chiffre est proche de celui trouvé par B. KOUMARE (16 %) en 1980 et par KOUMARE, TRUFFOT et GROSSET (18 %) (27). Sur les 39 souches provenant de malades traités, 23 souches (58,97 %) sont résistantes.

TABLEAU IX : Résistance primaire comparée des différentes espèces.

Espèces	Total	R (INH	R (Strepto	R (INH + Strepto)
M.tuberculosis	5 (20,83 %)	1	2	2
M.africanum	1 (11,11 %)	1	-	-
M.bovis	-	-	-	-

Parmi les 5 souches de M.tuberculosis résistantes, une l'est à l'INH, deux le sont à la Streptomycine et deux à INH + Streptomycine. L'unique souche de M.africanum résistante l'est à l'INH seulement. Ainsi donc sur les 24 souches de Mycobacterium tuberculosis provenant de malades non traités, 5 souches (20,83 %) sont résistantes avec une résistance plus élevée à la Streptomycine (2) et INH + Streptomycine (2). Sur les 9 Mycobacterium africanum issues de malades non traités, une souche (11,11 %) est résistante à l'INH. La proportion de résistance primaire semble plus élevée chez M.tuberculosis (20,83 %) que M.africanum. Mais le nombre réduit des souches testées ne permet pas de tirer des conclusions définitives. Nous n'avons pas observé de résistance primaire à la Rifampicine ; et avec la souche de M.bovis isolée,

TABLEAU X : Valeur de la résistance primaire en fonction de l'âge.

Ages	Résistance "primaire"
0-20 ans	0/33
20-30 ans	4/33
30-40 ans	0/33
40-50 ans	2/33
50-60 ans	0/33
Plus de 60 ans	0/33
Total =	6/33

Tableau XI : Valeur de la résistance "primaire" en fonction des ethnies.

Ethnies	Résistance"primaire"
Bambara	0/33
Malinké	1/33
Peulh	1/33
Sonrhaï	3/33
Soninké	1/33
Kassonké	0/33
Maure	0/33
Somono	0/33
Dogon	0/33
Bobo	0/33
Minianka	0/33
Total...	6/33

La résistance primaire semble relativement plus élevée chez les Sonrhaï puis les Malinké, Peulh et Soninké.

TABLEAU XII : Valeur de la résistance primaire en fonction de la provenance des malades.

Provenance	Résistance"primaire"
District de Bamako	2/33
Région de Koulikoro	1/33
" de Kayes	0/33
" de Ségou	0/33
" de Sikasso	0/33
" de Mopti	0/33
" de Tombouctou	3/33
" de Gao	0/33
Total =	6/33

La résistance primaire est relativement très élevée à Tombouctou. Puis dans la Région de Koulikoro et le District de Bamako.

VII - DISCUSSION

C'est dans le souci d'apporter notre contribution à la lutte antituberculeuse que nous avons voulu par ce travail aborder les aspects bactériologiques de la tuberculose. La culture, l'identification et les tests de sensibilité ont été faits par nous même au service de Bactériologie de l'I.N.R.S.P.

Culture :

Elle a donné 74,2 % de positivité. Ce résultat est dû d'une part à l'emploi du milieu de LOEWENSTEIN-JENSEN ordinaire pour la plupart des cultures(133); le Coletsos n'ayant été utilisé que pour 100 cultures ; d'autre part à l'expectoration en effet certains malades se trouvaient sous traitement au moment de l'enquête si bien que les expectorations peuvent ne contenir que des bacilles morts. Cependant ce taux de positivité est plus élevé que celui de 1980 (60 %) (40).

Identification :

54 Mycobacterium tuberculosis (75 %), 17 Mycobacterium africanum (22,22 %) et 1 Mycobacterium bovis (2,78 %) ont été identifiés. Cependant si nous considérons la période d'utilisation du Coletsos le pourcentage de Mycobacterium africanum (29,54 %) a été trouvé. Ce qui convient mieux avec la réalité car M. africanum poussant difficilement sur le milieu LOEWENSTEIN-JENSEN ordinaire, plusieurs cultures peuvent ainsi échouer. Ce taux de 29,54 % est proche de celui trouvé par GROSSET en 1972-73 (32,5 %) (23) et celui de TOURE et SANGARE (30,4 %) (47).

Des études similaires ont été faites dans d'autres pays et selon la publication de O.C.C.G.E. n° 166/BIO-CM 7533/DOC.TECHN.80, on a ainsi trouvé :

en Mauritanie : sur 156 souches 67 M.tuberculosis (57 %), 57 M.africanum (43%).

Au Niger :

A Niamey sur 264 échantillons : 54,4 % de M.tuberculosis, 45,5 % M.africanum.

En Haute-Volta : sur 55 souches à Dori, 49 % de M.tuberculosis, 49 % de M. africanum, 2 % de M. bovis.

En 1975, sur 429 cultures positives, 32 % de M.africanum contre 68 % de M.tuberculosis.

En 1967 : 67,4 % de M.tuberculosis contre 32,6 % de M.africanum.

Ceci démontre une analogie entre l'endémie tuberculeuse au Mali et en en Haute-Volta.

Test de sensibilité :

Nous avons obtenu un taux de résistance primaire de 18,18 % ce qui est relativement élevé. La résistance secondaire atteint 58,97 % ce qui pose le problème d'échec thérapeutique. Le taux de 18,18 % est proche de celui trouvé par B. KOUMARE, C. TRUFFOT et J. GROSSET (18 %) en 1980.

Une étude bactériologique basée sur l'isolement, l'identification et les tests de sensibilité est donc possible à Bamako.

Nous avons identifié Mycobacterium bovis chez un malade venant de Mopti qui est une zone d'élevage du Mali d'où une confirmation de la transmission préférentielle par voie digestive de Mycobacterium bovis.

Le taux élevé (18,18 %) de la résistance primaire montre l'intérêt qu'il y a de renforcer la lutte antituberculeuse au Mali. Les antibiotiques touchés par cette résistance sont l'INH et la Streptomycine qui font partie des médicaments de première ligne dans notre politique nationale de traitement antituberculeux.

Cependant nous avons rencontré un cas de résistance secondaire à l'association INH - Streptomycine - Rifampicine, et un cas de résistance à la Rifampicine.

Dans la repartition de la résistance primaire en fonction des ethnies nous avons trouvé un taux de résistance primaire relativement élevé chez les Sonrhaï ; en effet les trois malades étudiés sont résistants à l'INH et/ou Streptomycine. Ils viennent tous de la Région de Tombouctou, ce qui montre qu'il est nécessaire de se pencher sur la lutte antituberculeuse dans cette Région.

En examinant la fréquence de la résistance primaire en fonction de l'âge et la fréquence de la tuberculose elle-même, on constate des taux élevés chez la population active du pays. C'est dans ce groupe que nous avons le plus de malades tuberculeux dans notre série. D'où la nécessité de renforcer la lutte antituberculeuse au Mali en orientant particulièrement les efforts envers ce groupe.

Dans l'état actuel des choses, il est nécessaire de mettre sur pied au niveau central au Mali un laboratoire chargé du contrôle de la tuberculose et capable de réaliser la culture, l'identification et l'antibiogramme des souches de Mycobacteries. Ce laboratoire recevrait régulièrement des échantillons de crachats de malades de toutes les Régions du Mali et renverrait périodiquement aux Médecins, des relevés épidémiologiques concernant la nature des espèces isolées et leur sensibilité aux antibiotiques. Ces résultats permettraient à tout instant de vérifier l'efficacité des schémas thérapeutiques appliqués dans notre pays.

IX - BIBLIOGRAPHIE

1. ACTUS (E.).
An uncommon pathogenic Mycobacterium.
Arch. Inst. Past. Tunis, 1956, 33 : 245-257.

2. ANDERSON
Cultural methods of isolation of tubercle bacilli.
Am. J. Publ. Hlth., 1936, 26 : 619-624.

3. BADELONO, DAVID (H.), MEYER (L.), RADAULT (R.), ZUCMAN (J.).
Suppuration à Mycobacterium fortuitum après prothèse totale de hanche. A propos de 3 cas.
Rev. Chir. Orth., 1979, 65 : 39-43.

4. BARROW (G.I.) et HEWITT (M.).
Skin infection with Mycobacterium marinum from tropical fish tank.
Bull. Med. J., 1971, 2 : 505-506.

5. BATES (J.H.) et MITCHISON (D.A.).
Geographic distribution of bacteriophage typs of Mycobacterium tuberculosis.
Amer. Rev. resp. Dis, 1969, 100 : 189-193.

6. BOISVERT (H.).
L'identification des mycobateries par la recherche de l'acide nicotinique.
Ann. Inst. Past., 1960, 99 : 600-607.

7. BOISVERT (H.).
Mycobacterium xenopei (Marks et Schwabacher 1965) micobacterie scotochromogène, thermophile, dysgonique éventuellement pathogène pour l'homme.
Ann. Inst. Past., 1965, 109.

8. BONICKE (R.).
Die Difrerenzierung humaner und boviner tuberkel bakterien mit hilfe thiophen 2-carbonsaüre hydrazid.
Natur wissenschaften, 1958, 45 : 392-393.

9. BONICKE (R.), JUHASG (S.E.) et DIENER (V.).
Studies on the nitrate reductase activity of Mycobacteria in the presence of fatty acids and related compounds.
Amer. Rev. resp. Dis. 1970, 102 : 507-515.

10. BOULAHBAL (F.) et GROSSET (J.).
L'utilisation du bromure de cétyl-pyridinium comme milieu de transport des crachats tuberculeux.
Inst. Past. d'Algérie - Service de la Tuberculose.

11. CANETTI (G.), RIST (N.) et GROSSET (J.).
Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions, méthodologie, critères de résistance, résultats interprétations.
Rev. de tuberc. (Paris), 1963 : 217-272.

12. CASTETS (M.), BOISBERT (H.), GRUMBACH (F.), BRUNEL (M.) et RIST (N).
Les bacilles tuberculeux type africain.
Rev. Tuberc. Pneumol., 1968, 32 : 179-184.

13. COLETSOS (P.J.).
Milieu et modalités de culture adapté à la réanimation et à la multiplication in vivo de Mycobacterium tuberculosis de vitalité réduite de duabilité éphémère ou en état de quiescence.
Ann. Inst. Past., 1960, 99 : 475-495.

14. CORPER (H.T.), STONER.
An improved procedure for the diagnostic culture of mammalian tubercle bacilli.
I. Lab. Clin. Med. 1946, 31 : 1364-1371.

15. DEGOMMIER (J.).
Nouvelle technique de coloration des bacilles tuberculeux pour la recherche en fluorescence.
Ann. Inst. Past. 1959 : 96 - 723.

16. DUVAL (J.).
Les antibiotiques tuberculeux et non tuberculeux.
Abrégé, Paris, 1980.

17. DOUMBIA (S.).
Organisation de la chimiothérapie antituberculeuse au Mali (à l'exclusion de la Région de Kayes).
Thèse Méd., Bamako, 1978.

18. EDWARDS (M.S.), HUBERT (W.) et BAKER (C.J.).
Mycobacterium terrae synovis and osteomyelitis.
Amer. Rev. Resp. D. 1978 , 117 - 161-165.

19. FRANKEL (G.).
L'infection bacillaire et la tuberculose.
Masson et Cie, édit. 1936, 16.

20. GERNEZ-RIEUX (Ch.), TACQUETA, DEVULDER (B.) et DE BRUYNE (J.).
Les mycobacterioses humaines. Méthodes actuelles de diagnostic bacteriologique. Aspects cliniques, thérapeutiques et épidémiologiques.
XVIè Congrès National de la Tuberculose et des Maladies respiratoires, Bordeaux 1970, Masson éd. Paris, 1971.

21. GOLDIE.
Use of Dubos medium for culture of M. tuberculosis sputum concentrates to be examined for tubercle bacilli.

22. GROSSET (J.) et MEYER (L.).
Mycobacteries atypiques et Mycobacterioses.
Encycl. Méd. Chir. Paris, Maladies Infectieuses 80C[10] 7, 1980.

23. GROSSET (J.), SANGARE (S.), RIST (N.) et MEYER (L.).
Caractères culturaux et biochimiques des bacilles tuberculeux isolés chez 230 tuberculeux pulmonaires au Mali.
Bull. Union Intern. Tuberc. (1974), 49 : 190-200.

24. GROSSET (J.), MEYER (L.), TRUFFOT (C.) et BOVAL (C.).
Mycobacterium xenopi. Caractères bactériologiques et sensibilité aux antibiotiques.
Rev. Franç. Mal. Resp., 1979, 7 : 498-500.

25. HUET (M.) et RIST (N.).
Intérêt des milieux au pyruvate pour la culture du bacille tuberculeux en Afrique Noire.
Union Inter. Tuberc., 1973, 43 : 97-102.

26. HUET (M.), RIST (N.), BOUBE (G.) et POITIER (D.).
Etude bactériologique de la tuberculose au Cameroun.
Rev. Tuberc. Pneumol. 1971, 35 : 413-426.

27. KOUMARE (B.), TRUFFOT (C.) et GROSSET (J.).
Les espèces mycobactériennes isolées chez les tuberculeux pulmonaires au Mali et leur sensibilité aux antibiotiques.
Coll. Février 1981, Inst. Pasteur.

28. LAMBIN (S.), GERMAN (A.).
Précis de microbiologique.
Ed. Masson et Cie, Paris, 1969.

29. LANGEROVA, RACQUET (A.).
Comparaison des différentes méthodes d'homogénéisation et de purification des produits pathologiques en fonction du milieu de culture solide ou liquide.
Bull. Org. Mond. Santé, 1968, 39 : 663-680.

30. LEBEAU (B.) et ROCHEMAURE (J.).
Indications, posologie et associations des grandes médications antituberculeuses.
Rev. P. Ch. Ant., 1979 : 29-33.

31. MYER (L.).
Evolution, caractères et signification épidémiologique de la résistance primaire du bacille tuberculeux en France de 1962 à 1972.
Thèse Méd. Paris, 1974.

32. MEYER (L.) et DAVID (H.).
Mycobactériologie en Santé publique.
Serv. Tub. et Mycob. Inst. Past. Paris, 1977.

33. MEYER (L.) et HUGO (D.).
Mycobactériologie en Santé publique.
Inst. Past. Paris, 1980.

34. MIDDLEBROOK (G.).
Media for tubercle bacilli.
Amer. Rev. Tuberc., 1948, 54 : 204-212.

35. MOUSTARDIER (G.).
Bactériologie médicale.
Maloine S.A. édit. Paris, 1972 : 923-993.

36. PARROT (R.)., BRAUN (J.), GAILLAR (J.P.), SORS (Ch.) et GROSSET.
Les mycobactérioses pulmonaires à M. xenopi. A propos de 50 cas, éléments de diagnostic.
Rév. Franç. Mal. Resp., 1979, 7 : 501-503.

37. PENSO (G.).
Premier colloque international sur les Mycobacteries.
P.G. Janssens, édit. Anvers, 1959, p : 52-70.

38. PETROFF (S.A.).
Some cultural studies on the tubercle bacilli.
Bull. Johns Hopkins Hosp. 1915 : 276-279.

39. RIST (N.)
L'activité antituberculeuse de l'éthionamide (l'alpha-éthyl-thio-isonicotinique ou 13 14 Th). Etude expérimentale et clinique.
Avances in tuberculosis research 1960 : 69-126.

40. SANGARE (B.).
Aspects bactériologique de la tuberculose à Bamako.
Mémoire Pharm. 1980, Bamako. : 1-96.

41. SEMEGA (C.).
Problèmes de la lutte antituberculeuse dans les zones rurales du Mali. Etude critique du Projet-Pilote de Kayes.
Thèse Méd. Bamako, 1977.

42. TACQUET (A.) et TISON (P.).
Nouvelle technique d'isolement des mycobacteries par le lauryl sulfate de sodium.
Ann. Inst. Past. 1961, 100 : 676-680.

43. TACQUET (A.), TISON (F.), CLAYES (C.), QUINOT (E.).
Intérêt de l'inoculation avec quatta pour l'isolement des mycobacteries.
Rev. Tuberc. 1963, 27 : 533-540.

44. TAN THIAM (H.).
A simple and rapid cool stanning method for acide fast bacteria.
Amer. Rev. Resp. Dis. 1965, 85 : 753-754.

45. TISON (F.).
Elimination des germes banaux dans les crachats destinés à la culture du bacille de Koch. Applications et perfectionnement.
Ann. Inst. Past. 1951, 80 : 659-664.

46. TISON (F.), CARBONNELLE (B.).
Recherche, isolement et étude du bacille tuberculeux et des autres mycobacteries en pratique courante.
1972, p. 66.

47. TOURE (I.M.) et SANGARE (S.).
Contribution à l'étude des souches de Mycobacteries isolées à Bamako et leur ensibilité à différentes drogues antibacillaires.
Afr. Méd. (1980)

48. VILLEMIN (J.A.).
Cause et nature de la tuberculose.
Bull. Acad. Nat. Méd. 5 Décembre 1865.

49. VIVIEN (J.N.).
Les antibiotiques antituberculeux autres que la Rifampicine, l'isoniazide et l'éthambutol.
R.P. Ch. Ant. 1979 : 29, 33.

50. YOUMANS (G.P.), WILLISTON (E.H.), FELDMAN (W.H.), HINSCHAW (H.C.).
Increase in resistance of tubercle bacilli to streptomycin prelim report.
Proc. Staff. Meet, Mayo. Clin. 1946, 21 : 126-127.