

PREMIERS ISOLEMENTS DE MYCOBACTÉRIES TUBERCULEUSES CHEZ L'HOMME ET L'ANIMAL AU TCHAD

C. DIGUIMBAYE, E. SCHELLING, G.E. PFYFFER, F. BAGGI, R. NGANDOLO, G. NDOUTAMIA, M. TANNER, J. ZINSSTAG

Med Trop 2004; **64** : 482-485

RÉSUMÉ • Nous rapportons les premières souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* d'origine humaine et animale isolées au Tchad. Les souches provenant d'échantillons humains étaient exclusivement *M. tuberculosis* et les souches issues de prélèvements animaux (bovins) étaient *M. bovis*. Sur les 10 souches *M. tuberculosis* testées aux antibiotiques, aucune souche multi-résistante n'a été détectée. Vu la résistance intrinsèque à la pyrazinamide et le nombre croissant d'infections à la tuberculose dans des populations séropositives au VIH, plus d'informations sont nécessaires sur l'infection potentielle par *M. bovis* de l'homme, afin de pouvoir guider les programmes de lutte.

MOTS-CLÉS • Tchad - *Mycobacterium tuberculosis* - *Mycobacterium bovis* - spoligotyping

FIRST ISOLATION OF TUBERCULOUS MYCOBACTERIA IN MAN AND ANIMALS IN CHAD

ABSTRACT • This report describes the first successful isolation and identification of mycobacterial infection in humans and animals of Chad. All mycobacterial strains from human specimens were *M. tuberculosis* and strains from animal specimens (cattle) were *M. bovis*. None of the 10 of *M. tuberculosis* strains tested for antibiotic resistance were multidrug resistant. Due to the intrinsic resistance of *M. bovis* to pyrazinamide and the growing number of tuberculosis cases in HIV-infected people in Africa and elsewhere, more information on the potential of *M. bovis* for human infection is needed to guide disease control policy.

KEY WORDS • Chad - *Mycobacterium tuberculosis* - *Mycobacterium bovis* - Spoligotyping.

Le diagnostic de laboratoire de la tuberculose constitue un maillon indispensable dans le dispositif stratégique de la lutte antituberculeuse (1, 2). *M. tuberculosis* est l'agent causal le plus identifié dans les cas de tuberculose humaine (3), cependant l'implication des autres membres du complexe *M. tuberculosis* et en particulier *M. bovis* a été notifié de par le monde (4, 5).

En Afrique, la tuberculose bovine n'a jusqu'à présent pu être contrôlée, ainsi les tuberculoses humaines à *M. bovis* y seraient assez fréquentes. Le Tchad est un pays d'Afrique centrale avec une population d'environ 8 millions et un cheptel bovin estimé à 6 millions de têtes (6). Avec une aug-

mentation du nombre de cas notifiés de tuberculose de 60 à 120 cas/100 000 habitants en 1991 (Massenet *et Coll*) à 370 cas/100 000 en 2003 (7), le Tchad fait partie des pays à haute incidence de tuberculose.

Concernant la tuberculose bovine, les tests de tuberculination sur bovins ont permis de détecter des taux d'animaux sensibilisés variant de 2 à 17% selon les études (8, 9). Les zoonoses, maladies infectieuses transmissibles de l'animal à l'homme et vice versa, sont bien présentes au Tchad. La brucellose et la fièvre Q ont été détectées chez le bétail (8, 10, 11) ainsi que chez les humains (12, 11). Parmi les zoonoses, la tuberculose bovine reste la moins connue des éleveurs, de la plupart des consommateurs et du personnel de santé publique pour ce qui concerne sa transmissibilité à l'homme.

Avec la pandémie du Virus de l'Immunodéficience Humaine / Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise (VIH/SIDA), on observe une recrudescence de la tuberculose. En Afrique, dans des pays endémiques à *M. bovis*, on ne connaît pas sa contribution dans les cas de tuberculoses humaines (13) parce que le diagnostic humain repose le plus souvent sur la seule microscopie. Sachant que la tuberculose à *M. bovis* est cliniquement indissociable de celle à *M. tuberculosis*, la preuve d'une origine bovine de l'affection ne pourra se faire que par le biais d'une étude microbiologique de la maladie (14). C'est ainsi que dans le cadre d'un projet

• Travail du Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha (C.D., Microbiologiste ; R.N., Biologiste ; G.N., Biologiste moléculaire, PhD), N'Djaména, Tchad, du Département de la santé publique et d'épidémiologie (E.S., J.Z., Docteurs en médecine vétérinaire, PhD), Institut Tropical Suisse, 4002 Bâle, Suisse, du Department of Medical Microbiology (G.P., Professeur, Docteur), Hôpital cantonal, Lucerne, Suisse, et du Centre National des Mycobactéries, Institut de Microbiologie Médicale (F.B., Docteur), Zürich,

• Correspondance: C. DIGUIMBAYE, Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha, Boîte Postale 433, N'Djaména, Tchad • Fax : +235 52 83 02 •

• Courriel : zoonoses.farcha@intnet.td •

• Article reçu le 13/03/2003, définitivement accepté le 28/10/2004.

sur l'étude des zoonoses en milieu nomade au Tchad en collaboration avec l'Institut Tropical Suisse (ITS), un laboratoire de culture de mycobactéries a été mis en place. L'assistance technique dans la formation des agents en charge du fonctionnement du laboratoire a été assurée par le Centre National de Mycobactéries (CNM) de Zurich.

L'objectif de cette étude était en premier lieu de démontrer la capacité du laboratoire à isoler et identifier des mycobactéries sur place au Tchad et par la suite d'établir l'importance de *M. bovis* chez l'homme. Cet article donne les résultats des premières souches de mycobactéries tuberculeuses isolées au Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques (LRVZ) à Farcha, N'Djaména, à partir de prélèvements humains et animaux, collectés au Tchad respectivement dans des centres de santé et en abattoir.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériels

Le crachat et les urines ont été collectés au niveau des centres de santé dans le Chari-Baguirmi du 8 janvier au 21 février 2002 chez les individus suspectés de tuberculose. Les biopsies d'organes (poumons, rates, foies et nodules lymphatiques) ont été prélevées sur les carcasses d'animaux saisis pour cause de tuberculose au niveau de l'abattoir de N'Djaména 3 au 25 août 2001.

Méthodes

L'isolement des mycobactéries, ainsi que leur identification biochimique ont été effectués au Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha au Tchad. Les tests d'hybridation et le spoligotyping ont été réalisés au Centre National des Mycobactéries (CNM) de l'Université de Zurich en Suisse.

Isolement des souches de mycobactéries

Tous les échantillons collectés dans les centres de santé ainsi que les échantillons en provenance des abattoirs ont été décontaminés au N-Acétyle-L-Cystéine (0,5 % NALC) dans une solution à 2 % de NaOH avec la suspension de l'échantillon (15). Après la décontamination 250 µl sontensemencés sur deux milieux de Löwenstein-Jensen (LJ) en tube, dont l'un contient de la glycérine (0,075 %) et l'autre du pyruvate de sodium (0,06 %). Les tubes inoculés sont placés dans une étuve sèche à 37°C. L'observation des tubes s'effectue toutes les semaines. Dès l'apparition de colonies sur le milieu, celles-ci sont colorées selon la méthode de Ziehl-Neelsen (ZN) afin de s'assurer de la présence de bacilles acido-alcools résistants (BAAR). A partir des cultures BAAR positives, les colonies sont prélevées, remises en suspension dans du sérum physiologique puis ré-ensemencées sur trois tubes de culture LJ et sur du milieu gélosé, milieu de Middlebrook (7H10) en boîte de Petri.

Identification des souches de mycobactéries

Trois tests biochimiques ont été effectués pour chaque souche mycobactérienne isolée. Il s'agit de l'activité de la catalase à 68°C, la réduction de nitrate et de l'extraction de la niacine. Ces tests sont réalisés selon la procédure décrite dans le guide de laboratoire de niveau III (15). De plus, le test ACCUPROBE (GEN-PROBE® / http://www.gen-probe.com/prod_serv/mycobac_accuprobe.asp) est effectué conformément à la description du producteur. Ce test permet d'identifier les mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* à partir de la culture. La méthode ACCUPROBE utilise une sonde ADN monocaténaire conjuguée à un marqueur chimioluminescent complémentaire de l'ARN ribosomale (ARNr) de l'organisme cible. Lorsque l'ARNr de l'organisme cible est libéré, la sonde s'hybride avec celui-ci pour former un complexe ADN-ARN stable qui est détectable par un luminomètre. Finalement, la technique « spacer-oligotyping (spoligotyping) » permet d'identifier et de spécifier les souches de mycobactéries au sein du complexe tuberculeux (16).

Test de sensibilité des souches *M. tuberculosis* aux 5 anti-tuberculeux

Le test de sensibilité a été effectué au CNM par la méthode MGIT au moyen du BACTEC MGIT 960 (BD Biosciences, Sparks, Md., USA) pour 4 anti-tuberculeux : Isoniazide (INH)-0,1 µg/ml, Rifampine (RMP)-1,0 µg/ml, Ethambutol (EMB)-5,0 µg/ml et Pyrazinamide (PZA)-100 µg/ml. Pour la Streptomycine (SM)-10 µg/ml et -50 µg/ml la méthode des proportions sur milieu gélosé (Middlebrook 7H10) (21) a été utilisée.

RÉSULTATS

Echantillons humains

Les prélèvements collectés chez 40 patients étaient répartis comme suit selon les sites de collecte : 5 à la clinique privée (CP) de N'Djaména, 5 directement au Laboratoire de Farcha (LRVZ, N'Djaména) et 30 au laboratoire de l'Hôpital général de référence nationale du Tchad à N'Djaména (HGRNT). La suspicion de la tuberculose était basée sur une toux de plus de 15 jours pour la plupart des suspects. Les patients étaient originaires de différentes préfectures du pays.

Au total, 38 crachats et 31 urines ont été décontaminés et mis en culture. Les résultats obtenus après la mise en culture sont les suivants : pour les crachats, 3 cultures contaminées, 19 cultures BAAR positives, 16 cultures BAAR négative et 9 cultures, *M. tuberculosis* ; pour les urines, 2 cultures contaminées, 5 cultures BAAR positives, 24 cultures BAAR négatives et 1 culture de *M. tuberculosis* (Tableau I).

Tests de sensibilité aux antibiotiques

Sur les 10 souches de *M. tuberculosis*, aucune n'a été révélée résistante à la Rifampine ou la Streptomycine, alors que 2 souches étaient résistantes à l'Isoniazide et deux autres,

Tableau I - Données sur les dix premiers isolements de *M. tuberculosis*.

N° d'ordre	N° patient	Prélèvements effectués	Provenance des spécimens	Age (ans)	Sexe	Fonction	Id souche	Résultats Biochimie
1	256	Crachat-Urine	CP ^a	18	masculin	Elève	256CR	NPP ^b
2	262	Crachat-Urine	HGRNT ^c	30	masculin	Mécanicien	262UR	NPP
3	263	Crachat-Urine	HGRNT	42	masculin	Employé bureau	263CR	NPP
4	264	Crachat-Urine	HGRNT	21	masculin	Mécanicien	264CR	NPP
5	265	Crachat	HGRNT	60	masculin	NI ^d	265CR	NPP
6	278	Crachat- Urine	HGRNT	8	masculin	Elève	278CR	NPP
7	284	Crachat	HGRNT	25	masculin	NI	284CR	NPP
8	287	Crachat	HGRNT	36	masculin	Commerçant	287CR	NPP
9	290	Crachat- Urine	HGRNT	40	masculin	Commerçant	290CR	NPP
10	291	Crachat	HGRNT	66	masculin	cultivateur	291CR	NPP

^a CP- Clinique privée

^b NPP -catalase négative ; nitrate positif et niacine positif

^c HGRNT- Hôpital Général de Référence Nationale du Tchad

^d NI- non identifiée

à l'Ethambutol. La résistance à la Pyrazinamide a été détectée pour une seule souche, ainsi que celle à l'Ethambutol et l'Isoniazide simultanément. Quatre isolats de *M. tuberculosis* étaient sensibles à tous les anti-tuberculeux testés (Tableau II).

Echantillons bovins

Les prélèvements pour les dix premiers isolements de *M. bovis* (Tableau III) ont été effectués à partir de 33 carcasses (21 bovins de race peul, 11 bovins de race arabe et une chèvre) saisies pour cause de tuberculose à l'Abattoir Frigorifique de Farcha. Les nombres d'organes traités étaient les suivants : 21 poumons, 13 ganglions, 8 granulomes, 9 rates, 5 foies et un rein. Parmi tous les prélèvements six provenaient de saisies partielles et 27 de saisies totales.

Tests biochimiques

Les résultats des tests biochimiques sont présentés dans les Tableaux I et III. Le test ACCUPROBE confirmait le complexe *M. tuberculosis* pour toutes les souches. Les

Tableau II - Caractéristiques culturales et sensibilité aux anti-tuberculeux des souches *M. tuberculosis*.

Id souches	Morphologie des colonies	Milieu de croissance	Résultats antibiogramme				
			INH	RMP	EMB	PZA	SM
256CR	Eug ^a	G & P	S	S	S	S	S
262UR	Eug.	G	S	S	S	S	S
263CR	Eug	G & P	S	S	S	S	S
264CR	Eug.	G & P	S	S	R	S	S
265CR	Eug.	G & P	S	S	R	S	S
278CR	Dys.b	P	S	S	S	S	S
284CR	Dys	P	S	S	S	R	S
287CR	Eug	G & P	R	S	R	S	S
290CR	Eug.	G & P	R	S	S	S	S
291CR	Eug.	G	R	S	S	S	S

^a Colonie eugonique

^b Colonie dysgonique

G : milieu Löwenstein-Jensen avec glycérine ;

P : milieu Löwenstein-Jensen avec pyruvate de sodium

S : sensible

R : résistant

souches isolées chez l'homme répondent aux caractéristiques de *M. tuberculosis* qui est ainsi identifié pour la première fois par la culture au Tchad. Les souches isolées du bétail (bovin) sont catalase négative, nitrate réductase négative, Niacine négative, et manquent les espaceurs 40 - 43 (spoligotype). Il s'agit de la première identification de *M. bovis* sur le territoire tchadien.

DISCUSSION

Les résultats préliminaires obtenus, suite à l'étude microbiologique de la tuberculose au Tchad, démontrent la capacité du laboratoire mis en place à identifier les deux souches du complexe *M. tuberculosis* les plus fréquemment impliquées dans les cas de tuberculose humaine et animale. Cette étude de la tuberculose a permis pour la première fois de mettre en évidence *M. tuberculosis* et *M. bovis* par la culture et la caractérisation moléculaire au Tchad.

Durant cette étude certaines contraintes liées aux moyens limités du laboratoire comme l'absence de CO₂ qui a sans doute prolongé la durée de formation de colonies visibles et favorisé ainsi la prolifération de mycobactéries non

Tableau III - Données sur les dix premiers isolements de *M. bovis*.

N° d'ordre	N° échantillon	Organes prélevés	Saisie	Race du bovin	Id souche	Résultats Biochimie
1	86	Poumon-rate	Totale	Peule	86 PM	NNN ^a
2	90	Granulome	Totale	Peule	90TUB	NNN
3	94	Granulome-ganglion	Totale	Arabe	94GG	NNN
4	106	Poumon-ganglion	Totale	Arabe	106PM	NNN
5	111	Poumon-ganglion-rate	Totale	Peule	111GG	NNN
6	117	Poumon-rate-foie	Totale	Peule	117PM	NNN
7	120	Poumon-ganglion	Totale	Peule	120PM	NNN
8	215	Poumon	Partielle	Peule	215PM	NNN
9	216	Poumon-ganglion-rein	Totale	Arabe	216PM	NNN
10	220	Poumon	Totale	Arabe	220PM	NNN

^a Catalase négative, nitrate négatif et niacine négative

PM : Poumon

TUB : Granulome ou tubercule

GG :Ganglion

tuberculeuses et d'autres contaminations bactériennes et mycosiques. Par ailleurs, l'utilisation de la solution de décontamination NALC-NaOH a donné des résultats satisfaisants avec les spécimens des deux sources (humaine et animale) et l'adjonction du milieu liquide contenant l'antibiotique PANTA, aux deux milieux de Löwenstein-Jensen a permis d'augmenter le nombre d'isolements de mycobactéries.

Le test de sensibilité aux antibiotiques a révélé des souches résistantes à certains médicaments anti-tuberculeux. Malgré le nombre très limité de souches, il faut noter une absence totale de résistance à la Rifampine et à la Streptomycine et des souches multi-résistantes (Rifampine plus Isoniazide).

Dans cette étude, il n'y a pas eu d'isolement de *M. bovis* issu des prélèvements cliniques. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les individus échantillonnés n'appartenaient pas à des groupes à risque (éleveur ou employé d'abattoir). L'isolement de *M. bovis* chez le bétail, confirme les résultats de tuberculination effectuée sur des bovins dans les zones d'Abéché (8), dans le Chari-Baguirmi et le Kanem (9).

Les spoligotypes de *M. bovis* trouvés dans cette étude sont très proches de ceux décrits par Njanpop-Lafourcade *et Coll* (17) au Cameroun. L'acquisition de cet outil permettra désormais d'obtenir un diagnostic plus approfondi de la tuberculose tant humaine qu'animale. En santé humaine, le test de sensibilité aux anti-tuberculeux sera disponible dès la mise en place de la stratégie DOTS (Direct Observed Treatment Short course), qui est recommandée au plan international pour la lutte contre la tuberculose. Bien que jusque là nous ne l'ayons pas encore trouvé, nos recherches continueront sur l'éventuelle présence de *M. bovis* chez l'homme au Tchad, étant donné que des études effectuées dans les pays limitrophes comme le Nigeria (18) et le Soudan (19) ont eu à le démontrer. Pour cela des études conjointes de santé humaine et animale permettront d'établir un lien épidémiologique plus rapidement (11).

Des études d'épidémiologie moléculaire basées sur un échantillonnage représentatif sont prévues pour établir le taux d'homogénéité des souches et le taux de résistance aux antibiotiques. Mais l'ultime but est de promouvoir le dépistage (20) de la tuberculose et l'accès au traitement pour diminuer la transmission de la tuberculose.

Remerciements • Ces activités ont bénéficié d'un financement du Fonds National Suisse de Recherches Scientifiques et du pôle national de recherches « Nord-Sud », Projet individuel 4 (NCCR North-South, IP-4).

RÉFÉRENCES

- LIENHARDT C, OGDEN JA - Tuberculosis control in resource-poor countries: have we reached the limits of the universal paradigm? *Trop Med Int Health* 2004; **9** : 833-841.
- FRIEDEN TR, STERLING TR, MUNSIFF SS *et Coll* - Tuberculosis. *Lancet* 2003; **362** : 887-899.
- RAVIGLIONE MC, SNIDER DE, KOCHI A - Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* 1995; **273** : 220-226.
- DANKNER WM, DAVIS CE - *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States-Mexico border in the Baja California Region. *Pediatrics* 2000; **105** : 1-5.
- IDIGBE EO, ANYIWO CE, ONWUJEKWE DI - Human pulmonary infections with bovine and atypical mycobacteria in Lagos, Nigeria. *J Trop Med Hyg* 1986; **89** : 143-148.
- DIRECTION DE L'ELEVAGE ET DES RESSOURCES ANIMALES (DERA) - Rapport annuel d'activités. Ministère de l'Élevage, N'Djaména, Tchad 2000, 38 p.
- WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO) - Global tuberculosis control Report 2003 p. 134. http://www.who.int/gtb/Country_info/index.htm
- DELAFOSSÉ A, GOUTARD F, THEBAUD E - Épidémiologie de la tuberculose et de la brucellose des bovins en zone péri-urbaine d'Abéché, 2000, Tchad. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 2002; **55** : 5-13.
- SCHELLING E, DIGUIMBAYE C, DAOUD S *et Coll* - La tuberculose causée par *Mycobacterium bovis* : résultats préliminaires obtenus chez les pasteurs nomades Foulbés et Arabes dans le Chari-Baguirmi au Tchad. *Sermepvira* 2000; **8** : 44-55.
- DOMENECH J, CORBEL MJ, THOMAS EL, LUCET P - La brucellose bovine en Afrique centrale: VI. Identification et typage des souches isolées au Tchad et au Cameroun. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 1983; **36** : 19-25.
- SCHELLING E, DIGUIMBAYE C, DAOUD S *et Coll* - Brucellosis and Q-fever seroprevalences of nomadic pastoralists and their livestock in Chad. *Prev Vet Med* 2003; **61** : 279-293.
- MASSENET D, DJIME O, KARIFENE R - Enquête séro-épidémiologique sur la brucellose. *Med Trop* 1993; **53** : 253-255.
- DABORN CJ - Bovine Tuberculosis in the Tropics - a call to arms. Proceedings of the VII. International Conference of the Institutions of Tropical Veterinary Medicine, Yamoussoukro, Côte d'Ivoire. 1992 1: 359-368.
- COSIVI O, GRANGE JM, DABORN CJ *et Coll* - Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Inf Dis* 1998; **4** : 59-70.
- KENT PT, KUBICA GP - Public Health Mycobacteriology: A guide for the Level III laboratory. Atlanta, Centres for Disease Control, US Department of Health and Human Services, 1985.
- KAMERBEEK J, SCHOOLS L, KOLK A *et Coll* - Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; **35** : 907-914.
- NJANPOP-LAFOURCADE BM, INWALD J, OSTYN A *et Coll* - Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Cameroon. *J Clin Microbiol* 2001; **39** : 222-227.
- CADMUS SIB, THOMAS JO, OLUWASOLA OA - Isolation of *Mycobacterium bovis* in human-TB patients suffering from cervical lymphadenopathy in Ibadan, Nigeria. Abstract book of the 4th International Conference on Emerging Zoonoses. Ames, Iowa, USA, September 18-21, 2003 p. 84.
- SHARAF-ELDIN GS, SAEED NS, HAMID ME *et Coll* - Molecular analysis of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* collected from patients with persistent disease in the Khartoum region of Sudan. *J Infect* 2002; **44** : 244-251.
- TOSI CH, NGANGRO MN, DJIMADOUM N, RICHARD V - Etude de la seroprévalence du VIH chez des patients ayant une tuberculose pulmonaire en 2002 au Tchad. *Med Trop* 1999; **62** : 627-633.
- WAYNE LG, KRASNOW I - Preparation of tuberculosis susceptibility testing by means of impregnated disks. *Am J Clin Pathol* 1966; **45** : 769-771.