

Ministère de l'Enseignement Supérieur
Et de la Recherche Scientifique

REPUBLIQUE DU MALI

UN PEUPLE - UN BUT - UNE FOI

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



**FACULTE DE MEDECINE ET
D'ODONTO-STOMATOLOGIE**



ANNEE UNIVERSITAIRE 2019-2020

N°.....

TITRE

**EVALUATION PRELIMINAIRE DE LA PCR
MULTIPLXE DANS LA DETECTION DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS CHEZ LES
PATIENTS TUBERCULEUX EN ECHEC DE
TRAITEMENT OU RECHUTE A BAMAKO, MALI**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 01/10/2020 devant la
Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie.

Par : M. Djakaridja DANIOGO

**Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine
(Diplôme d'Etat).**

Jury

Président : Pr. Souleymane Diallo

Membre : Dr. ; Dr Khadidia OUATTARA ;

Membre : Dr. Bindogo P.P DEMBELE

Co-directeur : Dr. Yeya Dit Sadio SARRO

Directeur de thèse : Pr. Yacouba TOLOBA

DEDICACES ET REMERCIEMENTS

DEDICACES

Gloire à ALLAH (Soubhana Wataallah), Le Tout Puissant, Le Très Clément et Le Très Miséricordieux. Louange à Lui Qui Est Le Créateur des cieux et de la terre et Qui m'a montré ce jour. Paix et Salut sur le sceau des prophètes Mohamed, sa famille, ses compagnons et tous ceux qui le suivent jusqu'au jour du jugement dernier.

Je dédie ce travail à :

➤ ***Mon père : Lacina Daníogo***

Papa en plus d'être un père tu es devenu mon conseiller spécial. Papa, tu nous as guidés sur le droit chemin en nous inculquant l'amour du travail bien fait, le sens du devoir. Tes conseils ont porté fruits, trouves ici cher père notre profond respect et notre reconnaissance éternelle. Qu'Allah te prête longue vie afin qu'on puisse continuer à bénéficier de tes enseignements et t'apporte réconfort.

➤ ***Ma mère : Koné Djeneba***

Maman, femme de cœur, tu es la meilleure des mamans. Ta bonté, ton courage, ta sagesse ont été déterminant pour ma réussite. Je suis fier de t'avoir comme modèle. Qu'Allah (sbw) te prête encore longue vie afin qu'à notre tour nous puissions te témoigner toute notre reconnaissance.

➤ *A mes Marrâtes Awa Konate et Sanata Diabaté, loin de vous mais j'ai toujours reçu vos conseils, encouragement et bénédictions. Ce travail est le vôtre, que le tout puissant vous accorde longue vie.*

➤ *A ma chère épouse Mme Daniogo Mariam Kouyaté : Ta présence dans ma vie fut une aubaine et une bénédiction d'Allah. Que le Tout Puissant nous couvre de sa Miséricorde et concrétise nos rêves ensemble.*

➤ *A mes frères et sœurs :*

Seydou, Inza, Madou, Yaya, Fatou, Afou, Kadi et notre benjamine Kary Daniogo

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

Merci ne suffira pas pour la reconnaissance que je vous dois. Ce travail est le vôtre, et je prie le Tout Puissant de maintenir la fraternité qui nous lie, de réaliser nos rêves, et de nous gratifier de son paradis.

➤ *A mes cousins et cousines : Kakiatio Traore, Souleymane, Yaya, Issouf, Issa, et Dougouna Dagnogo.*

Voyez en ce travail toute ma sympathie.

➤ *A mes oncles et tantes paternels et maternels : Soyez rassuré de ma profonde reconnaissance.*

➤ *A mes tantes*

Vous m'avez entouré d'une attention et d'une grande affection. Trouvez à travers ce modeste travail le témoignage de ma profonde gratitude. Qu'Allah (sbw) vous donne longue vie.

➤ *A mes neveux et Nièces, fils et filles : Safiatou Traore, korotoumou Traore, Aïcha Traore (Lalacha), Drissa, kadidiatou, Et Fatoumata Diarrassouba*

REMERCIEMENTS

➤ *A M. Kassim Diarrassouba et famille,*

Grand frère Vous avez été plus qu'une famille d'accueil pour moi vous avez joué le rôle d'un père car je n'ai manqué de rien. Je ne saurai vous remercier pour tous les bienfaits que vous m'avez procurés vous et surtout notre femme Chata Ballo une dame de cœur et de bonté inestimable.

Trouvez à travers ce travail le fruit de vos conseils, vos encouragements et bénédictions.

➤ *A M. Birama TRAORE et famille,*

Pour votre grand sens de fraternité, de soutien sans faille et votre sens de partage sans défaut, Merci à vous surtout notre femme Kadidiatou Traoré une dame de cœur et de bonté inestimable, retrouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

➤ *Aux familles Dr Diarra S Diakaridia, Moussa Diarra, Kakiatio Traore, Dramane Traore.*

Pour votre grand sens de fraternité et de soutien sans faille, je vous dis merci pour tout. Vous avez toujours donné le meilleur de vous-même pour notre réussite dans ce combat, soyez en remercier.

- *A ma grande sœur Kakiatio Traore et Famille : A vous et à votre charmante famille depuis Kati qui n'ont ménagé aucun effort pour m'accepter parmi vous depuis le début de mon cycle de médecine. Que le Tout Puissant nous accorde longue vie pour voir la suite. Merci pour vos conseils et encouragements malgré mes nombreux échecs. Trouvez à travers ce travail le fruit de vos conseils, vos encouragements et bénédictions.*
- *A mes camarades thésards : Ibrahim Diallo, Fanta Sanogo, Hawa Baye Dramé. Soyez rassuré de ma reconnaissance ; bonne carrière professionnelle à tous.*
- *Au Dr Patrice Bindongo Dembélé*

Le plaisir et la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de nous encadrer, nous a profondément marqué.

Votre disponibilité, votre amour pour le travail bien fait, la rigueur de votre raisonnement scientifique ont été pour nous hautement profitables. Cher Maître il me plaît de vous remercier particulièrement pour tout l'encadrement et le soutien que j'ai reçus de vous.

Puisse Allah le Tout Puissant vous accordez une longue vie pleine de santé et de succès scientifiques.

➤ *Au Dr Bocar Baya,*

Vous avez été plus qu'un Maître, vous avez été un conseiller, votre amour pour le travail bien fait, votre humanisme, votre modestie et votre disponibilité nous ont profondément marqué. Courageux, infatigable, respectueux, nous avons admiré votre simplicité et votre attachement à notre formation. Votre courtoisie, votre simplicité et l'ambiance cordiale dans laquelle nous avons travaillé constituent sans doute une infime partie de vos nombreuses qualités. Merci pour tout.

➤ *Au Dr Camara Issiaka*

Merci de nous avoir encadré et pour votre disponibilité à chaque instant, vos bons conseils que vous n'avez cessé de nous prodiguer, ont permis la réalisation de ce travail. Merci pour tout !

➤ *Au Dr Mahamadou Tolofoudie :*

Ce travail est le fruit de votre encadrement, je tiens à vous remercier pour les encouragements et détermination que nous avons sentis en vous dans notre encouragement.

➤ *Au Dr Ousmane KODIO*

Je tiens à vous remercier pour vos encouragements, vos conseils, et vos bénédictions, qu'ALLAH vous donne une longue vie.

A toute l'équipe du laboratoire de tuberculose de SEREFO/UCRC (Dr Amadou SOMBORO, Dr Antiemé Combo George Togo, Mme Mariam Goumane, M. Gagni Coulibaly, Fatimata Diallo, Boureïma Degoga, Mahamadou Koné).

Je tiens à vous remercier pour vos encouragements, vos conseils, surtout votre sens du travail d'équipe et pour l'enseignement que j'ai obtenu de chacun de vous. Ce travail est le vôtre.

➤ *A mes amis de tous les temps : Dr Mamadou*

Kassambara dit sa Majesté le Grand Kass, Dr Farimadiane Coulibaly, Amadou Daniogo dit Flavio, DR Seydou Fily

Traore, Mamadou Traore dit Foro, Ibrahima Doumbia dit

Zlatan, Sékou Sidibé, Dr Oumar Ould Aly. Retrouvez ici l'expression de toute ma reconnaissance que DIEU nous laisse unis à jamais jusqu'à la fin de nos temps.

➤ *A la Renaissance Convergence Syndical. De loin de ma famille biologique cette famille m'a tout donné, me faire sentir toujours important, m'a apporté son soutien à*

travers de ces grands hommes que vous remerciez. Grâce à elle j'ai puis tenir plus fort que je ne me croyais. Que le Tout Puissant accorde toujours la grandeur de cette famille.

Aux Aînés de la Renaissance : Dr Doua Sissoko, Dr Koné Kalidou, Dr Badimi, Dr Arouna, Dr Dicko Almoustaphi et bien d'autre dont je n'ai pas pu citer que j'oublierai jamais. Retrouvez ici l'expression de toute ma reconnaissance que DIEU nous laisse unis à jamais jusqu'à la fin de nos temps.

HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY

Hommages aux Membres DU JURY

A notre Maître et Président du jury

Professeur Souleymane DIALLO

- *Professeur Titulaire de Pneumologie à la FMOS,*
- *Ancien Président de la Société Malienne de Pneumologie (SOMAP),*
- *Ancien Président de l'Association pour la Formation continue en Allergologie (ANAFORCAL),*
- *Ancien chef du Service de Pneumo-phtisiologie du CHU du Point-G,*
- *Colonel major de l'Armée Malienne à la retraite,*
- *Chevalier de l'Ordre National du Mali*
- *Ancien directeur du Centre de Recherche et de Formation sur le VIH et la Tuberculose au CEREFO/SEREFO*

Cher Maître

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

Vos qualités d'homme de science éclairé, de praticien infatigable, de pédagogue averti font de vous un enseignant aimé et admiré de tous.

Soyez rassurer cher Maître de notre sincère reconnaissance et de notre profond respect

A notre Maître et membre du jury :

Dr Khadidia OUATTARA

- *Pneumo-allergologue*
- *Maître Assistante à la FMOS*
- *Praticienne hospitalière au CHU Point G*
- *Membre de la SOMAP*
- *Membre de l'ANAFORCAL*
- *Membre de la SPLF*

Cher Maître,

Nous sommes heureux de votre présence dans ce jury de thèse. Votre simplicité, votre rigueur scientifique et votre amour pour le travail bien fait, font de vous une référence.

Vos remarques et suggestions ont beaucoup contribué à l'amélioration de la qualité de ce travail.

Trouvez ici cher maître l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

A notre Maître et membre du Jury :

Dr Bindongo P.P Dembélé Docteur en Médecine.

PhD en Santé Publique au Japon (Nom de l'université ?)

*Chercheur Senior au Centre Ouest Africain ICER université
de Bamako.*

Cher Maître

Nous sommes très heureux de votre présence dans ce jury.

Vous avez accepté de juger ce travail malgré vos multiples occupations.

Votre abord facile et votre objectivité ont largement contribué à renforcer la qualité de ce travail. Ce qui nous permet d'apprécier la grandeur de votre personnalité.

Permettez-nous cher maître de vous exprimer nos sincères remerciements et nos sentiments les plus respectueux.

A notre Maître et Co -directeur de thèse

Dr Yeya dît SARRO

Master en santé publique,

*Epidémiologiste au Centre de Recherche et de Lutte contre la
Drépanocytose,*

*Maître assistant en Epidémiologie à la FMOS, Chercheur
senior au laboratoire UCRC.*

Plus qu'initiateur de ce travail vous avez été pour nous un guide permanent, tant par vos encouragements, vos suggestions et votre disponibilité durant la réalisation de ce travail. Humble et modeste, Homme de science ~~et clinicien~~ apprécié par ses pairs, vous êtes pour nous un modèle de rigueur, de sérieux et d'intégrité.

Votre écoute et votre gentillesse ont accompagné nos premiers pas au Laboratoire UCRC-SEREFO.

Recevez toute notre gratitude pour l'intérêt que vous avez su porter à ce travail. Soyez-en remercié.

A notre Maître et Directeur de thèse

Professeur Yacouba Toloba

- *Pr titulaire de pneumo-phtisiologie*
- *Chef de service de pneumo-phtisiologie au CHU-Point G*
- *Chef de DER de médecine/FMOS*
- *Secrétaire Général de la SOMAP*
- *Secrétaire général de l'ANAFORCAL*
- *Président de la SAFAIC*
- *Membre de la SOPLF*
- *Expert de la TB-MR à l'OMS*
- *Rédacteur en chef de la revue africaine de pneumologie tropicale*

Cher Maître,

Nous confier un travail de cette envergure est pour nous une marque d'estime qui ne trouve sa justification que dans votre quête quotidienne de la rigueur scientifique. Le privilège d'avoir comme encadreur un homme de science aussi modeste et rigoureux que vous est pour nous une leçon de vie. Votre disponibilité nous a permis de réaliser ce travail avec le minimum de difficulté.

Votre grand humanisme et votre sens élevé de la justice nous ont impressionnés. Vos valeurs scientifiques et sociales nous incriminent votre personnalité comme idéal d'excellence et de sagesse

TABLE DES MATIERES

1 INTRODUCTION	22
1.1 Questions de recherche et Objectifs.	24
1.1.1 Hypothèse de recherche.	24
1.1.2 Hypothèse de recherche.	24
1.1.3. OBJECTIFS	24
1.1.3.1 OBJECTIF GENERAL.	24
1.1.3.2 Objectifs Spécifiques :	24
2.GENERALITES:	25
2.1 DÉFINITIONS	25
2-2 Différents types de tuberculose (14).	26
2-3 Prise en charge de la tuberculose au Mali :	26
2.4. Epidémiologie	27
2.4.1 Epidémiologie globale	27
2.4.2 Epidémiologie de la tuberculose au Mali	29
2.4.3 Epidémiologie des mycobactéries non tuberculeuse (MTN)	30
2.5. Diagnostic de la tuberculose.	30
2.5.1 Diagnostic microscopique :	30
2.5.2 Diagnostic moléculaire de la tuberculose par le test Xpert® MTB/RIF	31
2.5.3 Diagnostic par la culture :	31
2.6 Diagnostic des mycobactéries non tuberculeuses (MTN).	31
2.6.1 Diagnostic bactériologique des MTN.....	32
2.6.2 Diagnostic moléculaire des mycobactéries non tuberculeuses (MTN).....	33

2.6.3 Hain Test des MTN.	34
2.7 Nouvelles perspectives de diagnostic simultanée de MTBC et MTN par la technique de MULTIPLEXE.	34
2. 7.1 Principe du test PCR.	34
3. METHODOLOGIE :	35
3.1 Type, période et lieu d'étude :	35
3.2 Cadre de l'étude :	35
3.3 Critères d'inclusion :	37
3.4 Critères de non inclusion :	37
3.5 Echantillonnage :	37
3.6 Procédures de l'étude :	38
3.7. Technique de laboratoire.	38
3.7.1 Extraction d'ADN :	39
3.7.2 La PCR :	42
3.8. Saisie et analyse des données :	45
3.9 Considérations ethniques	45
4.1 Résultats Globaux :	46
4.2 Caractéristiques sociodémographiques des patients.	46
4.2.1. Données sociodémographiques en fonction du groupe des patients. ..	48
4.2.2. Signes Cliniques en fonction du groupe.	52
4.2.3. Données Immuno-Hématologiques en fonction du groupe.	54
4.3 Evaluation de la PCR Multiplexe.	57
5. COMMENTAIRES ET DISCUSSION :	60
5.1 Données sociodémographiques :	60

5.2 Cliniques :	61
5.3 Evaluation de la PCR Multiplexe :	62
5.4 LES LIMITES DE L'ÉTUDE :	63
CONCLUSION :	64
RECOMMANDATIONS :	65
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES :	66
ANNEXES	71

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Emission de gouttelettes de Pflügge par un malade tuberculeux
bacillifère.....22
- Figure 2** : Taux d'incidence estimés de tuberculose
2018.....24
- Figure 3** : Répartition en fonction de leur sexe.....35
- Figure 4** : Répartition en fonction de leur statut VIH36

LISTE DES TABLEAUX ???

Liste des tableaux	Tableau I: Critères de diagnostic de confirmation desMNT..	13
Tableau II :	Critères bactériologiques pour le diagnostic d'une infection pulmonaire à mycobactérie non tuberculeuse chez le patient non Immunodéprimé.....	14
Tableau III:	Répartition des patients en fonction du lieu de recrutement.....	27
Tableau IV:	Répartition des patients en fonction du sexe et groupe.	28
Tableau V:	Répartition des patients en fonction du statut matrimonial.....	28
Tableau VI:	Répartition des patients en fonction des tranches.....	29
Tableau VII:	Répartition des patients en fonction des professions.....	30
Tableau VIII:	Répartition des patients en fonction de leur statut tabagique.	30
Tableau IX:	Répartition des patients selon les Signes cliniques et le groupe.....	31
Tableau X:	répartition des patients en fonction de leur IMC (indice de masse Corporelle) et du groupe.	32
Tableau XI :	Répartition des patients en fonction de leurs statuts VIH.....	33
Tableau XII :	Comparaison des moyennes des paramètres hématologiques entre les deux groupes.	34
Tableau XIII :	répartition des patients en fonction du résultat du Xpert.	35
Tableau XIV:	répartition des patients en fonction du résultat de la culture.	35
Tableau XV:	La performance de la PCR multiplexe.	36
Tableau XVI:	Performance de la PCR Multiplexe	36
Tableau XVII:	Performance de la PCR multiplexe dans la population des tuberculeux à sérologie VIH positive.....	37
Tableau XVIII:	Performance chez les VIH positif	37
Tableau XIX :	Performance de la PCR multiplexe dans la population des tuberculeux a sérologie VIH négative.....	38
Tableau XX :	Performance chez les VIH négatif.....	38
Tableau XXI :	Résultat de la PCR multiplexe en fonction du sexe chez les patients tuberculeux.....	3

LISTES DES SIGLES ET ABREVIATION

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARCAD/SIDA : Association de Recherche de Communication et d'accompagnement à Domicile des personnes vivant avec le VIH

ARV : Antirétroviraux

BAAR : Bacilles acido-alcoolo-résistants

BK+ : Bacille de Koch positif

CMT : Complexe *Mycobacterium tuberculosis*

CESAC : Centre d'Ecoute, de Soins, d'Animation et de Conseil

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-acetic-Acid

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FMOS : Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie

FAPH : Faculté de Pharmacie

IFN : Interféron

L-J : Lowenstein-Jensen

MAC : Complexe *Mycobacterium Avium*

MNT : Mycobactérie Non Tuberculeuse

MTBC : Complexe Mycobactérie tuberculosis

NAA : Nucleic Acid Amplification (Amplification d'Acide Nucléique)

NFS : Numération Formule Sanguine

NIH-NIAID : National Institutes of Health – National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Instituts Nationaux de la Santé - Institut National des Allergies et des Maladies Infectieuses)

PCR : Polymérase Chain-Réaction

RR-TB : Tuberculose Résistante à la Rifampicine

SEREF0 : Centre de Recherche et de Formation sur le VIH et la Tuberculose

SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquis

SST : Sérum Séparation Tube (Tube de Séparation de Sérum)

TB : Tuberculose

TB-MR : Tuberculose Multirésistante

TPM + : Tuberculose Pulmonaire à Microscopie positive

UFC : Unité Formant Colonie

UCRC : University Clinical Research Center (Centre Universitaire de Recherche Clinique)

USTT-B : Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

INTRODUCTION

1 Introduction

La tuberculose (**TB**) est une maladie infectieuse causée par les mycobactéries du complexe tuberculosis (MTBC). Contagieuse, elle se transmet par voie aérienne **(1)**. Elle arrive en tête des causes de mortalités d'origine infectieuse à l'échelle mondiale. Environ 1,7 milliard de personnes, soit 23 % de la population mondiale, présentent une infection tuberculeuse latente et risquent donc de développer une tuberculose évolutive **(2)**.

Selon l'OMS en 2019, 10 millions de personnes ont contracté la tuberculose avec 1,5 millions de décès en 2018. L'Afrique et l'Asie comptent 70% des cas de TB mondiale **(2)**. Les échecs de traitement et les rechutes occupaient 17% du total de la TB détectée en 2017. L'Inde (24 %), la Chine (13 %) et la Fédération de Russie (10 %) occupaient près de la moitié des cas de TB multirésistants/résistant à la Rifampicine(TB/MR) **(2)**. Ceci fait courir un risque de transmission des souches de mycobactéries résistantes dans la population générale **(3)**.

Au Mali, l'incidence de la TB était estimée à 53/100.000 habitants en 2019, avec 7084 nouveaux cas toutes formes confondues dont 3,33% d'échecs et 1,49% de rechute **(3)**. Une étude réalisée au Mali en 2015 à UCRC/SEREFO a trouvé 12% de Mycobactéries Non Tuberculeuses (MTN) parmi les cas d'échec et de rechute **(4)**.

Dans les pays d'endémie tuberculeuse, les MTN étaient considérées comme négligeables au point que des études récentes ont montrées leur impact éventuel sur la prise en charge de patients présentant des symptômes analogues à la tuberculose **(5)**. Les raisons de l'augmentation des MTN ne sont pas claires mais certains facteurs de risque spécifique ont été identifiés dans différentes études parmi lesquels le VIH/SIDA, les maladies chroniques à prédilection pulmonaire (Emphysème), le travail dans les mines, le climat chaud, l'âge avancé **(1)**. Dans les pays industrialisé (Etat Unis), la prévalence des MTN était estimée entre 1 et 1,8 cas sur 100000 hbts 2007 **(6)**.

Le diagnostic différentiel rapide des infections à MTBC/MTN reste un défi majeur dans le cadre du contrôle et surveillance de la tuberculose humaine (3).

La culture des mycobactéries (méthode de référence) nécessite un laboratoire équipé de niveau de sécurité 3, très coûteux, avec des résultats longs (4 à 6 semaines) (7). Ceci peut favoriser : la progression des lésions, la contagion de l'entourage, la perte de vue et même le décès du malade. Les progrès technologiques ont permis de pallier au long délai de la culture par le développement de nouveaux outils de diagnostic moléculaire plus rapide (1 à 2 heure) raccourcissant le délai de prise en charge des patients (8) tel que le GeneXpert MTB/RIF ou permettant de dissocier une TB et une MTN telles que la PCR multiplexe (Une technique fait maison) (9).

La PCR multiplexe est une nouvelle technique moléculaire, en cour de validation permettant d'identifier à la fois CMT et MTN. Les tests moléculaires disponibles délivrent des résultats rapidement, comparé à la culture, mais pose un problème de spécificité et de sensibilité. Au vu de ces insuffisances nous avons décidé d'implémenter la PCR multiplexe récemment développé avec 100% de sensibilité et spécificité sur des échantillons commerciaux. Le but de notre étude était de faire une pré-évaluation de la PCR multiplexe dans le groupe des retraitements antituberculeux (échecs ou rechute) qui regroupent la majorité des MTN.

OBJECTIFS

1.1 QUESTION DE RECHERCHE ET OBJECTIFS.

La PCR multiplexe est-elle aussi performante dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire comparée à la culture chez les patients en échecs de traitement ou rechute ?

1.1.2 Hypothèse de recherche

La PCR multiplexe est aussi performante que la culture dans le diagnostic de la TB chez les patients en échecs de traitement ou rechutes.

1.1.3. OBJECTIFS

1.1.3.1 Objectif général

Evaluation primaire de la technique de PCR multiplexe par rapport à la culture dans le diagnostic de la tuberculose chez les patients en échecs ou rechute de traitement antituberculeux à Bamako, Mali.

1.1.3.2 Objectifs Spécifiques :

- Déterminer les caractéristiques sociodémographiques des patients tuberculeux en échec de traitement ou rechute de la tuberculose à Bamako, Mali.
- Déterminer la performance de la PCR multiplexe dans la population des patients tuberculeux en échec de traitement ou rechute ~~de tuberculose~~ à sérologie VIH positive.
- Déterminer la performance de la PCR multiplexe dans la population des patients tuberculeux en échec de traitement ou en rechute ~~de tuberculose~~ à sérologie VIH négative.
- Comparer la PCR multiplexe à la culture dans le diagnostic de la tuberculose chez les patients en échec de traitement ou rechute ~~de tuberculose~~ à Bamako, Mali.

GÉNÉRALITÉS

2. Généralités :

2.1. Définitions :

- **La tuberculose** : se définit comme une maladie infectieuse dont l'agent pathogène est le complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMT). C'est une maladie à déclaration et à traitement obligatoires (10).
- **Rechute** : c'est un patient précédemment traité pour une TB et déclaré guéri ou ayant achevé son traitement et faisant cependant l'objet d'un diagnostic bactériologique de la TB (frottis d'expectoration ou culture) positif (11). ➤
- Echec** : C'est un patient sous traitement qui présente des frottis de crachats positifs après 5 mois ou plus de traitement (12).
- **La Tuberculose Monorésistante** : C'est une TB qui est résistante à un seul antituberculeux de la première ligne (11)
- **La Tuberculose Polyrésistante** : C'est une TB qui est résistante à plus d'un antituberculeux de première ligne, autre que l'isoniazide et la rifampicine à la fois (11).
- **La Tuberculose multirésistante (TB-MR ou MDR-TB)** : c'est une TB qui est résistante simultanément au moins à l'isoniazide et à la rifampicine (11).
- **La Tuberculose Ultrarésistante (UR ou XDR-TB)** : C'est une TB-MR à laquelle s'ajoute une résistance à n'importe quelle fluoroquinolone et au moins à un des trois antituberculeux injectables de la deuxième ligne (capréomycine, kanamycine et amikacine) (13).

2-2 Différents types de tuberculose (14).

On distingue 3 types de tuberculose

- La tuberculose pulmonaire ou « *phthisie* ». C'est la forme la plus courante de tuberculose (environ 70 % des cas).
- La tuberculose extra pulmonaire (**Pleurésie, ganglionnaire, osseuse, péritonéale, péricardique etc.**)
- La tuberculose disséminée ou miliaire (comme des graines de millet disséminées dans tout le poumon, lui donnant une apparence caractéristique).

2-3 Prise en charge de la tuberculose au Mali :

La prise en charge de la TB au Mali est basée sur :

- un examen clinique
- une radiographie thoracique
- bilan biologique (Microscopie par le Ziehl Nielsen puis, Moléculaire Test Xpert MTB/RIF de GeneXpert).
- Le Protocole de traitement est instauré après confirmation comme suite :

SCHEMA THERAPEUTIQUE :(15)

Tableau I : Schéma thérapeutique

Catégories	Schéma thérapeutique
Catégorie 1 et 2 : Adulte et Enfant	2RHZE/4RH
Catégorie 3 : Adulte	2RHZE/ 4RH
Catégorie 3 : Enfant	2RHZ/ 4RH

Isoniazide (**H**), Rifampicine (**R**), Pyrazinamide (**Z**), Ethambutol (**E**), Streptomycine (**S**), la streptomycine a été éliminée des régimes de traitement de la tuberculose.

2.4. Epidémiologie

2.4.1 Epidémiologie globale

La TB est un problème mondial de santé publique. En 2018, on estimait qu'environ 10 millions de personnes ont développé la TB active, ce nombre est resté relativement stable au cours des dix dernières années (16). La charge de morbidité varie considérablement d'un pays à l'autre, allant de moins de cinq à plus de 500 nouveaux cas pour 100 000 habitants par an, la moyenne mondiale étant d'environ 130 nouveaux cas dont 1,2 millions de décès dans le monde (13). *Mycobacterium tuberculosis* est l'espèce du complexe *Mycobacterium tuberculosis* responsable de la majeure partie des infections chez l'homme. La contamination interhumaine se fait essentiellement par voie aérienne à partir de gouttelettes de sécrétions respiratoires (gouttelette de Pflügge).

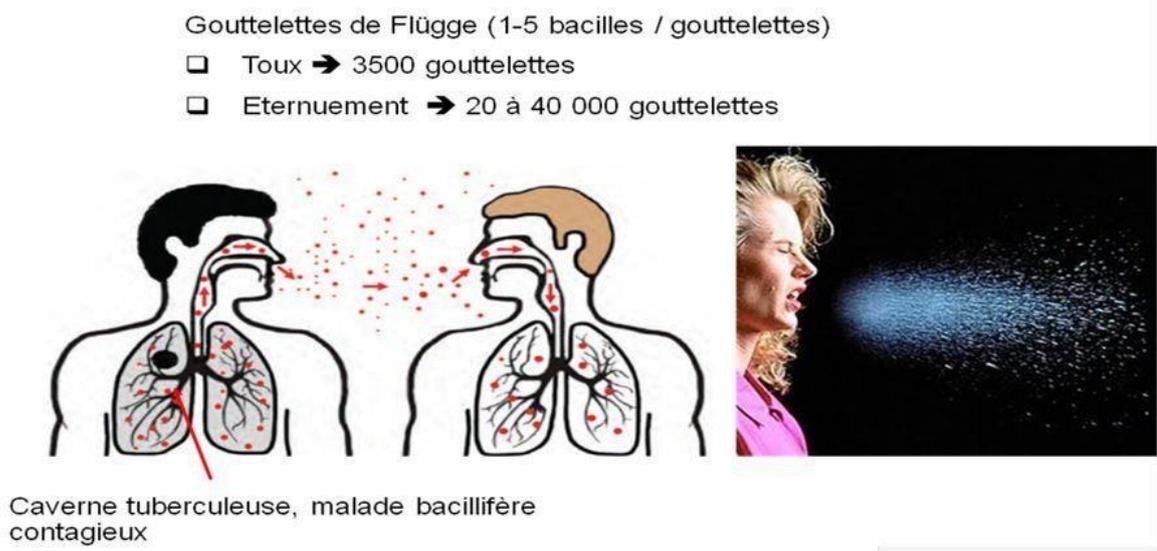


Figure 1 : Emission de gouttelettes de Pflügge par un malade tuberculeux bacillifère (adapté de <https://encryptedtbn3.gstatic.com/images>.)

Depuis l'an 2000 une attention particulière est portée sur 22 pays qui constituent 80% des cas de TB mondiale. En absence de traitement, une personne atteinte de TB évolutive pulmonaire peut en infecter en moyenne 10 à 15 autres personnes (14).

La pandémie de VIH-SIDA et l'émergence des bacilles multirésistants aux antibiotiques contribuent à aggraver l'impact mondial de la tuberculose. Les sujets coinfectés par TB/VIH ont 20 à 30 fois plus de risque de développer une tuberculose évolutive. En 2016, environ 0.4 million de personnes sont mortes de la coinfection TB/VIH dont environ 40% des décès parmi ces personnes vivant avec le VIH (PVVIH) sont dus à la tuberculose. Cette même année, on estime qu'il y'a eu 1.7 million de nouveaux cas de TB chez les séropositifs au VIH, dont 74% vivaient en Afrique (15). L'OMS estime qu'entre l'an 2000 et l'an 2020, près d'un milliard de personnes seront nouvellement infectées et 200 millions développeront la maladie tuberculeuse, dont 35 millions mourront de TB si aucune amélioration n'est apportée dans le contrôle de cette infection (17). Le rapport de l'OMS 2017, atteste que dans les pays industrialisés, le risque d'infection déclinait de 10 à 15% et le seuil d'éradication était fixé à 2015-2030 (18). Par contre, dans les pays à ressources limitées, le taux de déclin était estimé de 5 à 10% en Amérique latine, dans les Caraïbes et en Afrique du nord. Ce taux diminue et était au maximum de 3% en Afrique sub-saharienne et en Asie du sudest, du même ordre que le taux de croissance démographique (18) .

Estimated TB incidence rates, 2018

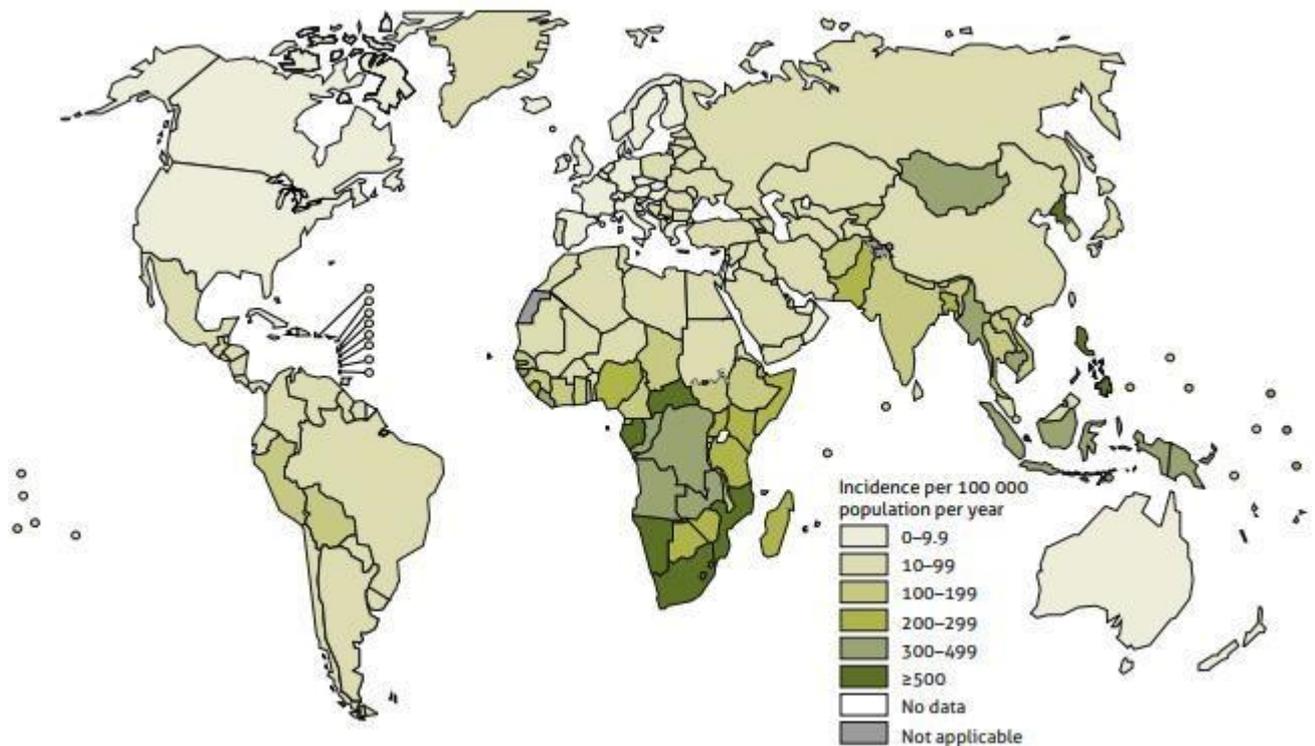


Figure 2 : Taux d'incidence estimés de tuberculose pour 100 000, OMS, 2018(19)

2.4.2 Epidémiologie de la tuberculose au Mali

Au Mali, l'incidence de la tuberculose était estimée à 60 cas pour 100000 par ailleurs 10000 nouveaux cas étaient attendus en 2018. Le niveau de transmission de la maladie et les paramètres épidémiologiques ont été globalement stables ces dix dernières années.

2.4.3 Epidémiologie des Mycobactéries Non Tuberculeuse (MTN)

L'incidence de MTN était de 1 à 1,8 cas pour 100 000 habitants en 2007 (Estimation Américaine, ATS/IDSA) (20). Les infections à MTN ne font pas l'objet de déclaration obligatoire et l'estimation de l'incidence est, en fait, basée sur le nombre de cas rapportés après isolement de ces mycobactéries (18). De manière globale, l'incidence des MTN augmente chaque année, même s'il reste

difficile de savoir si cela est associé à une augmentation du nombre de patients infectés à MTN ou simplement à une amélioration des techniques d'isolement des MTN.

Les mycobactéries atypiques les plus fréquemment responsables d'infections respiratoires sont les MTN à croissance lente telles que le *M. avium*, *M. intracellulaire* et *M. chimaera* qui forment le complexe aviaire (MAC). *M. kansasii*, *M. xenopi* et plus rarement *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. simiae*. Parmi les MTN à croissance rapide on peut citer le *M. abscessus*, *M. bolletii* et *M. massiliense* qui forment le complexe *abscessus* (MABSC) et beaucoup plus rarement *M. fortuitum* et *M. chelonae* (confondu avec *M. abscessus* dans les études antérieure (21).

2.5. Diagnostic de la tuberculose.

2.5.1 Diagnostic microscopique :

La microscopie des frottis d'expectorations par la méthode de Ziehl Nielsen est la principale méthode de diagnostic de la tuberculose pulmonaire dans les pays à revenu faible et à revenu intermédiaire (9). C'est un test simple, rapide mais elle a une faible sensibilité avec un seuil de détection de 10 000 UFC/ μ d'expectoration et une spécificité faible surtout dans les zones où les coinfections CMT/MTN sont fréquentes (7).

2.5.2 Diagnostic moléculaire de la tuberculose par le test Xpert® MTB/RIF

C'est un test PCR en temps réel permettant à la fois la détection des mycobactéries du complexe tuberculosis et leur résistance à la Rifampicine. C'est un test simple à réaliser ne nécessitant pas de compétences particulières pour le manipulateur ni d'infrastructures répondant aux critères d'exigence habituels pour réaliser des tests moléculaires (8). Ce test est sensible aux membres du complexe MTB uniquement, cependant il ne peut pas détecter les NTM.

2.5.3 Diagnostic par la culture :

Initialement pratiquée sur milieux gélosés de Löwenstein-Jensen et de Coletsos, nécessitant 3 à 6 semaines, elle est aussi aujourd'hui réalisée sur milieu liquide de Middlebrook réduisant le temps de positivité de la culture. La lecture de ces milieux peut être automatique à travers l'automate ou manuelle mais ne différencie pas le CMT des MNT (8). Elle ne nécessite que 10 UFC/ML pour être positive (6). Cependant, elle doit être effectuée dans un laboratoire à haut confinement, de niveau de biosécurité élevé souvent indisponible dans les pays à ressources limitées.

2.6 Diagnostic des Mycobactéries Non Tuberculeuses (MTN).

Le réservoir des MNT est environnemental (terre, eau, mais également dans les réseaux de distribution d'eau, même après traitement), la présence d'une MNT dans un prélèvement ne permet pas d'affirmer le diagnostic d'infection. L'isolement d'une MNT dans les prélèvements respiratoires n'apporte pas la certitude d'une infection pulmonaire à MNT. En effet, étant donnée leur caractère environnemental, leur présence peut être liée à une contamination du prélèvement (21).

2.6.1 Diagnostic bactériologique des MNT.

Les critères microbiologiques sont indispensables au diagnostic d'infection liée aux MTN. Ces critères ont été régulièrement modifiés au cours des dernières décennies. Actuellement, il est nécessaire d'avoir soit :

Tableau II : Critères de diagnostic de confirmation des MNT. (22).

Au moins deux cultures positives à MNT sur deux expectorations prélevées deux jours différents
Et /ou une culture positive à MNT sur un LBA ou une aspiration bronchique dirigée
Et /ou une biopsie transbronchique ou une biopsie pulmonaire chirurgicale ayant une histologie en faveur d'une infection à mycobactéries (granulome ou coloration de Ziehl positive) et une culture positive ou une biopsie ayant une histologie compatible avec une mycobactériose et une ou plusieurs expectorations positives en culture à MNT.
ATS Au minimum, le clinicien doit disposer du résultat de trois examens cyto bactériologiques de crachat réalisés à des dates différentes pour discuter du diagnostic. En effet, 90 à 93 % des patients ayant les critères bactériologiques /IDSA d'infection à MNT ont une réelle infection selon ces mêmes définitions

Critères ATS/IDSA 2007 (22).

- Critères clinico -radiologiques.
- Critères microbiologiques.
- Exclusion des autres diagnostics.

Tout patient suspect d'infection à MNT doit être suivi jusqu'à ce que le diagnostic soit clairement affirmé ou infirmé :

- Diagnostic plus ou moins probable selon l'espèce en cause.
- *M. gordonae*, *M. terrae complex*, *M. mucogenicum* et *M. scrofulaceum* : colonisation.
- *M. kansasii* et *M. szulgai* : quasiment toujours infection réelle.

- MAC : 40 à 67 % d'infection réelle, *M. xenopi* 60 à 73 %, *M. abscessus* 30 à 50 %.

Tableau II : Critères bactériologiques pour le diagnostic d'une infection pulmonaire à mycobactérie non tuberculeuse chez le patient non immunodéprimé (26).

Au moins 2 expectorations positives en culture à la même mycobactérie
- ou culture positive d'une aspiration bronchique ou lavage broncho-alvéolaire disponible
- Ou un prélèvement tissulaire avec granulome ou montrant la présence de mycobactéries sur les colorations spéciales et positif en culture
- ou prélèvement tissulaire avec granulome ou montrant la présence de mycobactéries sur les colorations spéciales et ou une ou plusieurs expectoration(s) ou aspiration bronchique positive(s) en culture

2.6.2 Diagnostic moléculaire des mycobactéries non tuberculeuses (MTN).

L'identification des mycobactéries atypiques est également réalisée par tests moléculaires.

2.6.3 Hain Test des MTN.

GenoType *Mycobacterium* CM (« Mycobactéries communes ») permet la différenciation rapide et fiable du complexe *M. tuberculosis* et des MNT.

Le GenoType *Mycobacterium* CM permet l'identification du CMT et la différenciation de 27 espèces de MNT cliniquement pertinentes. En outre, une sonde spécifique à une espèce indique si des membres du genre *Mycobacterium* sont présents. Dans ce cas, une différenciation supplémentaire avec GenoType *Mycobacterium* AS est recommandée (23).

2. 7. Nouvelles perspectives de diagnostic simultané du CMT et MTN par la technique de PCR MULTIPLEXE.

2. 7.1 Principe du test PCR.

La PCR quantitative en temps réel repose sur la possibilité de suivre le résultat de l'analyse en cours (« en temps réel »). À l'aide de la fluorescence. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct et apparaît en début de phase exponentielle (23). La PCR est une suite de cycles, qui se répètent en boucle, comportant chacun trois paliers de température. De plus, chacun de ces paliers est caractérisé par une réaction chimique distincte. En moyenne une PCR comporte entre 20 et 40 cycles (24).

METHODOLOGIE

2. Méthodologie :

2.1 Type, période et lieu d'étude :

Nous avons réalisé une étude transversale allant du 01 Novembre 2018 au 30 Octobre 2019 au Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC/ SEREFO) de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB).

2.2 Cadre de l'étude :

Les patients ont été recrutés dans les 06 centres de santé de référence (CSRéf) du district de Bamako et le service de Pneumo-Phtisiologie du CHU Point « G ». Les échantillons ont été envoyés au laboratoire SEREFO (Centre de Recherche et de Formation sur le VIH et la Tuberculose, actuel UCRC) qui a été inauguré officiellement le 06 mars 2006. Ce programme de recherche est le fruit d'un partenariat entre l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB ex Université de Bamako) et l'Institut National d'allergie et des maladies infectieuses des Instituts Nationaux de la Santé des Etats Unis d'Amérique (NIH/NIAID). Depuis 2015, les laboratoires UCRC/SEREFO font partie du programme de recherche clinique de l'université appelé Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC). Ce centre possède plusieurs laboratoires :

- Un Laboratoire Core Immunologie
- Un Laboratoire Clinique
- Un Laboratoire de Tuberculose et des Fièvres hémorragiques
- Un Laboratoire de biologie moléculaire
- Un laboratoire d'immunologie (Core)
- Un Laboratoire d'épidémiologie moléculaire du VIH
- Un laboratoire d'immunologie (Core) : Il a en son sein des cymomètres de flux et des chaînes ELISA complètes. Ce laboratoire conduit

des études permettant de complexes visant à mieux comprendre la pathogénie de la maladie, explore le système immunitaire et conduit des évaluations de nouveaux vaccins contre le paludisme et la maladie à virus Ebola.

➤ Le laboratoire de tuberculose et des fièvres hémorragiques : C'est un laboratoire de Biosécurité de Niveau 3 (BSL-3+) permettant la manipulation de pathogènes hautement dangereux. Il est certifié annuellement par des structures habilitées pour les normes internationales de sécurité microbiologiques depuis 2006. C'est un des premiers laboratoires de niveaux de sécurité 3 plus dans la sous-région francophone. Elle a conduit le diagnostic des suspects de la maladie à virus Ebola du Mali et certains pays tels que la Guinée. Elle a joué un rôle clé dans la riposte contre l'épidémie ouest africaine (2014-2015) de la maladie à virus Ebola et conduit actuellement le diagnostic des patients suspect de COVID-19 au Mali.

➤ Un laboratoire de biologie moléculaire : composé de plusieurs thermocycleurs pour PCR classique et PCR en temps réelle. Ce laboratoire fait essentiellement le typage des souches mycobactérie isolées dans le BSL-3 en vue d'établir l'épidémiologie moléculaire de la tuberculose au Mali et conduit le diagnostic les fièvres hémorragiques et le nouveau coronavirus après inactivation dans le BSL-3.

➤ Un laboratoire d'épidémiologie moléculaire du VIH : il s'occupe essentiellement du suivi de la charge virale des patients infectés par le VIH/SIDA sous traitement antirétroviral (ARV). Elle conduit aussi le génotypage des souches de VIH en vue de déterminer s'ils sont résistants aux ARV.

Population d'étude :

Les patients tuberculeux en échec de traitement ou en rechute tuberculeuse après une guérison et les patients suspects de tuberculose sur la base clinique et dont la microscopie est revenue négative dans nos sites de recrutement pendant notre période d'étude constituent notre population d'étude.

3.3 Critères d'inclusion :

- Patient diagnostiqué tuberculeux en cas d'échec de traitement ou de rechute tuberculeuse sur la base de la microscopie et confirmé par la culture (groupe des cas) ou suspect de tuberculose avec une culture négative (groupe contrôle) ;
- Etre âgé de 18 ans ou plus ;
- Etre naïf de traitement antituberculeux pour les Co infectés TB/VIH.

3.4 Critères de non inclusion :

N'était pas inclus dans cette étude :

- Tout patient qui ne répondait pas aux critères cités ci-dessus ;
- Les patients n'ayant pas accepté de signer le consentement ;
- Patient ayant une culture négative parmi les cas d'échec de traitement ou de rechute tuberculeuse et ceux ayant une culture positive parmi les contrôles.

3.5 Echantillonnage :

L'échantillonnage a été exhaustif. Tous les patients répondant aux critères d'inclusion durant notre période d'étude ont été enrôlés.

3.6 Procédures de l'étude :

Après consentement, les patients ont effectué chacun deux (2) visites en 48 heures durant lesquelles des crachats et des prélèvements de sang ont été effectués :

A la première visite, un échantillon de crachat ayant un volume supérieur ou égal à 5 ml a été collecté en plus de 10 ml de sang (5ml tube sec et 5ml EDTA). Après prélèvement les échantillons ont été envoyés pour la Numération de Formule Sanguin (NFS) et la sérologie HIV.

A la deuxième visite, deux échantillons de crachats ont été collectés.

3.7. Technique de laboratoire.

Au laboratoire de l'UCRC tous les échantillons ont fait l'objet de tests suivants : Cultures et identifications des mycobactéries du complexe tuberculosis, la PCR multiplexe, la numération formule sanguine et la sérologie HIV.

3.7.1 Culture et Identification des Bacilles tuberculeux :

Les échantillons de crachats réceptionnés et identifiés ont été décontaminés, digérés et fluidifiés par le N-acétyle-L-Cystéine ou NAC PAC dans des tubes. Puis centrifugés pendant 15 min à 4500rpm sans frein à 5°C. Après que le surnageant ait été éliminé dans un récipient contenant la Vesphene, le culot bien homogénéisé a servi à réaliser des frottis sur lames pour la microscopie et à inoculer le milieu liquide MGIT qui avait été auparavant enrichi avec 0,8 ml du supplément de croissance OADC (Oleic Acid Dextrose et Catalase) et 0,1 ml de PANTA (association de cinq antibiotiques : Polymixine B, Amphotéricine B, acide Nalidixique, Trymetoprine et Azlocilline) pour favoriser toujours la croissance des mycobactéries. Les tubes MGIT ont été scannés incubés dans le Bactec 960. Ces cultures ont été incubées à 37±1,5°C en présence de CO₂ à 7% pendant 6 semaines ou 42 jours.

L'isolement des souches était réalisé par ensemencement de la culture liquide positive sur le milieu solide 7H11 Middlebrook et incubé à 37±1,5°C en présence de CO₂ à 7% pendant 6 semaines. Toutes les colonies

identifiées macroscopiquement et microscopiquement avec un microscope optique (identification phénotypique) ont fait l'objet d'identification Immuno-chromatographique par le test Capilia TB-Neo® assay, spécifique aux mycobactéries membres du complexe tuberculosis.

3.7.2 Technique de PCR multiplexe :

3.7.2.1 Extraction d'ADN :

➤ Matériels et réactifs utilisés

- Matériels utilisés

- Tubes coniques 1.8ml
- Tube de fluidification contenant de la solution de Lauryl Sulfate de Sodium (SDS) et du Tris PH8 pour homogénéiser le crachat
- Tube de liaison contenant du sel de Magnésium et de Sodium
- Plaque chauffante agitatrice
- Portoir magnétique
- Portoir rotatrice
- Micropipette et embouts de 10µl
- Micropipette et embouts de 20µl
- Micropipette et embouts de 100µl
- Micropipette et embouts de 200µl
- Micropipette et embouts de 1000µl
- Pipette de 1µl
- Pipette de Pasteur
- Portoir de tube conique
- Centrifugeuse
- Les tubes coniques 1.5 ml
- Réactifs utilisés et leur rôle

• Tampon de Tris et Tween20 : Il est utilisé comme solution de lavage. □

Protéinase K : Il lyse la paroi bactérienne et libère le matériel génétique.

- Contrôle d'extraction : il permet de confirmer la présence ou pas de l'ADN après extraction.
- Solution de Bille : elle permet de capturer l'ADN par l'intermédiaire de la capture sonde.
- Capture sonde : il permet la capture des brins d'ADN complémentaire des MNT et du CMT.

➤ Procédure d'extraction d'ADN par capture spécifique

Préparer le poste de sécurité microbiologique (Hotte) : placer du papier absorbant et l'imbiber de solution désinfectante.

1. Transférer le crachat dans les tubes de fluidifications, ajouter 10 μ l du contrôle d'extraction et 50 μ l de protéinase K pour fluidifier le crachat.
2. Incuber pendant 8 minutes à 55°C et ensuite continuer cette incubation pendant 10 minutes à 100°C sur une plaque chauffante agitatrice en même temps.
3. Pendant l'incubation préparer des tubes de liaisons et mettre 5 μ l de sonde de capture (une sonde qui va se lier avec les ADN de mycobactéries dans le tube).
4. Après les 10 minutes d'incubation, centrifuger brièvement l'échantillon de crachat fluidifié.
5. Transférer l'échantillon de crachat fluidifié dans le tube préparé contenant la sonde de capture.
6. Mélanger et le remettre en incubation à 60°C pendant 20 minutes.
7. Avant la fin de l'incubation, prendre 22 μ l d'une solution de bille pour chaque échantillon et placer les sur le portoir magnétique pour laver les billes. Les billes adhèrent la paroi du tube en contact avec le portoir magnétique et on enlève le surnageant.
8. Reprendre ce lavage 3 fois avec la solution tampon.

9. Après ces lavages, remettre en suspension les billes dans le volume initial.
10. Après les 20 minutes ajouter 20µl de cette solution de bille lavé dans chaque échantillon
11. Placer les échantillons sur un portoir rotatif pendant 10 minutes afin de bien mélanger la solution. Les billes vont se coller aux ADN de mycobactéries déjà hybridés avec les sondes de capture.
12. Centrifuger brièvement après cette étape.
13. Placer l'échantillon sur le portoir magnétique pour retirer le surnageant les billes collées aux ADN de mycobactéries hybridés restera collé à la paroi du tube.
14. Ajouter 1ml de solution tampon dans le tube avec ADN hybridé et bille, bien mélangé puis le remettre dans un nouveau tube
15. Placer le tube sur le portoir magnétique et retirer encore le surnageant (Reprendre ceci 3 fois).
16. Ajouter 20µl de la solution d'élution.
17. Incuber pendant 3min sur la plaque chauffante à 75°C et agitatrice.
Récupérer l'éluât (ADN de mycobactérie) à l'aide du portoir magnétique pour la PCR.

3.7.2.2 La PCR multiplexe :

- Matériels et réactifs utilisé
- Matériels
- 18. Micropipette de 10µl
- 19. Micropipette de 20µl
- 20. Micropipette de 100µl
- 21. Micropipette de 200µl
- 22. Plaque de PCR

- Réactifs et amorces utilisées pour la préparation du Master Mix
- Tréhalose : Il est un acteur crucial dans l'assemblage et l'architecture de la remarquable enveloppe cellulaire mycobactériennes en tant qu'élément de glycolipides hautement antigéniques uniques, à savoir le diméthylcolate de tréhalose.
- L'amorce du gène IS6110 : Elle est présente uniquement dans les agents pathogènes du Complexe *Mycobacterium tuberculosis* et est le marqueur épidémiologique de référence pour la tuberculose et joue un rôle important dans la plasticité du génome des micro-organismes.
- L'amorce du gène IS1311 : Elle est présente dans le Complexe *Mycobacterium avium* est le marqueur spécifique de ce dernier.
- Gène CotJc : gène d'atrophaeus Bacillus spore et sert de contrôle d'extraction.
- DésoxyriboNucléotides de Tri-Phosphate d'ATP : sont les monomères précurseurs de l'ADN et qui peuvent ainsi être utilisés pour l'amplification de l'ADN par PCR.
- L'amorce du gène SenX3-RegX3 : C'est un gène qui est nécessaire à la survie du CMT lors d'une infection murine (infections des rats, des souris etc...).
- Les amorces des autres mycobactéries (Pan Myco) : Ensembles des amorces spécifiques pour les mycobactéries non tuberculeuses considérées par notre étude en se basant sur leur capacité à engendrer une pathologie chez l'homme et leurs prévalences au Mali.

- Tween20 : est un agent dispersant et solubilisant non ionique, ni toxique, ni irritant dériver du sorbitol utilisé dans l'industrie alimentaire et chimique.
- L'Eau ultra pure : Il est utilisé pour les dilutions.
- Albumine du Sérum de Bovin (BSA) : offre de nombreuses utilisations possibles comme protéine porteuse et comme agent stabilisant dans les réactions enzymatiques.

Des quantités indiquées par le fabricant sont prises dans chaque amorce pour faire le mélange réactionnel (Master Mix). A la fin il est conditionné en quantité de 10 réactions et 20 réactions puis lyophilisé par la chaleur pour faciliter sa conservation. Ce qui constitue le lyophilisat de « Master Mix ».

➤ Reconstitution du lyophilisat du Mélange réactionnel (Master Mix)

Le lyophilisat est reconstitué avec une solution de Glycérol 60%, de la Bicine, du Chlorure de Magnésium, de l'Acétate de Potassium (KoAc), du Tris PH8, du Tween20 et de l'eau ultra pure.

Des quantités spécifiques sont indiquées pour le nombre de réaction utilisé. Ensuite on transfère 15ul du mélange réactionnel (Master-Mix) reconstitué dans les puits de la plaque de PCR et on ajoute 10ul de l'éluât d'ADN.

La plaque sera ensuite mise dans le thermocycleur (ABI Fast 7500 Dx®). Le test compte trois cycles avec des temps, températures et cycles différents et prends au maximum 2h qui sont :

-Le premier cycle ou cycle de dénaturation initiale : elle consiste à chauffer les brins d'ADN et dure 2min.

-Le deuxième cycle ou dénaturation cyclique : divise le double brin de l'ADN en simple brin. Elle dure 15sec et est répété 45 fois.

-Le troisième cycle : il consiste à l'hybridation des brins d'ADN puis faire la synthèse de ce brin, les amorces se couplent aux sondes et ses sondes émettent des fluorescences pour la lecture.

Les thermocycleurs utilisé dans notre étude sont Applied Biosystème® 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument avec le logiciel SDS. C'est un système d'amplification en temps réel et de détection de fluorescence à cinq couleurs disponibles pour un diagnostic in vitro. C'est un instrument qui offre des performances requises pour des résultats de haute qualité dans avec les plaques de 96 puits.

Deux régions ou génomes sont ciblées par l'essai. Il s'agit de la région IS6110 et le SenX3-regX3 pour détecter le CMT. Ces deux régions sont largement préservées chez le CMT et absentes chez les MNT. L'IS1311 a été utilisé comme cible d'identification pour toutes les espèces de MAC excepté *M. intracellulaire*.

3.8. Saisie et analyse des données :

Les données ont été recueillies sur des fiches d'enquêtes puis saisies sur une base de données électronique sécurisée (Redan=Record Electronic Data Capture) au niveau de l'Université Northwestern et analysées avec le logiciel Epi Info version 7.0. Test student pour les moyennes. La sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives positive et négative du multiplex ont été calculées pour faire une pré-évaluation de la PCR multiplexe. Un résultat est considéré comme statistiquement significatif si la probabilité (p) est inférieure à 0,05.

3.9. Considérations ethniques :

Cette étude a été approuvée par les comités d'éthiques de la FPOS-FPHA de l'USTTB au Mali et le comité d'éthique de l'université de Northwestern à Chicago aux Etats Unis.

Les participants inclus dans cette étude ont donné leur consentement de participation.

La confidentialité a été respectée par l'anonymat des échantillons et la conservation des dossiers dans une armoire fermée à clé limitant ainsi l'accès aux personnels non autorisés.

RESULTATS

4. Résultats :

4.1 Résultats Globaux :

Nous avons recruté au total 105 patients dont 61 patients en échecs de traitement (microscopie, culture et le test Capilia TB-Neo® positives au 5^{ème} mois de traitement) ou rechute (microscopie, et culture et le test Capilia TB-Neo® positifs après une guérison) et 44 cas contrôles (patients présentant une toux chronique avec microscopie négative pour MTBC). La moyenne d'âge était de 40 ans chez les tuberculeux et 42 ans pour les contrôles, le sexe masculin prédominait avec 77 %.

4.2 Caractéristiques sociodémographiques des patients.

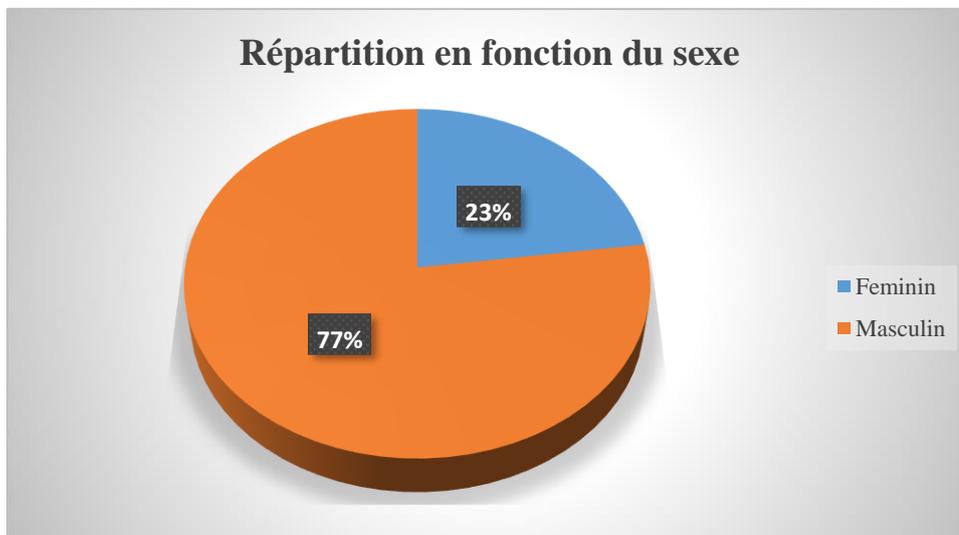


Figure 3 : Répartition des patients en fonction de leur sexe.
Le sexe masculin représentait 77% de nos patients.

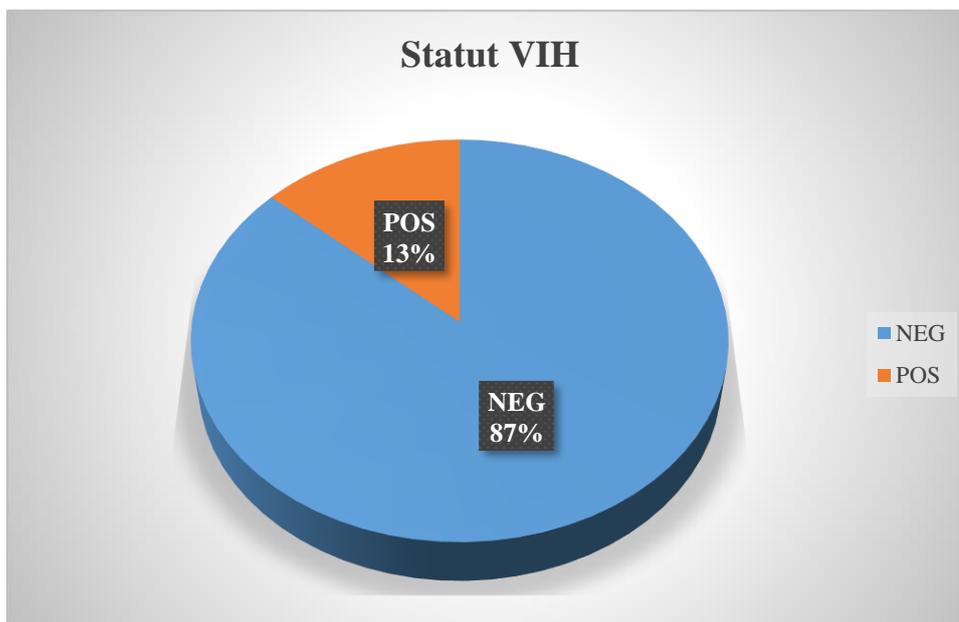


Figure 4 : Répartition des patients selon le statut VIH.
Dans cette étude, 13% de nos patients avaient une sérologie HIV positive.

4.2.1. Données Sociodémographiques en fonction du groupe des patients :

Tableau III : Répartition des patients en fonction du lieu de recrutement.

<i>Lieu de recrutement</i>	<i>Echec ou rechute n(%)</i>	<i>Contrôle n(%)</i>	<i>Total</i>
Commune I	7 (11,48)	0.0	7(6,67)
Commune II	1 (1,64)	0.0	1(0,95)
Commune V	42 (68,85)	35(79,54)	77(73,33)
Commune VI	8 (13,11)	9(20,46)	17(16,19)
Hôpital de Point G	3 (4,92)	0.0	3(2,86)
Total	61 (100)	44(100)	105(100)

La majorité de nos patients soit 73,33% provenaient de la commune V.

Tableau IV : Répartition des patients en fonction du sexe et groupe.

<i>Sexe</i>	<i>Echec ou rechute n(%)</i>	<i>Contrôle n(%)</i>	<i>Total</i>
Masculin	49(80,33)	32(72,73)	81(77,14)
Féminin	12(19,67)	12(27,27)	24(22,86)
Total	61(100)	44(100)	80(100)

Le sexe masculin était majoritaire dans les 2 groupes avec respectivement 80,33% chez les tuberculeux et 72,73% dans le groupe contrôle.

Tableau V : Répartition des patients en fonction du statut matrimonial.

<i>Statut</i>	<i>Type de patient</i>		
	<i>Echec et rechute n(%)</i>	<i>Contrôle (%)</i>	<i>Total</i>
<i>Matrimonial</i>			
<i>Marie(é)</i>	40 (65,57)	35 (79,55)	75 (71,44)
<i>Célibataire</i>	19 (31,16)	7 (15,90)	26 (24,76)
<i>Divorcée</i>	2 (3,27)	2 (4,55)	4 (3,80)
<i>Total</i>	61(100)	44(100)	105 (100)

Les Mariés représentaient 71,42% des patients de notre étude

Tableau VI : Répartition des patients en fonction des tranches.

<i>Groupe Tranche d'âge</i>	<i>Fréquence (n%)</i>
<i>18-24</i>	9 (8,57)
<i>25-34</i>	28 (26,67)
<i>35-44</i>	31 (29,56)
<i>45-54</i>	15 (14,29)
<i>55-64</i>	14 (13,32)
<i>65 et plus</i>	8 (7,60)
<i>Total</i>	105 (100)

La tranche d'âge 25-44 ans était la plus représentée avec 56,23% dans cette étude.

Tableau VII : Répartition des patients en fonction des professions.

<i>Profession</i>	<i>Echec ou rechute n(%)</i>	<i>Contrôle n(%)</i>	<i>Total n(%)</i>
<i>Cultivateur</i>	7(11,48)	7(16)	14 (13,40)
<i>Ménagère</i>	13(21,31)	10(22,72)	23 (22)
<i>Fonctionnaire</i>	4(6,56)	5 (11,36)	9 (8,65)
<i>Etudiant</i>	2(3,27)	2(4,54)	4 (4)
<i>Commerçant</i>	10(16,40)	6(13,64)	16 (15,29)
<i>Artiste</i>	1(1,64)	0	1 (0,09)
<i>Chauffeur</i>	7(11,47)	2(4,54)	9 (8,57)
<i>Ouvrier</i>	17(27,87)	12(27,20)	29 (28)
<i>Total</i>	61(100)	44(100)	105(100)

Les ménagères et les ouvriers étaient les plus représentés avec respectivement 22% et 28% chez les tuberculeux.

Tableau VIII : Répartition des patients en fonction de leur statut tabagique.

<i>Tabac</i>	<i>Echecs et rechute(%)</i>	<i>Contrôle(%)</i>	<i>Total</i>
<i>Oui</i>	18 (29,50)	4 (9,10)	22 (20,95)
<i>Non</i>	43 (70,50))	40 (90,90)	83 (79,05)
<i>Total</i>	61(100)	44 (100)	105 (100)

Les tabagiques occupaient 29.50% dans le groupe des patients tuberculeux contre 9.09% dans le groupe des contrôles.

4.2.2. Signes Cliniques en fonction du groupe.

Tableau IX : Répartition des patients selon les Signes cliniques et le groupe.

<i>Signes cliniques</i>		<i>Echec ou rechute</i> <i>n(%)</i>	<i>Contrôle</i> <i>n(%)</i>
<i>Toux</i>	Oui	61 (100)	44 (100)
	Non	0.0	0.0
<i>Fièvre (>=37,5)</i>	Oui	9 (14,75)	5 (11,36)
	Non	52 (85,24)	39 (88,66)
<i>Sueur nocturne</i>	Oui	1 (1,63)	1 (2,27)
	Non	60 (98,37)	43 (97,73)
<i>Douleur thoracique</i>	Oui	17 (27,86)	13 (29,54)
	Non	44 (72,13)	31 (70,45)
<i>Dyspnée</i>	Oui	20 (32,78)	11 (25)
	Non	41 (67,21)	33 (75)
<i>Râles crépitants</i>	Oui	28 (45,90)	7 (15,90)
	Non	33 (54,09)	37 (84,09)
<i>Epigastralgie</i>	Oui	5 (8,19)	6 (13,63)
	Non	56 (91,80)	38 (86,36)
<i>Vertige</i>	Oui	6 (9,83)	0.0
	Non	55 (90,16)	44 (100)
<i>Anorexie</i>	Oui	2 (3,27)	2 (4,54)
	Non	59 (96,72)	42 (95,45)

La toux était présente chez tous les patients soit 100% dans les deux groupes. La dyspnée était présente chez 32,78% de tuberculeux et 25% chez les cas contrôle et la douleur thoracique avec 27,86% chez les tuberculeux et 29,54% dans le groupe contrôle.

Tableau X : répartition des patients en fonction de leur IMC (indice de masse corporelle) et du groupe.

<i>IMC</i>	<i>Echec (%)</i>	<i>Contrôle(%)</i>	<i>Total(%)</i>
<i>Cachexie (<16,5)</i>	11 (18)	7 (15,90)	18 (17,15)
<i>Maigreur (16,5-18,5)</i>	25 (41)	8 (18,18)	33 (31,45)
<i>Normale (18,5-25)</i>	24 (39)	23 (52,27)	47 (44,80)
<i>Surpoids (25-30)</i>	1 (2)	4 (9,09)	5 (4,80)
<i>Obésité modérée (30-35)</i>	0	1 (2,28)	1 (0,9)
<i>Obésité morbide (>40)</i>	0	1 (2,28)	1 (0,9)
<i>Total</i>	61	44	105 (100)

Dans cette étude on notait 41% de patients avec une insuffisance pondérale(Maigreur) et 18% de patients cachexies chez les tuberculeux et 18,18% et 15,90%de maigreur et de cachexies dans le groupe contrôle.

4.2.3. Données Immuno-Hématologiques en fonction du groupe.

Tableau XI : Répartition des patients en fonction de leurs statuts VIH.

<i>Statut VIH</i>	<i>Groupe de patients</i>		<i>Total (n%)</i>
	<i>Echec rechute(%)</i>	<i>ou Contrôle (%)</i>	
<i>Positif</i>	10 (16,67)	4 (10)	14 (13,46)
<i>Négatif</i>	50 (83,33)	40 (90)	90 (86,54)
<i>Total</i>	60 (100)	44 (100)	104 (100)

Dans notre étude 13,46% avaient une sérologie VIH positive.

Tableau XII : Comparaison des moyennes des paramètres hématologiques entre les deux groupes.

<i>Paramètres hématologiques (Moyenne+Dev.Sta nd)</i>	<i>Echec rechute(*)</i>	<i>ou Contrôle(*)</i>	<i>Valeur de P</i>
<i>Leucocytes (10³cel/mm³)</i>	7,20±2,79	7,79±3,61	0,47
<i>Hémoglobine (g/dl)</i>	12,29±2,10	12,63±2,02	0,51
<i>Plaquette (10⁵/mm³)</i>	365,15±146,87	305,13±113,9	0,02
<i>Lymphocyte10³</i>	1,90±0,79	3,81±8,36	0,24
<i>Lymphocyte (%)</i>	26,22±9,69	34,34±14,57	0,01
<i>Neutrophile (%)</i>	54,58±17,15	50,75±16,47	0,39
<i>Neutrophile10³</i>	4,84±3,14	4,28±3,55	0,54
<i>Eosinophile (%)</i>	4,75±7,11	4,32±5,81	0,80
<i>Eosinophile10³</i>	0,33±0,41	0,38±0,84	00
<i>Basophile(%)</i>	1,35±0,88	1,07±0,46	0,53
<i>Basophile 10³</i>	1,19±5,55	0,07±0,02	0,08

La moyennes des taux de leucocytes, d'hémoglobine, lymphocytes, éosinophiles et des basophiles (valeur absolu 10³) étaient plus bas chez les tuberculeux par rapport aux cas contrôle. Par contre on note un taux de plaquettes et de neutrophiles plus bas dans le groupe contrôle par rapport aux tuberculeux.

Tableau XIII : répartition des patients en fonction du résultat du test Xpert MTB/RIF.

<i>Microscopie</i>	<i>Echec et rechute n (%)</i>	<i>Control n (%)</i>	<i>Total n(%)</i>
<i>Positive</i>	42 (82,35)	9 (17,65)	51 (48,57)
<i>Négatif</i>	19 (35,19)	35 (64,81)	54 (51,43)
<i>Total</i>	61 (100)	44 (100)	105 (100)

Dans notre étude 82,35% de nos patients avaient une Xpert MTB/RIF positive chez les tuberculeux et 17,65% dans le groupe des contrôles.

Tableau XIV : répartition des patients en fonction du résultat de la culture.

<i>Culture</i>	<i>Echec et rechute (%)</i>	<i>Contrôle n(%)</i>	<i>Total n(%)</i>
<i>Positive</i>	16 (26,23)	0,0	16 (15,53)
<i>Négatif</i>	45 (73,77)	42 (100)	87 (84,57)
<i>Total</i>	61 (100)	42 (100)	103 (100)

Tous les patients contrôle avait une culture négative et 26,23% seulement étaient tuberculeux sur 61 patients tuberculeux

4.3 Evaluation de la PCR Multiplexe.

Tableaux XV : La performance de la PCR multiplexe.

<i>PCR multiplexe</i>	<i>Culture</i>		
	<i>Positive</i>	<i>Négative</i>	<i>Totale</i>
<i>Positive</i>	12	13	25
<i>Négative</i>	4	30	34
	16	43	59

Tableau XVI : Performance de la PCR Multiplexe

<i>Paramètre</i>	<i>Valeur</i>	<i>Intervalle de confiance 95%</i>
<i>Sensibilité</i>	75%	[47,62-92,73]
<i>Spécificité</i>	69,77%	[53,87-82,82]
<i>VPP</i>	48%	[35,09-61,18]
<i>VPN</i>	88,24%	[75,84-94,72]
<i>Exactitude</i>	71,19%	[57,92-82,24]

VPP= valeur prédictive positive (VP/VP+FP)

VPN= Valeur prédictive négative (VN/VN+FN)

Dans notre étude de pré-évaluation de la PCR multiplexe, on a une sensibilité de 75% et une spécificité de 69,77%

Tableau XVII : Performance de la PCR multiplexe dans la population des tuberculeux à sérologie VIH positive.

<i>PCR multiplexe</i>	<i>Culture</i>		
	<i>Positive</i>	<i>Négative</i>	<i>Total</i>
<i>Positive</i>	3	0	3
<i>Négative</i>	3	4	7
	6	4	10

Dans cette étude 10 patients avaient une sérologie VIH positive

Tableau XVIII : Performance chez les VIH positive

<i>Paramètres</i>	<i>Valeur</i>	<i>Intervalle de confiance 95%</i>
<i>Sensibilité</i>	50%	11,81-88,19
<i>Spécificité</i>	100%	39,76-100
<i>VPP</i>	100%	
<i>VPN</i>	57,14%	37,46-74,80
<i>Exactitude</i>	70%	34,75-93,33

Dans notre étude de pré-évaluation de la PCR multiplexe chez les tuberculeux à sérologie VIH positive on a une sensibilité de 50% et une spécificité de 100%.

Tableau XIX : Performance de la PCR multiplexe dans la population des tuberculeux à sérologie VIH négative.

<i>PCR multiplexe</i>	<i>Culture</i>		
	<i>Positive</i>	<i>Négative</i>	<i>Total</i>
<i>Positive</i>	9	12	21
<i>Négative</i>	4	62	66
<i>Total</i>	13	74	87

Dans cette étude 87 patients avaient une sérologie VIH négative

Tableau XX : Performance chez les VIH négative

<i>Paramètres</i>	<i>Valeur</i>	<i>Intervalle de confiance 95%</i>
<i>Sensibilité</i>	69,23%	38,57- 90,91
<i>Spécificité</i>	83,78%	73,39- 91,33
<i>VPP</i>	42,86%	28,50-58,53
<i>VPN</i>	93,94%	87,21-97,24
<i>Exactitude</i>	81,61%	71,86-89,11

Dans notre étude de pré-évaluation de la PCR multiplexe chez les tuberculeux à sérologie VIH négative on a une sensibilité de 69,23% et une spécificité de 83,78%.

5. Commentaires et Discussion

Dans cette étude nous avons effectué une pré-évaluation de la PCR multiplexe dans le diagnostic de la tuberculose et comparer à la culture, le Gold standard (24). De Novembre 2018 à mars 2020, 105 patients ont été inclus parmi lesquels 61 cas d'échec de traitement ou rechutes tuberculeuses et 44 cas contrôles.

5-1 Les limites de l'étude :

- C'est une étude de pré-évaluation qui n'a pas une taille suffisante d'échantillonnage pour avoir une bonne visibilité des performances du multiplexe.

5.2 Données sociodémographiques :

Le *sex-ratio* était de 3,37 H/F chez les tuberculeux. Ce résultat est supérieur à celui de Makan Diallo au (Mali) qui a trouvé 1,30H/F *sex-ratio* (25). La prédominance de la tuberculose chez les hommes comparés aux femmes est bien reconnue (26). Certains facteurs de risque pourraient s'expliquer par la consommation de la drogue, tabac, alcool plus fréquent chez les hommes mais aussi le facteur hormonal (testostérone) (26). D'autres études incriminent le rôle des facteurs génétiques tendance masculine de la tuberculose (27). La tranche d'âge de 25-44 ans était la plus touchée (56,23%). Cela pourrait s'expliquer par la durée de protection du BCG (Bacille Calmette et Guérin) qui selon certaines études variait entre 10-15ans (28). Nos résultats sont similaires à celui de Gaoussou Ouattara au Mali (29) et de Jean Paul Dembélé (30), mais inférieure à celui de Souleymane Broulaye Traore en commune VI du district de Bamako avec 68% dans la même tranche d'âge.

5.3. Cliniques :

Dans notre étude les signes d'imprégnations bacillaires tels que la fièvre (14,75%), l'anorexie (3,27), et la sueur nocturne (1,63%) n'occupaient pas le premier plan de la symptomatologie. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les malades tuberculeux étaient sous traitement. Par contre l'amaigrissement a été enregistré chez 41% ce qui est inférieur à celui d'une étude réalisée à Bangui en milieu hospitalier avec 57,73% des cas(31).

Cependant, la présence de la toux (100%), la douleur thoracique avec (27,86%) et la dyspnée avec (32,78%) ne sont pas pathognomonique de tuberculose. La séroprévalence du VIH était de 16,66% chez les patients tuberculeux. Ce résultat est inférieur à ceux d'une étude réalisé par Ansari Abdallah Yehia au Mali en 2015(32) et par Agodokpessi G à Cotonou au Benin (33), cela pourra s'expliquer par le faite que dans notre étude, la sérologie HIV était systématique. Cependant ce résultat est comparable à celui d'une étude Ivoirienne (34). Le sexe féminin représentait 41,38% des patients séropositifs au VIH contre 21,57% hommes, ceci confirme les tendances rapportées par l'OMS par rapport à la féminité du VIH. Certaines de ces facteurs de la prédominance féminine au VIH sont liées à des particularités biologiques d'une part, et d'autre part certaines normes définies par les coutumes ou mœurs de nos sociétés (35).

5.3 Evaluation de la PCR Multiplexe :

Dans cette étude nous avons mené une pré-évaluation de la PCR multiplexe qui aboutira à des résultats préliminaires en vue de conduire une évaluation complète de méthode chez les cas d'échecs de traitement ou rechute tuberculeuse.

- La performance de la PCR multiplexe dans le diagnostic de la tuberculose dans la population des tuberculeux en échec ou rechute de traitement à sérologie VIH positive qui nous donne une sensibilité et spécificité de 50% et 100%.
- La performance de la PCR multiplexe dans le diagnostic de la TB dans la population des tuberculeux en échecs ou rechute de traitement à sérologie VIH négative qui nous donne une sensibilité et spécificité de 69,23% et 83,78%.

Dans cette étude préliminaire la détection globale de la TB par la PCR multiplexe a donné une sensibilité et spécificité respective de 75% et 69,77%. Elle avait des valeurs prédictives positive et négative de 48% et 88,24% avec une exactitude de 71,19%. Cette sensibilité pourrait être liée au type de malades (échecs et retraitement antituberculeux) et à la petite taille de l'échantillon dans cette étude. Par ailleurs, la sensibilité et sa spécificité restent aussi comparables au test Xpert/MTB-RIF de GeneXpert dans ce même groupe, qui est un test PCR recommandé par l'OMS dans le diagnostic de la TB avec une bonne sensibilité dans la détection de la résistance à la Rifampicine. Par contre, le test Xpert MTB/RIF n'a pas la capacité de détecter les MTN. La disponibilité d'un test capable de faire le diagnostic simultané des CMT et des MTN reste d'actualité surtout dans le groupe des échecs thérapeutiques. Une étude

conduite par le groupe UCRC/SEREFO donne une fréquence de 12% de MTN dans le groupe des échecs et retraitement.

De ce fait, quoique la PCR multiplexe ait une faible sensibilité il ouvre une porte au diagnostic simultané des MTBC /MTN directement sur le crachat, ce qui permettra de raccourcir non seulement le délai de rendu du résultat et aussi d'éviter des diagnostics erronés des cas de TB ou de MTN. En plus ce type de diagnostic simultané pourrait faciliter la prise en charge des cas NTM au lieu d'attendre l'échec du traitement antituberculeux et y penser au MNT.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

6 . Conclusion :

Cette étude de pré-évaluation a montré une sensibilité 75% relativement faible par rapport à la culture le Gold Standard, et un intervalle de confiance [47,62-92,73], avec une spécificité de (69,77%) et un intervalle de confiance [53,87-82,82].

Malgré cette faible sensibilité et spécificité du test pré-évalué chez les patients en échecs de traitement ou rechute il offre une valeur ajoutée avec le diagnostic différentiel entre MTB et MNT sur le crachat.

7. Recommandations :

Au terme de cette étude nous formulons des recommandations suivantes :

- ❖ Au Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique/PNLT
 - Soutenir le programme SEREFO/UCRC dans le développement des nouveaux outils simple et rapide pour le diagnostic de la tuberculose.

- ❖ A l'équipe de recherche SEREFO/UCRC et ses Partenaires - Etendre cette étude à un échantillonnage de grande taille comprenant toutes les régions du Mali pour mieux Evaluer ou apprécier la performance diagnostic du multiplexe.

RÉFÉRENCES

Bibliographie

1. **Zida S, Tarnagda Z, Kaboré A, Zingué D, Hien H, Sanou A, et al.** Etat des lieux des mycobactérioses atypiques au Burkina Faso : résultats d'une enquête régionale. Pan Afr Med J. 11 mars 2014.
2. **Global tuberculosis 2018 executive_summary_fr.pdf**
3. **Seydou Diabaté¹, Bocar Baya¹, Moumine Sanogo¹, Bassirou Diarra¹, Yacouba Toloba³, Gaoussou Berthé³ :**(PDF)
Epidemiology and Research on Tuberculosis in Mali : Current Status.
4. **Kone B, Sarro YS, Maiga M, Sanogo M, Somboro AM, Diarra B, et al** : Clinical characteristics of non-tuberculous mycobacterial pulmonary infections in Bamako, Mali. Epidemiol Infect. Févr. 2018.
5. **ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ Genève :**
WER9308.pdf
6. **C. Andréjak ^a, F.-X. Lescure ^b, J.-L. Schmit ^c, V. Jounieaux:** Diagnostic et traitement des mycobactérioses atypiques d'expression respiratoire: Doi : 10.1016/j.rmr.2011.02.016
7. **Culture - Tuberculosis.** Disponible sur :
<https://medicalguidelines.msf.org/viewport/TUB/francais/3-2-culture-20321733.html#>
8. **Diagnostic clinique et bactériologique de la tuberculose :**
EM|EM|consulte. Disponible sur :
<https://www.emconsulte.com/rmr/article/143749>
9. **Examen microscopique des crachats - Tuberculosis :** Disponible sur :
<https://medicalguidelines.msf.org/viewport/TUB/francais/3-120321728.html>

10. Tuberculose pulmonaire - Définition du mot Tuberculose pulmonaire

: Doctissimo Disponible sur :

<https://www.doctissimo.fr/sante/dictionnaire-medical/tuberculosepulmonaire>

11. WHO_CDS_TB_2003.313_fre.pdf Disponible sur :

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69518/WHO_CDS_TB_2003.313_fre.pdf?sequence=1

12. Définitions et cadre de notification pour la tuberculose - Révision 2013 : 9789242505344_fre.pdf Disponible sur :

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/110724/9789242505344_fre.pdf;jsessionid=F3E8867E5CF05000CD0A9EC96B07C852?sequence=1

13. La tuberculose à bacilles ultra-résistants (XDR) en France de 1998 à 2007 : EM|consulte. Disponible sur :

<https://www.empremium.com/rmr/article/196582>

14. La pneumonectomie pour les formes actives et séquellaires de la tuberculose - EM|consulte. Disponible sur :

<https://www.emconsulte.com/rmr/article/219306>

15. Tuberculose VIH_module_2007 : The drama of Africa, Published online 15 October 2006; DOI

<https://doi.org/10.1051/medsci/20062210878>

16. Rapport sur la tuberculose dans le monde 2019 :

gtbr2019ExecutiveSummary-frpdf.

17. Tuberculose_sida.pdf

http://medecinetropicale.free.fr/cours/tuberculose_sida.pdf

- 18. letinfo47.pdf [Internet].** Disponible sur :
<http://medecinetropicale.free.fr/cours/letinfo47.pdf>
- 19. Tuberculose [Internet].** Disponible sur : /maladies-ettraumatismes/maladies-et-infections-respiratoires/tuberculose
- 20. Blanc P, Dutronc H, Peuchant O, Tunon-de-Lara JM, Pellegrin JL, Doutre MS, et al.** Infections à mycobactéries atypiques : étude rétrospective, épidémiologique, clinique et bactériologique de 2002 à 2013. 2014 ;14.
- 21. Legrand E, Sola C, Rastogi N.** Le complexe *Mycobacterium avium* intracellulare : marqueurs phénotypiques et génotypiques et les bases moléculaires de la transmission inter-espèces. :11.
- 22. Pr Aubry Pierre, Docteur Bernard-Alex Gaüzère :** Infections à Mycobactéries Non Tuberculeuses Actualités Texte écrit le 16/02/2019.
- 23. V.Mathys¹²P.Lefèvre¹³V.Fontaine¹M.Dehem⁴P.Y.Donnio⁵F.Février⁶A.Le Coustoumier⁶P.Bifani¹** La PCR en temps réel: principes et applications. : [https://doi.org/10.1016/S1294-5501\(07\)91380-1](https://doi.org/10.1016/S1294-5501(07)91380-1).
- 24. E. A. Macondo (1, 2), F. Ba (3), N. C. Toure-Kane (1), O. Kaire (1), A. Gueye-Ndiaye (1), A. Gaye-Diallo (1), C. S. Boye (1) & S. Mboup (1):**
Amélioration du diagnostic de la tuberculose par le *Mycobacteria Growth Indicator tube (MGIT)* dans un laboratoire de pays en développement : Disponible sur : <http://www.pathexo.fr/documents/articles-bull/T93-22145.pdf> :

25. Makan Diallo : Etude sur les occasions manquées dans le cadre du dépistage de la tuberculose pulmonaire a frottis positif dans le district sanitaire de Kati. Thèse de médecine, 2010

DIALLO Makan. 2011 ;105.

26. Bini EI, Espinosa DM, Castillo BM, Payán JB, Colucci D, Cruz AF, et al. The Influence of Sex Steroid Hormones in the

Immunopathology of Experimental Pulmonary Tuberculosis. PLoS ONE [Internet]. 2014 [cité 23 avr 2020] ;9(4). Disponible sur :

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3983091/>

27. Tuberculose, genre et droits humains

core_tbhumanrightsgenderequality_technicalbrief_fr.pdf sur :

https://www.theglobalfund.org/media/6523/core_tbhumanrightsgenderequality_technicalbrief_fr.pdf ?

28. Vaccins BCG. FARES asbl. Disponible sur :

<http://www.fares.be/tuberculose/infos-pour-professionnels/vaccins-bcg>

29. OUATTARRA Gaoussou. Prévalence et caractéristiques des mycobactéries non tuberculeuses isolées chez les personnes vivant avec le

VIH/SIDA à Bamako, Mali. Présentée et soutenue publiquement le // 2015

Devant la Faculté de Pharmacie. :88.

30. Jean Paul Dembélé : Aspects épidémiologiques de la tuberculose pulmonaire a bacilloscopie positive au Mali pendant la décennie

19952004 : Disponible sur :

<http://www.keneya.net/fmpos/theses/2005/med/pdf/05M198.pdf>

31. Tékpa G, Fikouma V, Téngothi RMM, Longo J de D, Woyengba

APA, Koffi B. Aspects épidémiologiques et cliniques de la tuberculose

en milieu hospitalier à Bangui. Pan Afr Med J Disponible sur:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6658193/>

32. ANSARI ABDALLAH YEHIA : Aspects Epidémiologiques et cliniques de la co-infection VIH-Tuberculose dans le service de Maladies Infectieuses au CHU de Point G. Disponible sur :

<http://www.keneya.net/fmpos/theses/2015/med/pdf/15M170.pdf>

33. Agodokpessi G, Adé S, Wachinou P, Adé G, Gninafon M. Profil épidémiologique des tuberculeux admis au régime de retraitement à Cotonou au Bénin. 2014 ;4 :6.

34. Bibliographie_SIDA. Disponible sur :

http://www.ansci.org/portailalliance/pdf/Bibliographie_SIDA.pdf

35. OMS | Inégalités entre les sexes et VIH/sida. WHO. Disponible sur :

https://www.who.int/gender/hiv_aids/fr/

ANNEXES

ANNEXES

Fiche d'enquête

Questionnaire

1. Numéro du patient

.....

2. Initiale

.....

3. Date de visite

.....

4. Date de naissance

.....

5. Sexe

.....

6. Profession

.....

7. Ethnie

.....

8. Statut matrimonial

.....

9. Résidence

10. Centre qui a référé le malade

.....

Symptômes / Histoire Médicale

1. ORL

Oui Non

....

2. Pulmonaire/respiratoire

Oui Non

Evaluation Préliminaire de la PCR Multiplexe dans la Détection de *Mycobacterium tuberculosis* chez les patients tuberculeux en échec de traitement ou rechute à Bamako Mali

-
3. Cardiovasculaire Oui Non
-
4. Gastro/Hépatique Oui Non
-
5. Génito-urinaire/Rénale Oui Non
-
6. Dermatologique Oui Non
-
7. Musculaire Oui Non
-
8. Hémato/Lymphatique Oui Non
-
9. Endocrino/Métabolique Oui Non
-
10. Neurologique Oui Non
-
11. Psychologique Oui Non
-
12. Autre à préciser.....

Résultats du laboratoire

1. Ziehl Nielsen : 3+ 2+ 1+ Négatif Non fait
2. Auramine/Rhodamine : 3+ 2+ 1+ Négatif Non fait
3. Test Xpert MTB/RIF :

- MTB non détectée MTB détecté RIF/Résistant
....
- MTB détecté RIF/Sensible Non fait, Raison

Signes Vitaux

1. Poids ... Kg
2. Taille ... Cm
3. Température °C
4. Tension artérielle mmhg
5. Fréquence Cardiaque Batt/min
6. Fréquence respiratoire Cycle/min

Facteurs de risques

1. VIH Positif Négatif
- Tabac Oui Non
- Alcool Oui Non ...
- Traitement anti-TB antérieur
- Naïf/nouveau cas Oui Non
- Catégorie 1 : Oui Non
- Catégorie 2 : Oui Non
- Catégorie 3 : Oui Non Seconde
ligne : Oui Non

Examens physiques

1. ORL Oui Non
2. Pulmonaire/respiratoire Oui Non
3. Cardiovasculaire Oui Non
4. Gastro/Hépatique Oui Non
5. Génito-urinaire/Rénale Oui Non

Evaluation Préliminaire de la PCR Multiplexe dans la Détection de *Mycobacterium tuberculosis* chez les patients tuberculeux en échec de traitement ou rechute à Bamako Mali

- | | | |
|-----|------------------------|----------------------|
| 6. | Dermatologique | Oui Non 7. |
| | Musculaire | Oui Non |
| 8. | Hémato/Lymphatique | Oui Non |
| 9. | Endocrino/Métabolique | Oui Non |
| 10. | Neurologique | Oui Non |
| 11. | Psychologique | Oui Non |
| | Autre à préciser | |

FICHE SIGNALETIQUE

Nom : DANIOGO

Prénom : Djakaridja

Téléphone : 74-74-82-21

E-mail : ddaniogo01@yahoo.fr

Titre de la thèse : Evaluation préliminaire du Multiplexe RT-PCR dans la détection du *Mycobacterium Tuberculosis* chez les patients tuberculeux en échecs et ou rechute de traitement à Bamako, Mali.

Année : Universitaire 2019-2020

Pays : Mali

Ville de soutenance : Bamako

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la faculté de médecine et D'odontostomatologie (FMOS) de Bamako.

Secteur d'intérêt : Pneumologie, Bactériologie, infectiologie.

12. Résumé :

Le but de notre étude est de faire une évaluation préliminaire du multiplexe RT-PCR. Déterminer sa sensibilité, spécificité, les valeurs prédictives positives et négatives dans la détection du *mycobacterium tuberculosis* chez les patients en échecs et ou rechute de traitement à Bamako au Mali. Pour atteindre nos objectifs, nous avons réalisé une étude transversale. Décembre 2018 et Mars 2020 au Centre de Recherche et de la Formation sur le VIH et la Tuberculose (SEREFO).

L'étude a porté sur 105 patients dont 61 tuberculeux (microscopie et culture positive) et 44 contrôles (microscopie et culture négative) qui ont bénéficié des techniques suivantes : L'examen microscopique des frottis par le FDA et par l'auramine/rhodamine, le test XpertMTB/RIF de GeneXpert®, la culture et le Multiplexe.

La sensibilité et la spécificité ont été respectivement 75% et 69,77%, Les valeurs prédictives négatives et positives ont été 88,24% et 48%. Mots clé : Multiplexe RT-PCR, XpertMTB/RIF, TB-RR, Tuberculose, Bamako, Mali.

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette faculté, et de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de race, de parti ou de classe viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès la conception.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes condisciples si j'y manque.
Je le Jure !