

SOUS LA DIRECTION DE:  
FRANÇOISE PORTAELS,  
PAUL JOHNSON &  
WAYNE M. MEYERS

# Ulcère de Buruli



Diagnostic  
de l'infection à  
*Mycobacterium  
ulcerans*

MANUEL DESTINE AU PERSONNEL DE SANTE



Organisation mondiale de la Santé

## La publication du présent manuel a été rendue possible grâce au soutien financier de :



Raoul Follereau

L'Association Française Raoul Follereau (AFRF), une ONG française qui s'est vouée à la lutte contre la lèpre dans 31 pays. Elle soutient également six projets de recherche sur la lèpre, dont le séquençage du génome de *Mycobacterium leprae*. Bien avant la première conférence internationale sur la recherche et la lutte contre l'ulcère de Buruli, organisée à Yamoussoukro (Côte d'Ivoire) en 1998, l'AFRF avait commencé à s'intéresser à ce nouveau problème que constituaient les difficultés sociales et sanitaires posées par l'ulcère de Buruli, notamment au Bénin et en Côte d'Ivoire depuis 1996. L'Association apporte également une aide financière aux travaux sur le séquençage du génome de *Mycobacterium ulcerans* et sur le traitement médicamenteux de la maladie. Elle envisage désormais de soutenir d'autres pays, à commencer par le Ghana. L'AFRF s'est engagée dans la mobilisation de l'appui international nécessaire pour relever le défi que représente l'ulcère de Buruli.

Pour plus d'informations, consulter le site Web de l'AFRF : <http://www.raoul-follereau.org>



L'ANESVAD, une ONG espagnole qui, depuis plus d'une trentaine d'années, a travaillé sur la lèpre et mis en œuvre des projets sanitaires, sociaux et éducatifs dans 28 des pays en développement les plus pauvres. Elle reçoit actuellement le soutien de plus de 135 000 partenaires et collaborateurs en Espagne. Elle a commencé récemment à travailler sur l'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire, avec des programmes pour le dépistage précoce de la maladie, la prévention, le traitement chirurgical, la formation de personnel médical spécialisé et des campagnes de mobilisation sociale, le tout visant à limiter les répercussions de cette maladie.

Pour plus d'informations, consulter le site Web de l'ANESVAD : <http://www.anesvad.org>



Médecins Sans Frontières (MSF), une organisation internationale d'aide humanitaire qui apporte aux populations en danger une assistance médicale d'urgence dans plus de 80 pays. MSF Luxembourg s'est engagée depuis 1997 dans la lutte contre l'ulcère de Buruli au Bénin et a modernisé le Centre de Santé de Lalo en le dotant d'installations de chirurgie et de laboratoire pour améliorer les soins des malades. En dehors de la chirurgie, les autres domaines d'action essentiels sont l'éducation sanitaire dans les collectivités touchées, le dépistage des cas et la formation des agents de soins, des enseignants et des tradipraticiens. Pour ce qui est de la recherche, MSF collabore avec l'Institut de Médecine tropicale d'Anvers (Belgique).

Pour plus d'informations, consulter le site Web de MSF Luxembourg : <http://www.msf.lu>



La Fondation nipponne, une fondation privée japonaise de subventions qui s'intéresse au bien-être social, à la santé publique, à l'aide bénévole et à l'assistance outre-mer. Depuis 1975, elle a aidé l'OMS, par l'intermédiaire de la Fondation commémorative Sasakawa pour la Santé, à lutter pour éliminer la lèpre. A partir de 1998, la Fondation nipponne a également commencé à donner un appui financier à l'Initiative mondiale de l'OMS contre l'ulcère de Buruli. Ces deux institutions, ainsi que plusieurs instituts d'enseignement, examinent actuellement les possibilités d'améliorer la prise en charge chirurgicale de la maladie. Enfin, elle collabore avec l'AFRF et d'autres partenaires pour trouver un traitement médicamenteux.

Pour plus d'informations, consulter le site Web de la Fondation nipponne : <http://www.nippon-foundation.or.jp>

# Ulcère de Buruli

MANUEL DESTINÉ  
AU PERSONNEL DE SANTÉ

SOUS LA DIRECTION DE :

**PROFESSEUR FRANÇOISE PORTAELS**  
Département de Microbiologie  
Institut de Médecine tropicale  
Anvers, Belgique

**PROFESSEUR PAUL JOHNSON**  
Département des Maladies infectieuses  
Austin and Repatriation Medical Centre  
Heidelberg, Melbourne, Australie

**DOCTEUR WAYNE M. MEYERS**  
Division de Microbiologie  
Institut de pathologie des Forces armées  
Washington, DC, Etats-Unis d'Amérique

Diagnostique  
de l'infection à  
*Mycobacterium*  
*ulcerans*



Organisation mondiale de la Santé

# Remerciements

Nous aimerions remercier ici pour leur aide Rosemary Bell, France, et John Hayman, Monash University, Australie.

© **Organisation mondiale de la Santé, 2001**

Ce document n'est pas une publication officielle de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), et tous les droits sont réservés par l'Organisation. Il peut être néanmoins commenté, résumé, reproduit ou traduit sans restriction, en partie ou en totalité, mais pas pour la vente ni à des fins commerciales. Les opinions exprimées dans les documents par des auteurs cités nommément n'engagent que lesdits auteurs.

Maquette: Gilles Lasseigne – Réalisation: Bruno Duret

# Sommaire

Préface .....	1
Illustrations .....	2
Introduction .....	3
<b>Chapter 1.</b> Diagnostic clinique .....	7
<b>Chapter 2.</b> Sécurité biologique et tenue des registres au laboratoire .....	15
<b>Chapter 3.</b> Recueil et transport des échantillons cliniques .....	19
<b>Chapter 4.</b> Surinfections bactériennes .....	23
<b>Chapter 5.</b> Méthodes en microbiologie .....	27
<b>Chapter 6.</b> Méthodes en histopathologie .....	37
<b>Annex 1.</b> Diagramme applicable au diagnostic de l'infection à <i>M. ulcerans</i> au laboratoire .....	48
<b>Annex 2.</b> Demande d'examens de laboratoire .....	49
<b>Annex 3.</b> Rapport d'analyses du laboratoire .....	51
<b>Annex 4.</b> Préparation des milieux de culture .....	52
<b>Annex 5.</b> Techniques de coloration en microbiologie .....	54
<b>Annex 6.</b> Techniques de coloration en histopathologie .....	59
<b>Annex 7.</b> Méthodes de décontamination .....	68
<b>Annex 8.</b> Culture de <i>M. ulcerans</i> en BACTEC 460 TB .....	71
<b>Annex 9.</b> Biochimie et culture utilisées pour l'identification des mycobactéries à croissance lente .....	72
<b>Annex 10.</b> Protocole de l'amplification génique (PCR) .....	78
<b>Annex 11.</b> Adresse des fabricants .....	84
<b>Annex 12.</b> Travail de l'OMS dans le domaine de l'ulcère de Buruli .....	85
<b>Annex 13.</b> Quelques instituts de recherche engagés dans des travaux sur l'ulcère de Buruli .....	87

<b>Annex 14.</b> Quelques organisations nongouvernementales et autres engagées dans la lutte contre l'ulcère de Buruli .....	88
<b>Annex 15.</b> Membres du Groupe consultatif de l'OMS sur l'ulcère de Buruli .....	89
<b>Annex 16.</b> Bibliographie conseillée .....	90
<b>Table 1</b> Diagnostics différentiels de l'ulcère de Buruli sous ses différentes formes	
<b>Table 2</b> Désinfectants recommandés pour les laboratoires travaillant sur <i>M. ulcerans</i>	
<b>Table 3</b> Recueil des échantillons et méthodes de laboratoire à chaque niveau de soins	
<b>Table 4</b> Caractéristiques phénotypiques de <i>M. ulcerans</i> et des espèces apparentées	
<b>Table 5</b> Caractéristiques des différents sous-groupes géographiques de <i>M. ulcerans</i>	
<b>Table 6</b> Sensibilité <i>in vitro</i> de <i>M. ulcerans</i> aux antimycobactériens	
<b>Table 7</b> Préparation des agents d'inhibition	
<b>Table 8</b> Activité de l'uréase	

## Co-auteurs

**Prof. Ohene Adjei**, Département de Microbiologie, Ecole des Sciences médicales, Université des Sciences et de la Technologie, Kumasi (Ghana) / **Prof. Bernard Carbonnelle**, Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers (France) / **Prof. Patience Mensah**, Unité de Bactériologie, Institut Noguchi pour la recherche médicale, Université du Ghana, Accra (Ghana) / **Prof. Paul Johnson**, Département des Maladies infectieuses, Austin and Repatriation Medical Centre, Heidelberg, Melbourne (Australie) / **Professeur (associé) Henri Kouakou**, Institut Raoul Follereau, Adzope, Côte d'Ivoire / **Dr Wayne M. Meyers**, Division de Microbiologie, Institut de Pathologie des Forces armées, Washington DC (Etats-Unis d'Amérique) / **Prof. Françoise Portaels**, Département de Microbiologie, Institut de Médecine tropicale, Anvers (Belgique) / **Dr Kingsley Asiedu**, Maladies transmissibles : prévention, lutte et éradication, Organisation mondiale de la Santé, Genève (Suisse)

# Préface

Le présent manuel a pour objectif d'aider les prestataires de soins et les scientifiques travaillant dans les laboratoires à diagnostiquer l'infection à *Mycobacterium ulcerans* (l'ulcère de Buruli). Il veut favoriser la compréhension des présentations cliniques et du diagnostic de cette affection. Les méthodes décrites sont mises au point pour les différents niveaux des soins et les ressources disponibles afin d'améliorer le diagnostic et la surveillance de cette maladie.

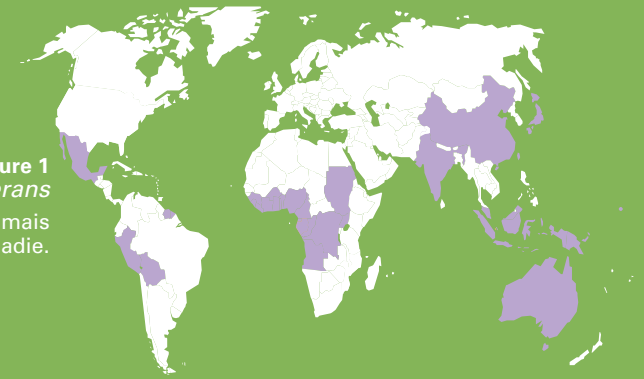
**Nota bene:** Le présent ouvrage n'a pas pour but de fixer des normes en matière de méthodes de laboratoire et il ne remplace pas les manuels décrivant le travail au laboratoire. Le fait de suivre les conseils donnés ne garantit pas le succès dans chaque cas. Il ne faut pas considérer non plus qu'il renferme toutes les méthodes de laboratoire qui conviennent ni qu'il en exclut d'autres tendant aux mêmes résultats. Il revient au personnel soignant ou à celui des laboratoires de juger en ultime ressort de la méthode particulière à mettre en œuvre, en fonction du tableau clinique et des possibilités de diagnostic.

# Illustrations

- Fig. 1 Carte du monde montrant la répartition de l'ulcère de Buruli (OMS)
- Fig. 2 Papule (John Hayman)
- Fig. 3 Nodule (Mark Evans)
- Fig. 4 Plaque (Mark Evans)
- Fig. 5 Forme œdémateuse (May Smith et Kingsley Asiedu)
- Fig. 6 Ulcère (May Smith et Mark Evans)
- Fig. 7 Ostéomyélite (Giovanni Batista Priuli)
- Fig. 8 Rétractions (Marcel Crozet)
- Fig. 9 Cicatrice hypertrophique (Pius Agbenorku)
- Fig. 10 Carcinome spinocellulaire à la suite de l'ulcère de Buruli (Mark Evans)
- Fig. 11 Diagnostic différentiel (Wayne Meyers)
- Fig. 12 Récipients pour échantillons (Paul Johnson)
- Fig. 13 Technique d'écouvillonnage (May Smith)
- Fig. 14 Inoculation dans la queue d'une souris (Bernard Carbonnelle)
- Fig. 15 Caractéristiques des souches africaine et australienne de *M. ulcerans* en culture (Françoise Portaels)
- Fig. 16 Résultats de l'amplification génique (Paul Johnson)
- Fig. 17 Coupe d'un nodule excisé chirurgicalement (John Hayman)
- Fig. 18 Coupe microscopique du nodule (AFIP)
- Fig. 19 Tissu cutané et sous-cutané provenant du centre d'une lésion non ulcéreuse (autorisation AFIP, Wayne Meyers)
- Fig. 20 Base nécrosée d'un ulcère de Buruli (autorisation AFIP, Wayne Meyers)
- Fig. 21 Vasculite sévère dans une lésion du tissu sous-cutané (John Hayman)
- Fig. 22 Adipocytes fantômes et vasculite (autorisation AFIP, Wayne Meyers)
- Fig. 23 Coloration de Ziehl-Neelsen d'une coupe parallèle à celle de la figure 18 (autorisation AFIP, Wayne Meyers)
- Fig. 24 Tissu sous-cutané prélevé sur le bord d'un ulcère de Buruli (autorisation AFIP, Wayne Meyers)
- Fig. 25 Amas de BAAR à la base d'un ulcère de Buruli (autorisation AFIP, Wayne Meyers)
- Fig. 26 Echantillon de biopsie prélevé sur le bord d'un ulcère de Buruli (autorisation AFIP, Wayne Meyers)
- Fig. 27 Tissu sous-cutané provenant de la marge d'un ulcère de Buruli (autorisation AFIP, Wayne Meyers)
- Fig. 28 Ulcère de Buruli à un stade précoce de la guérison en phase d'organisation (autorisation AFIP, Wayne Meyers)
- Fig. 29 Granulome provoqué par l'hypersensibilité retardée dans un ulcère de Buruli en voie de guérison (AFIP)
- Fig. 30 Ulcère de Buruli à un stade avancé de la guérison (autorisation AFIP, Wayne Meyers)
- Fig. 31 Adénopathie dans un ulcère de Buruli (autorisation AFIP, Wayne Meyers)
- Fig. 32 Adénite nécrosée d'un ganglion lymphatique proximal (autorisation AFIP, Wayne Meyers)
- Fig. 33 Radiographie d'une jambe montrant la destruction de l'os (Giovanni Battista Priuli)
- Fig. 34 Ostéomyélite du tibia avec nécrose de la moelle osseuse (autorisation AFIP, Wayne Meyers)
- Fig. 35 Ostéomyélite du tibia avec des amas de BAAR dans la moelle nécrosée (autorisation AFIP, Wayne Meyers)
- Fig. 36 Ostéomyélite du tibia avec nécrose de la moelle osseuse (autorisation AFIP, Wayne Meyers)
- Fig. 37 Coloration Ziehl-Neelsen d'un frottis d'ulcère de Buruli (Françoise Portaels)
- Fig. 38 BAAR dans un frottis coloré au fluorochrome (autorisation Wellcome Trust et AM Emmerson)
- Fig. 39 Coupe de tissu avec panniculite colorée selon la méthode de Harris à l'hématoxiline-éosine et provenant d'un cas d'ulcère de Buruli (autorisation AFIP, Wayne Meyers)
- Fig. 40 BAAR dans une coupe de ganglion lymphatique coloré selon la méthode de Ziehl-Neelsen et provenant d'un cas d'ulcère de Buruli (autorisation AFIP, Wayne Meyers)
- Fig. 41 Coupe histologique d'une phaeosporotrichose, imprégnée à la méthénamine argentique selon la méthode de Grocott (autorisation AFIP, Wayne Meyers)
- Fig. 42 Coloration de Gram d'un tissu infecté par *Rhodococcus* sp. (autorisation AFIP, Wayne Meyers)
- Fig. 43 Caractéristiques scotochromogènes, photochromogènes et non chromogènes des mycobactéries (Françoise Portaels)
- Fig. 44 Evidence de l'activité de la catalase (Françoise Portaels)



**Figure 1**  
Répartition mondiale de l'infection à *Mycobacterium ulcerans*  
N.B. Les zones ombrées n'indiquent pas l'étendue du problème, mais  
seulement les pays où l'on notifie ou soupçonne la présence de cette maladie.



# Introduction

En 1998, face à la propagation et aux répercussions croissantes de l'ulcère de Buruli, l'infection à *Mycobacterium ulcerans*, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a mis en place l'Initiative mondiale contre l'ulcère de Buruli (GBUI). Cette maladie existe ou a été suspectée dans au moins 31 pays (voir Fig. 1). GBUI a pour principaux objectifs : de sensibiliser à cette maladie, de mobiliser l'aide en faveur des pays touchés, de promouvoir et de coordonner les travaux de recherche, de coordonner le travail des organisations non gouvernementales (ONG) et d'autres partenaires. L'Annexe 5 donne un résumé des réalisations de GBUI.

En 1897, Sir Albert Cook a décrit en Ouganda des ulcères cutanés correspondant à l'ulcère de Buruli, mais il n'a pas publié ses constatations dans la littérature médicale. En 1948, MacCallum et al. ont publié les premiers cas confirmés. Ces patients se trouvaient en Australie où la maladie a reçu le nom d'ulcère de Bairnsdale, d'après la principale ville de la région d'endémie d'origine. En Australie du Sud-Est, on continue d'utiliser couramment cette appellation mais, en Afrique, on nomme cette maladie « ulcère de Buruli », du nom du district ougandais où l'on a notifié un grand nombre de cas dans les années 50.

**Le nom « ulcère de Buruli » vient de celui du district ougandais où l'on a notifié un grand nombre de cas dans les années 50.**

## Epidémiologie et transmission

L'ulcère de Buruli est l'infection mycobactérienne la plus courante chez l'homme après la tuberculose et la lèpre. *Mycobacterium ulcerans* en est l'agent étiologique. La maladie survient souvent chez ceux qui vivent près de rivières ou de nappes d'eau stagnante. Les modifications de l'environnement, comme la construction de systèmes d'irrigation ou de digues, semblent avoir joué un rôle dans la résurgence de cette pathologie.

On ne connaît pas le mode de transmission, mais certains éléments récents donnent à penser que des insectes aquatiques (espèces des genres *Naucoris* et *Dyplonychus*) pourraient jouer un rôle. Il semble que les traumatismes sur des sites cutanés contaminés seraient le moyen par lequel l'agent causal pénètre dans l'organisme. Il y a peu de faits qui permettraient d'évoquer une contagion interhumaine. Aucun groupe social ou racial n'est à l'abri. L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ne constitue pas un facteur de risque connu.

La maladie est plus grave dans les populations déshéritées des zones rurales reculées. Dans plus de 70% des cas, la maladie touche des enfants de moins de 15 ans. La mortalité est faible mais la morbidité élevée. On trouve dans les complications les déformations par contracture, les amputations de membres et des atteintes oculaire, thoracique ou génitale. Dans certaines localités, 20 à 25% des malades restent après leur guérison avec des incapacités qui auront des conséquences sociales et économiques sur le long terme. Actuellement, le poids social et économique de l'ulcère de Buruli est énorme et, au Ghana, on estime que le coût moyen du traitement par patient s'élève à US\$ 780.

On ne connaît pas précisément la prévalence de la maladie. La Côte d'Ivoire a enregistré plus de 15 000 cas entre 1978 et 1999. Dans certaines communautés de ce pays, les taux de

prévalence ont été estimés à 16% et l'on atteint même 22% dans une communauté du Ghana. Le Bénin a enregistré quant à lui près de 4 000 cas entre 1989 et 1999. Une enquête menée au Ghana en 1999 a trouvé plus de 6 000 cas et a montré pour la première fois la présence de la maladie dans toutes les 10 régions du pays. On a également notifié des cas au Burkina Faso, au Togo, en Guinée et dans d'autres pays d'Afrique de l'Ouest.

On a signalé quelques cas en dehors des régions d'endémie, en Amérique et en Europe, à la suite de voyages internationaux. La méconnaissance de l'ulcère de Buruli a souvent entraîné de gros retards dans le diagnostic et le traitement de ces cas.

## L'agent étiologique

*Mycobacterium ulcerans* est une mycobactérie de l'environnement à croissance lente. Ce germe acido-alcool-résistant se cultive sur les milieux courants utilisés en mycobactériologie : Löwenstein-Jensen (L-J) par exemple.

La croissance est optimale à température modérée (30–32 °C), à une pression d'oxygène inférieure à celle de l'atmosphère ( $pO_2 < 2,5$  kPa) et à des valeurs de pH comprises entre 5,4 et 7,4. Les cultures demandent une incubation d'au moins 6 à 8 semaines dans de bonnes conditions pour devenir positives.

## La toxine

On connaît depuis quelque temps une toxine responsable de la nécrose tissulaire. On a identifié récemment ce composé, un polykétide dérivé des macrolides appelé mycolactone, et déterminé sa structure chimique. Cette toxine a des propriétés à la fois cytotoxiques et immunosuppressives. L'injection de la toxine purifiée sur l'animal de laboratoire entraîne des modifications du tissu adipeux sous-cutané semblables à celles observées avec la maladie. C'est le premier macrolide connu produit par un agent pathogène pour l'homme et le seul identifié dans le genre *Mycobacterium*.

## Pathogénie

Une fois qu'il est parvenu dans le tissu sous-cutané, le micro-organisme prolifère et synthétise la toxine qui s'attaque aux adipocytes. La nécrose qui en résulte crée un milieu stimulant la prolifération de l'agent causal. Au cours de cette phase, la réaction immunitaire à médiation cellulaire est très faible, voire inexistante, et l'intradermo-réaction à la buruline est négative. Un mécanisme encore inconnu finit par se mettre en œuvre et soit neutraliser la toxine, soit faire cesser la prolifération du micro-organisme ou la production de toxine. Il semblerait que la guérison commence avec le développement par l'hôte de l'immunité à médiation cellulaire, moment à partir duquel l'intradermo-réaction peut devenir positive. Les cellules inflammatoires détruisent alors l'agent étiologique (*Mycobacterium ulcerans*) et la maladie disparaît en laissant des cicatrices. Les os sont atteints soit par propagation directe à partir de la lésion, soit à la suite du passage de l'agent causal dans le sang. Contrairement à d'autres mycobactéries pathogènes, qui sont des parasites intracellulaires facultatifs des macrophages, *M. ulcerans* produit principalement des microcolonies extracellulaires.

## Spectre clinique

Sur le plan clinique, la maladie se manifeste sous la forme de papule, nodule, plaque, œdème ou ulcère. Elle est évolutive (infection en cours) ou inactive (antécédents d'infection avec une cicatrice caractéristique affaissée en étoile, avec ou sans séquelles). Le nouveau cas se définit comme un patient n'ayant pas d'antécédents d'ulcère de Buruli et n'ayant jamais été traité pour cette maladie. La récurrence se définit comme un patient se présentant dans l'année qui suit avec une nouvelle lésion, localisée au même endroit ou ailleurs. Les taux de rechute varient de 16%, pour les patients qui se sont présentés rapidement, à 28% pour ceux qui ont consulté tardivement.

Les rechutes sur le même site pourraient être dues à l'insuffisance de l'excision pratiquée. Les rechutes à un autre endroit pourraient s'expliquer par une propagation hématogène ou lymphatique.

## Diagnostic

**Clinique :** En région d'endémie connue, une personne expérimentée peut poser le diagnostic sur des bases cliniques. Les caractéristiques clinico-épidémiologiques révélatrices sont les suivantes :

- 1) le patient réside ou s'est rendu dans une région d'endémie connue ;
- 2) la plupart des patients ont moins de 15 ans ;
- 3) environ 85% des lésions se situent sur les membres ;
- 4) les lésions sur les membres inférieurs sont deux fois plus courantes que celles sur les membres supérieurs.

**Au laboratoire :** Deux des quatre éléments suivants, quels qu'ils soient, suffisent à confirmer formellement le diagnostic :

- 1) présence de bacilles acido-alcoolrésistants dans un frottis coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen (ZN) ;
- 2) culture positive de *M. ulcerans* (qui nécessite cependant au moins 6 à 8 semaines) ;
- 3) étude histopathologique d'un échantillon de biopsie prélevée sur une lésion (résultats disponibles rapidement) ;
- 4) recherche positive de l'ADN de *M. ulcerans* par PCR (amplification génique).

## Traitement

**Traitement médicamenteux :** Plusieurs principes actifs antimycobactériens ont fait la preuve *in vitro* de leur activité contre l'agent causal mais cette action n'a pas pu être régulièrement confirmée pour le traitement de la maladie. Les essais ont porté sur la rifampicine, la rifabutine, la clarithromycine, l'azithromycine, la streptomycine et l'amikacine.

On a également utilisé ces principes actifs en association, avec une réussite variable. Le traitement médicamenteux seul, même en faisant appel à une association de principes actifs, n'est en général pas efficace lorsqu'une lésion évolutive s'est formée. La recherche dans ce domaine est une priorité.

**Traitement chirurgical :** C'est actuellement le traitement définitif reconnu. Il se heurte pourtant à certains facteurs limitatifs :

- 1) l'insuffisance des installations chirurgicales ;
- 2) la nécessité d'une hospitalisation prolongée ;
- 3) le coût élevé du traitement ;
- 4) les rechutes (fréquence de 16 à 28 %)
- 5) le risque de transmission d'infections, comme le VIH par exemple.

La chaleur et l'oxygène hyperbare peuvent être des adjuvants au traitement, mais leur efficacité n'a pas encore été définitivement prouvée et ils s'avèrent parfois difficiles à mettre en œuvre dans les pays en développement

## Lutte et prévention

L'insuffisance des connaissances sur les sources de contamination et les modalités de la transmission limitent les stratégies de lutte au niveau local. Le traitement standard est chirurgical. Les spécialistes estiment que les interventions chirurgicales précoces permettent d'améliorer les résultats et de diminuer les séquelles, ce qui entraîne des économies. Ce sont les programmes de surveillance efficaces dans les

villages qui favorisent le mieux la précocité des traitements mais les attitudes et les croyances actuelles, qui stigmatisent les individus touchés et les effraient, représentent un obstacle. L'information devrait contribuer à dissiper ces conceptions erronées et insister sur le dépistage et la chirurgie précoce. Les interventions mineures (comme l'ablation des nodules), peuvent même être réalisées au niveau local.

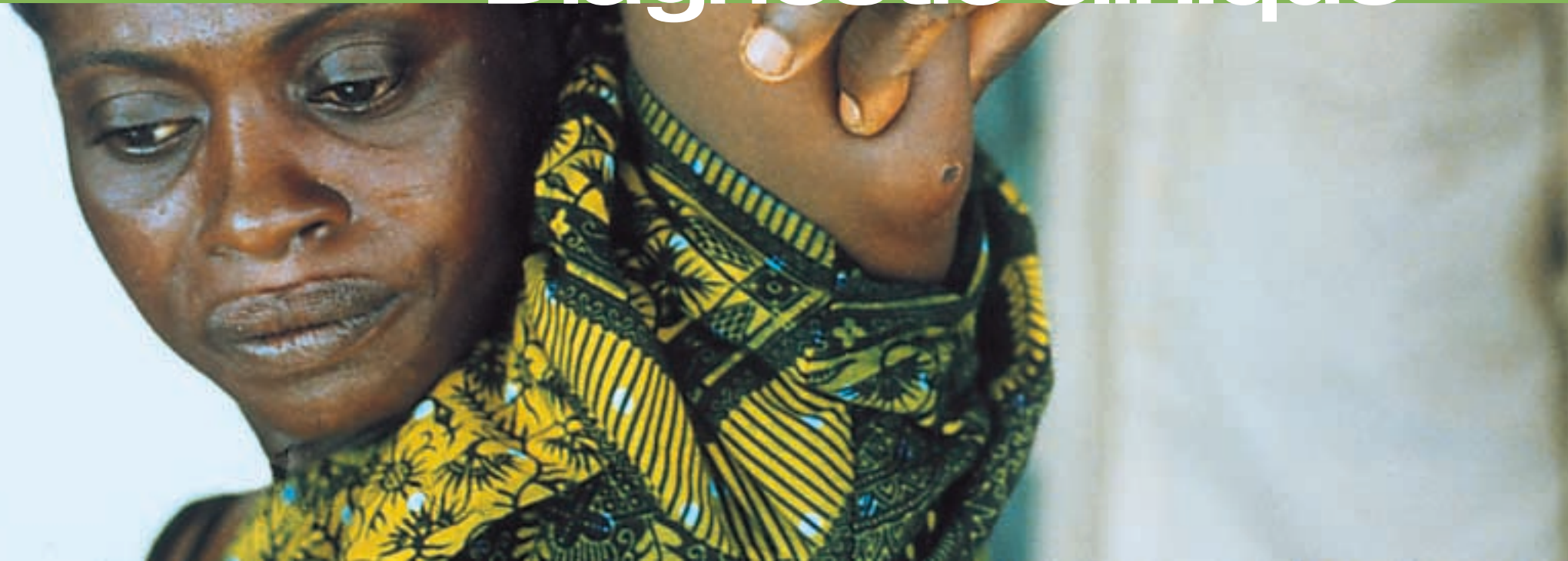
**Que faire — L'Initiative mondiale contre l'ulcère de Buruli a adopté une stratégie de lutte comportant :**

- éducation sanitaire et formation du personnel dans les communautés les plus touchées ;
- renforcement des capacités de soins dans les régions d'endémie en modernisant les installations chirurgicales, en veillant à la fourniture du matériel médical et en améliorant les laboratoires ;
- formation chirurgicale permettant à d'autres agents de santé (comme les infirmières ou les aides médicales) de pratiquer efficacement des interventions mineures ;
- surveillance à assise communautaire pour améliorer le dépistage précoce et l'orientation rapide des malades vers les centres de traitement, en collaboration avec d'autres programmes de lutte, par exemple contre la lèpre ou la dracunculose ;
- adoption de matériels éducatifs adaptés aux besoins des pays ;
- élaboration des stratégies de motivation ;
- réadaptation de ceux qui ont déjà des déformations du fait de cette maladie.

## Points essentiels

- 1) Les enfants de moins de 15 ans représentent environ 70% des cas d'ulcère de Buruli.
- 2) Au Ghana, le coût moyen du traitement par patient s'élève à US\$ 780.
- 3) Actuellement, la chirurgie est le traitement reconnu en général pour cette maladie.

# Diagnostic clinique



*Crédit : WHO*

Formes non ulcératives | Formes ulcératives | Atteinte osseuse | Complications et séquelles | Diagnostic différentiel

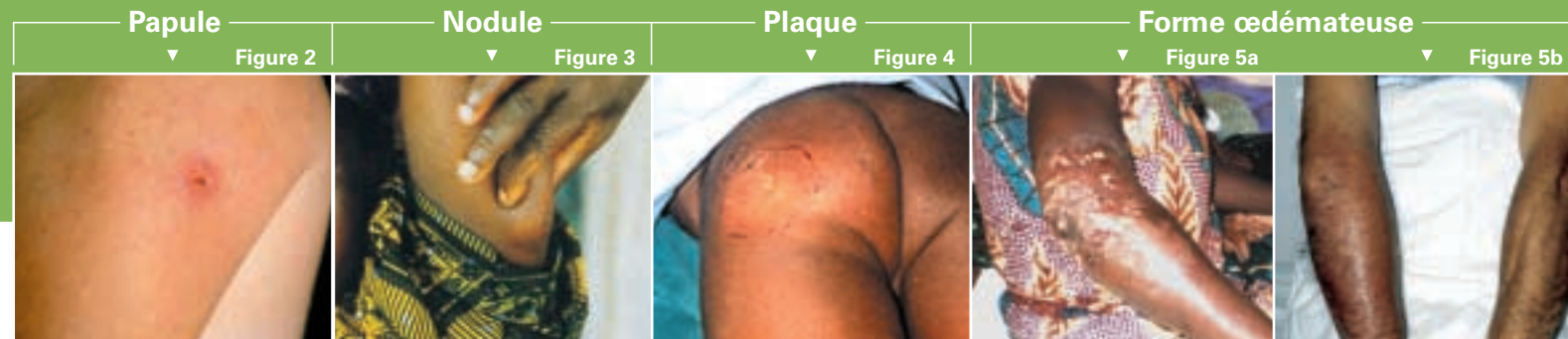
## Chapitre 1

# Diagnostic clinique

**Objectif** Vous aider à reconnaître les différentes formes de l'infection à *Mycobacterium ulcerans* et à poser le diagnostic, quel que soit le stade auquel le patient se présente.

## CE QUE VOUS DEVEZ SAVOIR

Il faut toujours envisager l'infection à *Mycobacterium ulcerans* pour les patients vivant en zone d'endémie. Cette maladie se présente fondamentalement sous deux formes : non ulcératrice et ulcératrice. **Les formes non ulcératrices sont :**



## 1 Formes non ulcératrices

- **Papule** : lésion cutanée surélevée, indolore, de moins d'1 centimètre de diamètre. On observe une rougeur de la peau avoisinante (Fig. 2). C'est une forme courante en Australie.
- **Nodule** : lésion s'étendant de la peau au tissu sous-cutané, d'un diamètre compris entre 1 et 2 cm. En général indolore, il peut s'accompagner d'un prurit et d'une dépigmentation de la peau avoisinante, par rapport aux zones adjacentes (Fig. 3). C'est une forme courante en Afrique.
- **Plaque** : lésion ferme, indolore, bien démarquée, surélevée, de plus de 2 cm de diamètre et à bords irréguliers. Au-dessus de la lésion, la peau est souvent rouge ou dépigmentée (Fig. 4).
- **Œdème** : tuméfaction diffuse, étendue et ne prenant pas le godet en général. La zone touchée a des bords mal définis ; elle est ferme, indolore et s'étend à un membre ou à une autre zone du corps en partie ou dans son entièreté. On peut observer des modifications de la pigmentation (Fig. 5 a–b) et il arrive que le patient ait de la fièvre.

## 2 Formes ulcératives

Lorsque l'ulcère est bien développé, on observe des bords creusés et une induration périphérique. La base nécrosée peut prendre une apparence blanche et cotonneuse (Fig. 6a-d).

Figure 6a ▶  
Main



Figure 6c ▶  
Dos



◀ Figure 6d  
Avant-bras



Figure 6b ▲  
Jambe



L'ulcère est en général indolore, sauf en cas de surinfection bactérienne. Lorsqu'il y en a plusieurs et qu'ils sont proches les uns des autres, ils communiquent souvent en dessous de la peau intacte.

### 3 Atteinte osseuse

- **Ostéomyélite** : Il s'agit d'une véritable ostéomyélite avec un seul ou plusieurs foyers. Au-dessus de l'os, la peau est souvent intacte, sans lésion apparente. Elle peut survenir sous forme de pathologie primaire ou de métastase, parfois à distance de la (des) lésion(s) cutanée(s) ou après leur guérison.



Figure 7 ▶  
Ostéomyélite – Jambe

L'ostéomyélite à *Mycobacterium ulcerans* est indolore au départ avant de devenir franchement douloureuse et bien localisée. On peut en général identifier une zone d'hyperthermie. Un gonflement apparaît ensuite pouvant évoluer vers une fistule avec écoulement de matières nécrosées. L'incision fait apparaître du tissu gélatineux et, en dessous, l'os qui semble avoir été « rongé » par des mites. Contrairement à l'ostéite ouverte contiguë, la nécrose se situe dans l'os lui-même, à un degré variable, similaire à celui qu'on observe en cas d'ostéomyélite tuberculeuse (Fig. 7)

- **Ostéite réactionnelle** : L'ostéite réactionnelle (contiguë) survient à la suite de la destruction profonde des tissus mous au-dessus de l'os.

Il arrive que l'exposition de l'os atteigne le stade de la dévascularisation, de la nécrose de l'os cortical, du séquestre et de l'ostéomyélite. L'apparence macroscopique est alors celle d'un os mort blanchi, d'allure et de texture pratiquement normales.



## 4 Complications et séquelles

- **Rétractions**

Elles résultent des cicatrices provoquées par les lésions au-dessus des articulations ou à leur proximité (Fig. 8 a–b) et s'accompagnent éventuellement d'une ankylose.



▲ Figure 8a  
Déformation par contracture du membre supérieur



Figure 8b►  
Déformation par contracture du membre inférieur

- **Hémorragies**

On observe parfois de petits saignements continuels ou une brusque hémorragie massive. Il faut faire attention d'éviter les gros vaisseaux sanguins en dessous d'une lésion.

- **Surinfection**

Il arrive que certains micro-organismes, comme les staphylocoques, les streptocoques, *Pseudomonas* sp., *Corynebacterium* sp., provoquent des surinfections bactériennes pouvant évoluer vers le phlegmon ou la septicémie.

- **Extension vers les tissus profonds**

L'infection peut s'étendre aux aponévroses profondes et impliquer les gaines des tendons, les muscles, les vaisseaux sanguins, les nerfs, les os et les articulations. Elle peut également détruire le tissu périorbitaire et entraîner ainsi la perte de l'œil.



▲ **Figure 9**  
Cicatrice hypertrophique



**Figure 10** ►  
Carcinome spino-cellulaire

- **Autres séquelles**

Il arrive que des cicatrices hypertrophiques et des chéloïdes se développent sur le site de l'infection ou de l'opération, y compris sur les sites où ont été prélevés des greffons cutanés (Fig. 9).

Le carcinome spino-cellulaire (ulcère de Marjolin) peut apparaître sur une cicatrice instable ou un ulcère persistant, de nombreuses années après l'infection initiale à *M. ulcerans* (Fig. 10).

## 5 Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel est plus difficile pour les nodules que pour les ulcères. Les diagnostics différentiels les plus courants sont décrits dans *Ulcère de Buruli : Infection à Mycobacterium ulcerans* (réf. : WHO/CDS/CPE/GBUI/2000.1)

Le tableau 1 et les figures 11a et 11b traitent du sujet.



▲ Figure 11a  
Leishmaniose



▲ Figure 11b ▲  
Ulcère phagédénique tropical

Papule	Nodule	Plaque	Œdème	Ulcère
Piqûres	Kyste	Lèpre	Phlegmon	Ulcère phagédénique tropical
Boutons	Lipome	Phlegmon	Elephantiasis	Ulcère variqueux
Herpès	Onchocercome	Mycose	Actinomycose	Leishmaniose
Granulome annulaire	Furoncle	Psoriasis	Aponévrosite nécrosante	Ulcère d'origine nerveuse
Psoriasis	Adénite	Hématome	Ostéomyélite	Pian
Pityriasis	Mycose	Piqûres	Onchocercome	Carcinome spinocellulaire

**Note:** Infection caused by other mycobacterial organisms can be mistaken for any of the above.

Tableau 1 Diagnostics différentiels de l'ulcère de Buruli sous ses différentes formes

## Points essentiels

- 1) L'ulcère de Buruli se présente sous la forme de papule, de nodule, de plaque, d'œdème, d'ulcère et d'infection osseuse.
- 2) Il est plus facile de prévenir les rétractions que de les guérir.
- 3) L'ostéomyélite survient lorsque l'ulcère envahit l'os ou lorsque l'infection se transmet par l'intermédiaire du sang.

## Notes

---

---

---

---

---

---

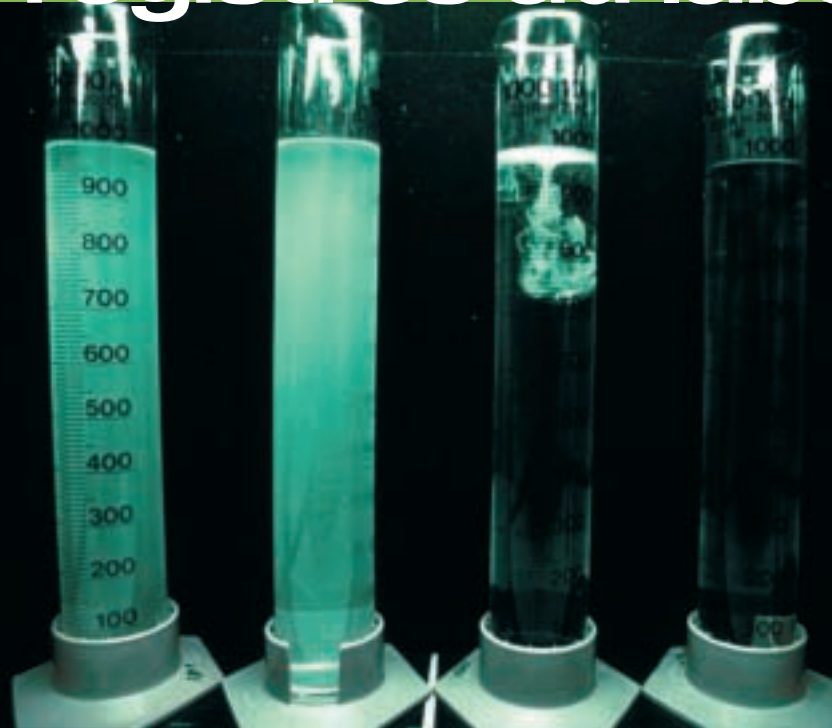
---

---

---

---

# Sécurité biologique et tenue des registres au laboratoire



*Crédit: WHO*

Manipulation des échantillons cliniques | Désinfection au laboratoire | Tenue des registres

## Chapitre 2

# Sécurité biologique et tenue des registres au laboratoire

**Objectif** Vous aider à comprendre la sécurité biologique et la tenue des registres pour *Mycobacterium ulcerans*.

## 1 Manipulation des échantillons cliniques

*Mycobacterium ulcerans* est un agent pathogène présent dans l'environnement et très peu de cas de contagion interhumaine ont été signalés. Il faut néanmoins prendre toutes les précautions nécessaires au laboratoire. Bien que l'on n'ait jamais signalé de transmission de *M. ulcerans* au personnel des laboratoires, les échantillons peuvent renfermer d'autres agents pathogènes insoupçonnés, notamment *M. tuberculosis*, le virus de l'hépatite B ou le VIH. Il faut toujours respecter les règles fondamentales de sécurité : si possible le port de gants et de blouses, l'utilisation des équipements de sécurité biologique de niveau 2 ou 3. Il faut s'efforcer de limiter la formation d'aérosols.

## 2 Désinfection au laboratoire

La désinfection du matériel réutilisable et des surfaces contaminées par des mycobactéries impose des procédures spéciales, différentes de celles mises en œuvre pour les virus, comme le VIH, ou d'autres micro-organismes. Il est déconseillé d'employer des composés à base d'ammonium quaternaire ou de l'hypochlorite de sodium, les premiers étant inefficaces et le second utilisé le plus souvent à des concentrations insuffisantes. Les antiseptiques courants, comme le gluconate de chlorhexidine ou le chlorure de benzalkonium n'ont aucune action sur les mycobactéries, même après deux heures de traitement. Le tableau 2 indique les produits recommandés.

*En plus de la concentration du désinfectant, la durée du contact importe également et elle doit être d'au moins 30 minutes.*

Désinfectant	Concentration
Glutaraldéhyde alcalin	2%
Phénol	5%
Désinfectants à base de phénol (par ex. : Dettol, Cresol)	10%
Iode	10%
Alcool (pour les surfaces)	70%

Tableau 2 Désinfectants recommandés pour les laboratoires travaillant sur *M. ulcerans*

### 3 Tenue des registres

Il est essentiel de bien tenir les registres pour le suivi de chaque échantillon au laboratoire. A cet égard, les « cahiers de paillasse » sont ce qu'il y a de mieux. *M. ulcerans* est une bactérie à croissance lente et il convient donc de faire si possible des comptes rendus intermédiaires. Par exemple, après avoir réalisé une coloration de Ziehl-Neelsen ou une amplification génique, on prépare un compte rendu d'épreuve consignnant les résultats. Dès que la culture devient positive et qu'il est possible de procéder à une identification présomptive, il peut s'avérer utile de préparer un nouveau compte rendu préliminaire avant de finaliser les investigations du laboratoire sur l'échantillon en question.

*Les annexes 2 et 3 présentent des demandes d'analyse au laboratoire et des fiches de compte rendu.*

**Notes**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



# Recueil et transport des échantillons cliniques



Crédit: IFRC/Y. Shimizu

Procédures selon les différents niveaux de soins | Types d'échantillons cliniques | Conservation et transport des échantillons

## Chapitre 3

# Recueil et transport des échantillons cliniques

**Objectif** Vous aider à recueillir les échantillons cliniques qui conviennent et à les amener dans de bonnes conditions au laboratoire.

Epreuves et méthodes	Niveau périphérique	Niveau intermédiaire	Niveau central
Ziehl-Neelsen	+	+	+
Culture	-	+	+
Écouvillonnage d'ulcères	+	+	+
Fragments de tissus obtenus par chirurgie	-	+	+
Chirurgie	-	+	+
Traitement non chirurgical	-	-	+

**Tableau 3** Recueil des échantillons et méthodes de laboratoire à chaque niveau de soins

À l'exception des écouvillons, tous les échantillons doivent provenir de tissus excisés en salle d'opérations. On ne doit jamais prélever de biopsies à l'emporte-pièce sur le terrain, car elles permettent rarement de poser le diagnostic, peuvent aggraver le cas, favoriser les surinfections et retarder le traitement. Dans certaines situations bien précises, on peut effectuer des biopsies par incision à l'hôpital pour éliminer les autres causes étiologiques de lésions cutanées.

## 1 Procédures selon les différents niveaux de soins

Il y a en général dans chaque pays trois niveaux de soins : le niveau périphérique (centres de santé et dispensaires), le niveau intermédiaire (hôpitaux généraux et hôpitaux de districts) et le niveau central (hôpitaux universitaires ou régionaux, centres de recherche). Le tableau 3 décrit le recueil des échantillons et les tests de laboratoire pouvant être réalisés à chaque niveau.

## 2 Types d'échantillons cliniques

- **Formes non ulcératives**

Les échantillons recueillis pour le laboratoire à partir de formes non ulcératives (c'est-à-dire les papules, les nodules, les plaques et les formes œdémateuses – cf. chapitre 2) doivent être prélevés au centre d'un tissu prélevé à partir d'une excision chirurgicale et inclure toute l'épaisseur du tissu cliniquement infecté.

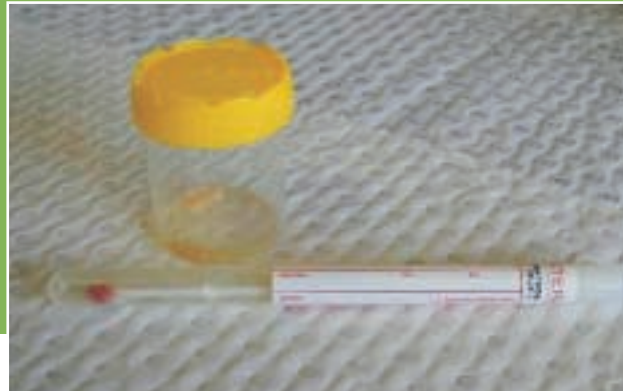


Figure 12 ▶  
Réceptifs pour le recueil des échantillons

Dans le cas des plaques ou des œdèmes notamment, il faut demander au patient ou à un proche d'indiquer l'endroit où la lésion est apparue, ce site étant celui qui permettra le plus probablement de poser le diagnostic, mais il est possible de prélever d'autres biopsies à d'autres endroits de la lésion. Les fragments tissulaires provenant de la périphérie d'une lésion ne sont pas recommandés pour les analyses microbiologiques, *M. ulcerans* y est rarement présente, mais ils peuvent convenir pour l'histopathologie.

- **Formes ulcératives**

On procède à de multiples écouvillonnages sur différents sites des lésions, notamment sous les bords décollés (Fig. 13). **Il ne faut jamais écouvillonner le centre de l'ulcère.**

En histopathologie, ce sont les échantillons comportant tous les niveaux du tissu cutané et sous-cutané qui conviennent le mieux.



▲ Figure 13  
Ecouvillonnage des bords décollés  
d'un ulcère de Buruli

- **Os**

Les méthodes pour évaluer une atteinte osseuse ne doivent être mises en œuvre que dans des centres assurant des services de soins de niveau intermédiaire ou élevé. En cas d'amputation, les échantillons doivent comprendre l'os impliqué ou les produits de curetage ; si l'amputation n'est pas nécessaire, les produits du curetage osseux suffisent.

### 3 Conservation et transport des échantillons

**Echantillons à conserver** en vue d'une analyse immédiate : les mettre dans un récipient stérile sans additif.

**Echantillons à transporter :**

- Analyse dans les 24 heures : garder l'échantillon au froid (de préférence à 4 °C), par exemple dans un récipient isolant avec de la glace
- Au-delà de 24 heures :
  - si l'on dispose de réfrigérateurs, conserver les échantillons à 4 °C. Ne pas congeler.
  - si l'on ne dispose pas de réfrigérateurs, le milieu de transport devient essentiel. On recommande le bouillon 7H9 de Middlebrook additionné de polymyxine B, d'amphotéricine B, d'acide nalidixique, de triméthoprime et d'azlocilline (PANTA). L'ajout de gélose à 0,5 % permet d'obtenir un milieu semi-solide. (La mise en culture reste positive pour des échantillons gardés jusqu'à 21 jours dans un milieu de transport).

**Transport en vue de la PCR**

Ce sont les échantillons de tissus frais, préparés comme il a été décrit ci-dessus, qui conviennent le mieux à la réalisation de la PCR. Pour les formes ulcéraives, des écouvillons secs, conservés dans leur récipient en plastique à température ambiante, sont acceptables.

#### Notes

---



---



---



---



---

# Surinfections bactériennes



*Crédit: WHO*

Echantillons à prélever | Examen direct | Culture | Analyse de l'antibiogramme

## Chapitre 4

# Surinfections bactériennes

**Objectif** Vous aider à diagnostiquer les surinfections bactériennes se superposant parfois à une infection à *M. ulcerans*.

Les ulcères de Buruli se surinfectent moins souvent qu'on ne s'y attendrait au vu de l'extension des pertes cutanées. Les raisons ne sont pas très claires, mais la mycolactone, la toxine produite par *M. ulcerans*, pourrait avoir un effet antibiotique. Il n'en reste pas moins que les surinfections à staphylocoque doré ou avec d'autres agents pathogènes sont bien connues. Il faut envisager cette possibilité si un phlegmon se développe sur une lésion, si celle-ci devient douloureuse ou encore si le patient présente de la fièvre.

## 1 Echantillons à prélever

**Écouvillons** : Prendre un écouvillon stérile pour recueillir le pus ou tout autre exsudat et le mettre dans un milieu de transport de Amies ou de Stuart pour l'amener au laboratoire le plus vite possible.

**Fragments tissulaires** : cf. Chapitre 3.

## 2 Examen direct au microscope

**Coloration de Gram** : La coloration de Gram d'un frottis représente la méthode de choix pour identifier les bactéries à Gram positif, négatif ou les levures.

**Préparation à l'état frais** : On l'utilise pour détecter les éléments fongiques ou les levures. Elle est réalisée en mélangeant l'échantillon à une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 15 % sur une lame de verre recouverte d'une lamelle. L'ensemble est ensuite chauffé 15 minutes pour dissoudre la kératine, après quoi on recherche la présence d'éléments fongiques ou de levures à un grossissement de x 400.

### 3 Culture

Il faut traiter les échantillons dès leur arrivée au laboratoire. Le choix du milieu de culture dépend du résultat de la coloration de Gram et des observations sur la préparation à l'état frais.

**Bactéries :** En cas de surinfection bactérienne, il faut en principe, pour chaque échantillon (pus ou exsudat), ensemercer trois milieux de culture au minimum.

#### *Plaques de gélose au sang :*

- Incubation aérobie à 35 °C pendant 18 à 20 heures pour l'isolement des staphylocoques, des streptocoques et des *Candida* ;
- Incubation anaérobie à 35 °C pendant 48 heures pour les espèces anaérobies comme *Clostridium* sp.

#### *Milieu de McConkey ou milieu CLED (Cystine Lactose Electrolyte Deficient) pour l'isolement des bacilles Gram-négatifs.*

*Incubation :* à 35 °C pendant 18 à 20 heures pour distinguer les bacilles provoquant la fermentation du lactose. Le bouillon dit de Robertson préparé avec une infusion de cœur de bœuf peut être ensemercé en vue de l'enrichissement puis mis à incuber à 37 °C pendant 24 heures avant le repiquage en milieu solide.

*Champignons :* On pratique une culture sur gélose de Sabouraud (incubation à 28 °C) si l'on a observé des éléments fongiques ou des levures sur la préparation à l'état frais. Les boîtes ensemençées doivent incuber à température ambiante au moins pendant 7 jours.

*Identification des micro-organismes obtenus par culture :* il faut tout d'abord repiquer chaque bactérie ou champignon isolé pour obtenir des cultures pures puis les identifier selon les méthodes classiques. Par exemple, on applique l'épreuve de la coagulase pour les staphylocoques, le test de la bacitracine et le « groupage » de Lancefield pour les streptocoques et les épreuves biochimiques pour les bacilles Gram-négatifs.

### 4 Antibiogramme

La sensibilité aux antimicrobiens varie d'un endroit et d'une région à l'autre. Les laboratoires doivent donc impérativement déterminer les profils de sensibilité locaux. Cela permet ensuite de sélectionner les antimicrobiens les mieux adaptés pour le traitement. Le mieux serait de pouvoir analyser la sensibilité aux antibiotiques de tous les micro-organismes isolés.

**Notes**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



# Méthodes en microbiologie



Crédit: WHO

Préparation des échantillons | Examen direct des frottis | Décontamination | Culture *in vitro* | Identification

## Chapitre 5

# Méthodes en microbiologie pour diagnostiquer l'infection à *M. ulcerans*

**Objectif** Vous aider à comprendre les différentes méthodes microbiologiques pour diagnostiquer l'infection à *M. ulcerans*.

*L'annexe 1 présente un schéma de diagnostic au laboratoire.*

## 1 Préparation des échantillons

### Echantillons de tissus

- Découper l'échantillon en petits morceaux dans une solution tampon phosphate (PBS) ou d'eau physiologique à l'aide d'une lame de bistouri à usage unique ou stérilisable à l'autoclave. (**N.B.** Si le matériel doit être réutilisé, il doit tout d'abord être plongé dans une solution désinfectante, puis brossé soigneusement avant d'être stérilisé afin d'éviter les contaminations croisées, notamment pour la PCR. Voir au tableau 2 les désinfectants recommandés).
- Bien mélanger (par exemple avec un agitateur Vortex).
- On peut également broyer l'échantillon à l'aide d'un mortier et d'un pilon ou d'un broyeur de Potter. Là encore, il faut faire soigneusement attention d'éviter les contaminations croisées lorsqu'on nettoie ces instruments.

### Écouvillons

- Mettre en suspension les écouvillons dans un petit volume de tampon phosphate ou d'eau physiologique puis bien les agiter au Vortex (par exemple dans un tube stérile de 20 ml).
- On peut également agiter directement (avec un Vortex) le milieu liquide de transport renfermant l'écouvillon.

## 2 Examen direct des frottis

On connaît plusieurs techniques de coloration des mycobactéries : Ziehl-Neelsen (ZN), Kinyoun et l'auramine-rhodamine. La méthode utilisée localement pour le diagnostic de la tuberculose peut s'appliquer à *M. ulcerans*. Dans la plupart des cas, il s'agira de la coloration de ZN (cf. Annexe 5). Le résultat de la lecture des frottis se fera en appliquant la méthode employée pour le diagnostic microbiologique de la tuberculose.

## 3 Décontamination avant la mise en culture

Pour l'isolement de *M. ulcerans*, les échantillons en primoculture étant susceptibles de contenir des agents contaminants, la décontamination est donc nécessaire avant de mettre en culture. On obtient les meilleurs résultats à partir des échantillons frais traités et décontaminés immédiatement. Les problèmes de prolifération bactérienne ou fongique et la perte de viabilité des mycobactéries s'accroissent avec l'augmentation du temps de conservation et de transport.

### Méthodes *in vitro*

On a décrit plusieurs méthodes pour décontaminer les échantillons avant leur mise en culture. Lorsque les méthodes de décontamination sont trop drastiques, elles réduisent la possibilité d'obtenir une culture positive de *M. ulcerans*. La méthode choisie dépend du milieu de culture utilisé :

- pour les cultures en milieu liquide (BACTEC) on recommande la N-acétyl-L-cystéine/NaOH ou la méthode de Petroff (cf. Annexe 7) ;
- pour le milieu de Löwenstein-Jensen, toutes les méthodes décrites pour la décontamination des échantillons renfermant des mycobactéries conviennent (voir Annexe 7).

Il faut rappeler que les méthodes de décontamination trop agressives tuent de nombreuses mycobactéries et diminuent le rendement en cultures positives. Le choix de la méthode revient donc au microbiologiste et dépendra de la nature des échantillons et de leur degré de contamination.

### Méthodes *in vivo*

On peut utiliser des animaux de laboratoires (des souris en général) pour l'isolement primaire de *M. ulcerans* à partir d'échantillons provenant de patients, afin de réduire les problèmes de contamination. On obtient ainsi souvent une

meilleure sensibilité qu'avec les méthodes *in vitro*. Pour les coussinets plantaires, un échantillon de 30  $\mu$ l, préparé comme cela a été décrit plus haut dans la section sur les échantillons de tissus, est injecté par voie sous-cutanée (ou 100  $\mu$ l si on injecte dans la queue, voir figure 14). Dès le premier signe d'infection, l'animal est sacrifié, des biopsies sont prélevées dans des conditions stériles sur le coussinet plantaire ou la queue. Les tissus prélevés sont ensuite préparés en vue de la culture comme des échantillons classiques, y compris pour la décontamination.

Figure 14 ►  
Inoculation de *M. ulcerans*  
dans la queue d'une souris.  
Observer l'œdème et l'ulcère



## 4 Culture *in vitro*

### Milieu de culture

Parmi les milieux solides, celui de Löwenstein-Jensen convient le mieux à la culture de *M. ulcerans*. Pour le système BACTEC, on recommande le milieu Middlebrook 7H12B (cf. annexe 8).

### Conditions de culture

*M. ulcerans* se développe dans les mêmes conditions que *M. tuberculosis* sauf pour la température, qui doit se situer entre 29 et 33 °C. En milieu liquide (par exemple dans le système BACTEC), des conditions microaérobies (2,5 à 5% d'oxygène) peuvent favoriser le développement de *M. ulcerans*.

### Durée de la culture

Les cultures primaires deviennent en général positives après 6 à 12 semaines d'incubation (de 29 à 33 °C), mais il arrive que certains échantillons nécessitent une incubation beaucoup plus longue, jusqu'à 9 mois parfois. On choisira la durée d'incubation en fonction des objectifs de l'investigation.

## Inoculation chez la souris

### 1. Préparation de l'échantillon

#### • Ecouillons

Agiter en tournant l'écouvillon dans le tube contenant 1 ml d'eau physiologique stérile (0,85 %)

Bien mélanger.

Prélever un échantillon à l'aide d'une seringue à insuline stérile.

#### • Fragments de tissus

Broyer les fragments dans un broyeur à tissus (Potter) avec du sérum physiologique (2 ml). Placer le surnageant dans un tube stérile et prélever un échantillon à l'aide d'une seringue à insuline stérile.

### 2. Inoculation de l'animal

Inoculation dans le coussinet plantaire : 0,03 ml dans celui de la patte arrière

Inoculation dans la queue : 0,1 ml dans la queue par voie sous-cutanée.

*On observe les animaux toutes les semaines pour voir le développement d'une inflammation au niveau du site d'injection. Un échantillon du tissu infecté est prélevé, décontaminé et mis en culture.*

## 5 Identification

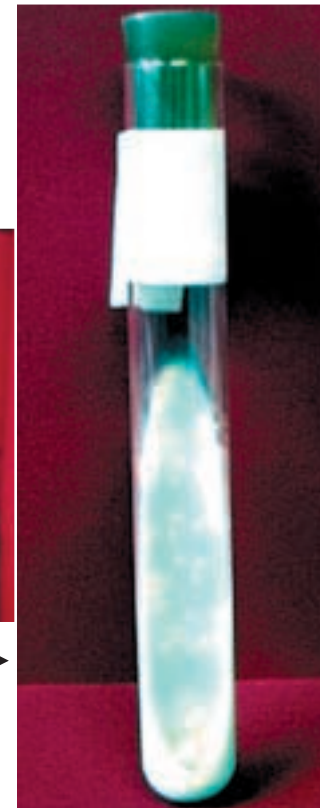
### Cultures primaires positives

Lorsque les primocultures sont positives, les colonies évoquant *M. ulcerans* apparaissent jaunâtres, rugueuses et à bords bien démarqués. Les souches africaines sont plus jaunâtres (Fig. 15 a) que les australiennes (Fig. 15 b), dont la pigmentation est parfois très légère.

Figure 15a ►  
Souches de *M. ulcerans* provenant d'Afrique et cultivés sur milieu L-J : on observe une légère pigmentation jaune.



Figure 15b ►  
Souche de *M. ulcerans* provenant d'Australie et cultivée sur milieu L-J. La souche n'a pas produit de pigmentation (mycobactérie non chromogène)



Il convient de sélectionner une colonie isolée et typique pour la repiquer sur un milieu de Löwenstein-Jensen. Lorsque le BACTEC est positif, on ensemence un milieu L-J à partir du milieu BACTEC.

### Identification après repiquage

#### Vitesse de croissance

On classe les mycobactéries en fonction de leur croissance, lente ou rapide. On distingue les deux types en fonction du délai d'apparition des colonies, plus ou moins de 7 jours sur milieu solide. On observe des colonies isolées après ensemencement d'un milieu solide avec une suspension de culture standard diluée à  $10^{-4}$ , préparée à une densité optique de 0,25 à 580 nm, dans un tube de 2 cm de diamètre. Cela correspond en gros à une suspension renfermant 1 mg de bacilles humides par ml. Le fait que les espèces à croissance rapide, mais pas celles à croissance lente, se développent sur des milieux simples, comme de la gélose nutritive ou de l'eau peptonée, représente un autre moyen de les distinguer.

**Identification de *M. ulcerans*****Epreuves phénotypiques**

*M. ulcerans* appartient au groupe à croissance lente. Le Tableau 4 résume l'identification de cette espèce et de celles qui lui sont apparentées.

L'annexe 9 donne les méthodes d'identification des mycobactéries à croissance lente.

Le Tableau 4 donne les épreuves phénotypiques spécifiques pour l'identification de *M. ulcerans* et des espèces apparentées. Le Tableau 5 donne les différences entre les sous-groupes en fonction de leur origine géographique. On peut procéder à des épreuves de sensibilité aux médicaments pour poursuivre l'identification. *M. ulcerans* se montre constamment résistante à l'isoniazide, l'acide para-aminosalicylique (PAS) et l'éthambutol, mais elle est sensible à la rifampicine, la streptomycine, et plusieurs antituberculeux de seconde intention (cf. tableau 6).

Tableau 4 Caractéristiques phénotypiques de *M. ulcerans* et d'espèces apparentées

Paramètres	<i>M. ulcerans</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. shinshuense</i>
<b>Pigmentation dans l'obscurité</b>	+	-	+
<b>Pigmentation à la lumière</b>	+	+	+
<b>Croissance à 37 °C</b>	-	-	-
<b>Croissance sur eau peptonée</b>	-	+	-
<b>Croissance en présence de :</b>			
<b>Isoniazide (10 µg/ml)</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	-
<b>Hydrazide de l'acide thiophène-2-carboxylique (2 µg/ml)</b>	+	+	-
<b>Hydroxylamine (250 µg/ml)</b>	<b>F</b>	+	+
<b>Paranitrobenzoate (500 µg/ml)</b>	-	<b>M</b>	-
<b>NaCl à 5%</b>	-	-	-
<b>Propriétés enzymatiques</b>			
<b>Catalase, &gt; 45 mm de mousse</b>	-	-	+
<b>Hydrolyse du Tween 80 (10 jours)</b>	-	+	-
<b>Uréase</b>	<b>F</b>	+	-
<b>Production de niacine</b>	<b>F / -</b>	-	-
<b>Réduction des nitrates</b>	-	-	-
<b>Phosphatase acide</b>	<b>F</b>	+	-

+ : > 85% de souches positives ; - : < 15% de souches positives ;  
M : de 50 à 85% de souches positives ; F : de 15 à 49% de souches positives

Tableau 5 Caractéristiques des différents sous-groupes géographiques de *M. ulcerans*

	Sous-groupes géographiques de <i>M. ulcerans</i>					
	Afrique	Australie	Mexique	Amérique du Sud	Chine	Japon
Pigmentation dans l'obscurité	+ (1)	-	-	+	-	+
Pigmentation à la lumière	+ (1)	-	-	+	-	+
Croissance à 37 °C	-	-	-	-	-	-
Croissance sur eau peptonée	-	-	-	-	-	-
<b>Croissance en présence de :</b>						
Isoniazide (10 µg/ml)	+	M	+	-	-	-
Hydrazide de thiophene-2-carboxylic (2 µg/ml)	+	+	+	+	+	-
Hydroxylamine (250 µg/ml)	-	+	+	M	+	+
Paranitrobenzoate (500 µg/ml)	-	-	+	-	V	-
NaCl à 5%	-	-	-	-	-	-
<b>Propriétés enzymatiques :</b>						
Catalase, > 45 mm de mousse	-	-	-	-	-	+
Hydrolyse de Tween 80 (10 jours)	-	-	-	-	-	-
Uréase	-	-	-	-	-	-
Production de niacine	-	-	-	-	-	-
Réduction des nitrates	-	-	-	-	-	-
Phosphatase acide	M	-	-	-	-	-
Résultat du séquençage (2)	Type 1	Type 2	Type 3	<i>M. marinum</i>	<i>M. shinshuense</i>	<i>M. shinshuense</i>
(1) Léger pigment jaunâtre						
(2) Résultats de Portaels et al., 1996						
Données extraites de :						
Portaels et al. chapitre 11: Bacteriology of <i>M. ulcerans</i> , in : <i>Mycobacterium ulcerans</i> infection (Buruli Ulcer) Ed: Portaels F, Meyers WM. Kluwer Academic Publishers. Resurgent and Emerging Infectious Diseases (en préparation)						
+ : > 85% de souches positives ; - : < 15% de souches positives ; M : de 50 à 85% de souches positives ; V : résultats variables						

Tableau 6 Sensibilité *in vitro* de *M. ulcerans* aux antimycobactériens

Antimycobactérien	Milieu	µg/ml (1)		Croissance
Isoniazide	L-J	0,1	10	+
Acide para-aminosalicylique	L-J	0,5	50	+
Ethambutol	L-J	0,25	5	+
Streptomycine	L-J	2	50	-
Rifampicine	7H11	2		-
	L-J	4	40	-
Ethionamide	L-J	4	30	+
Cyclosérine	L-J	5	30	-
Kanamycine	L-J	8	20	-
Clarithromycine	7H11	0,5	4	-
Ofloxacine	7H11	2		-
Ciprofloxacine	7H11	1		-
Sparfloxacine	7H11	0,5		-
Amikacine	7H11	2		-
	L-J	30		-
Capréomycine	L-J	16	20	-
Thioacétazone	L-J	2		+
Thiosemicarbazone	L-J	0,5	4	+
Viomycin	L-J	10	50	-
Thiocarbanilide	L-J	50		+
Dapsone	L-J	3		-
	L-J	1		F
	L-J	0,3		M

(1) Concentrations testées par plusieurs auteurs

Données extraites de :  
Portaels et al., chapitre 11: Bacteriology of *M. ulcerans*, in : *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli Ulcer)  
Ed: Portaels F, Meyers WM. Kluwer Academic Publishers. Resurgent and Emerging Infectious Diseases  
(en préparation). + : > 85% de souches positives ; - : < 15% de souches positives ; M : 50 to 85% de souches positives ; F : 15 to 49% de souches positives



**Identification des colonies par amplification génique (PCR)**

On peut également identifier les cultures positives au moyen de la PCR, comme cela est décrit ci-dessous et à l'annexe 10.

**Identification de *M. ulcerans* par la PCR**

La PCR permet d'identifier *M. ulcerans* directement dans les échantillons cliniques ou à partir des milieux de culture. Bien que plusieurs méthodes aient été publiées, la meilleure est actuellement la IS2404. Néanmoins la PCR reste relativement onéreuse et elle est notoirement connue pour les faux positifs obtenus par les laboratoires manquant d'expérience.

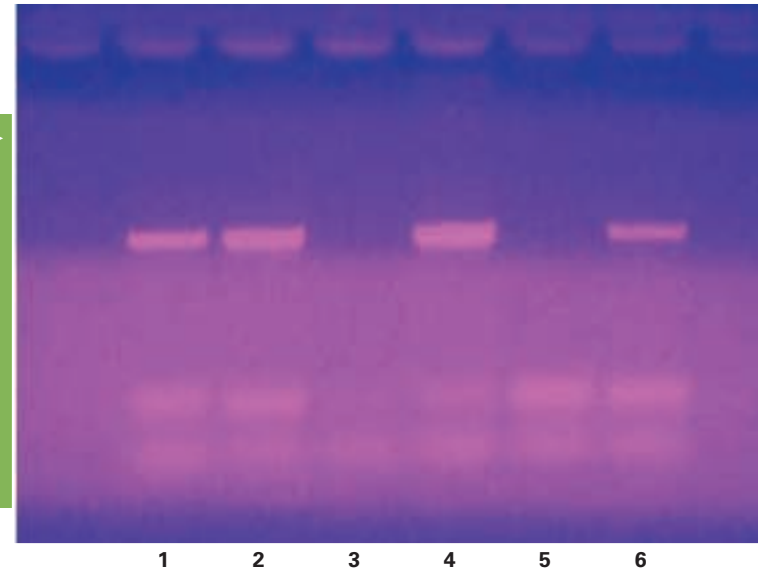
Les écouvillons secs, les tissus frais ou les spécimens conservés dans un milieu de transport sont les échantillons cliniques qui conviennent pour la PCR. On doit les préparer comme pour la culture, bien que la décontamination ne soit pas nécessaire. Il faut faire soigneusement attention d'effectuer la préparation de l'échantillon, celle du mélange réactif et le gel d'agarose dans des zones séparées du laboratoire de façon à éviter les contaminations croisées.

On conseille d'intégrer dans chaque épreuve de PCR des témoins négatifs ; il faut rejeter tous les résultats dès qu'un témoin négatif devient positif. Pour lutter contre le phénomène d'inhibition, toutes les réactions sont effectuées en double. Le deuxième tube est « chargé » d'environ 100 molécules d'ADN purifié de *M. ulcerans*. Si ces témoins positifs chargés donnent des résultats négatifs, la PCR est inhibée. On peut souvent surmonter cette difficulté pour les échantillons cliniques en recommençant la PCR avec une dilution au 1/10 de l'échantillon d'ADN extrait.

On peut contrôler les résultats présumés positifs de la PCR au moyen du transfert de Southern (Southern Blot) et une sonde interne complémentaire de IS2404. Avec l'expérience, il devient acceptable de se fier à la comparaison entre la position du produit de PCR à partir des échantillons testés et celle obtenue pour le témoin positif. Il faut mettre en place des mesures de contrôle de la qualité et l'on comparera les résultats de la PCR avec ceux de la culture. Si les deux produits de la PCR (le témoin positif et l'échantillon) s'alignent précisément et si les témoins sont négatifs, on peut conclure à la présence de *M. ulcerans* dans l'échantillon inconnu.

La figure 16 illustre des résultats d'échantillons testés par PCR. On recommande d'utiliser le transfert de Southern ou une méthode équivalente pour établir si le produit d'amplification est bien la séquence recherchée, lorsque de nouveaux laboratoires mettent en place la PCR pour *M. ulcerans*.

**Figure 16 ▶**  
Electrophorèse en gel additionné de bromure d'éthidium sous éclairage UV. Bande 1 : témoin positif ; bandes 2, 4 et 6 : écouvillons de patients infectés par *M. ulcerans* ; bande 3 : témoin négatif ; bande 5 : écouvillon d'un patient présentant un ulcère chronique (absence de *M. ulcerans*).



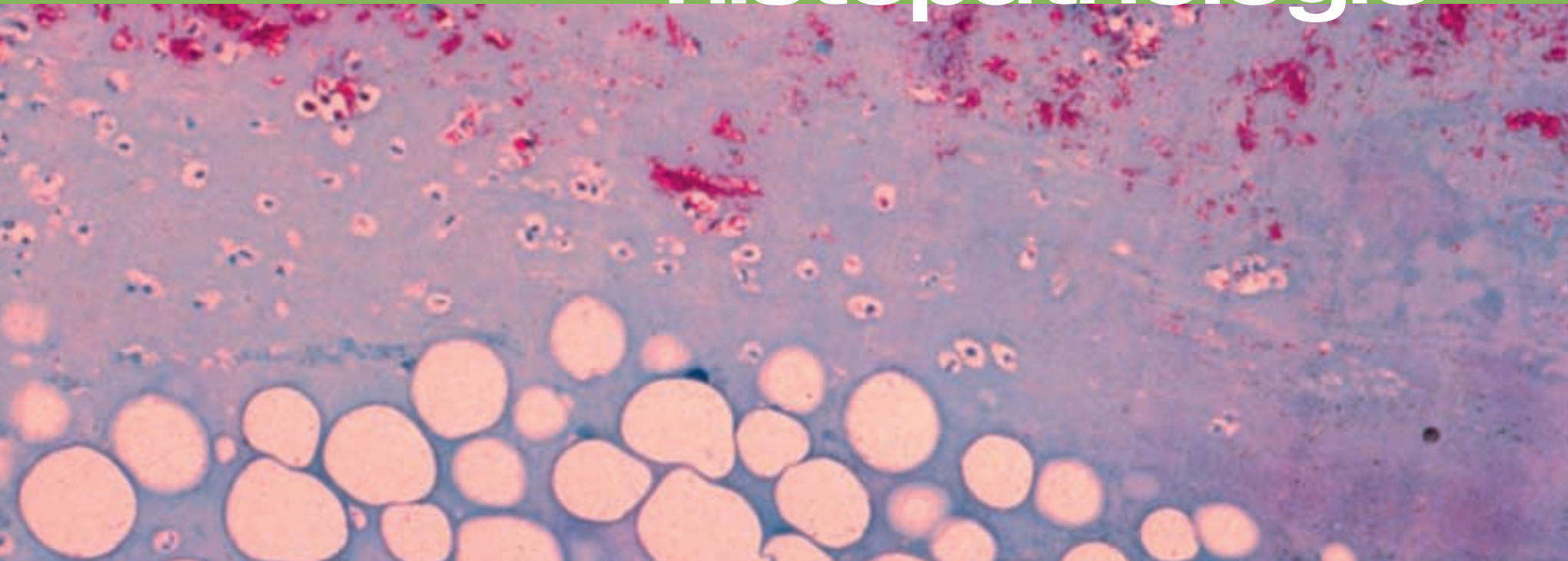
La PCR a pour principal avantage de permettre au laboratoire un diagnostic définitif de l'infection à *M. ulcerans* dans les 24 heures qui suivent la réception d'un échantillon clinique, alors qu'avec la culture, il faut au moins six semaines pour obtenir une confirmation. On recommande actuellement de voir dans la PCR une épreuve rapide auxiliaire et non une méthode remplaçant la culture ou l'histologie.

En résumé, le protocole de diagnostic par la PCR comporte 4 phases :

- Lyse thermo-alcaline (pour libérer l'ADN des cellules de *M. ulcerans*)
- Extraction de l'ADN total de l'échantillon
- Application de la PCR pour détecter l'ADN spécifique de *M. ulcerans* dans l'ADN total (amorces légèrement modifiées par rapport à celles de Ross et al., 1997a)
- Identification des produits de l'amplification (par exemple par électrophorèse en gel d'agarose).

L'annexe 10 donne le protocole complet.

# Méthodes en histopathologie



*Crédit: WHO*

Sélection du site pour le prélèvement de la biopsie | Fixation des tissus | Préparation des coupes histopathologiques  
Modifications grossières | Modifications histopathologiques

## Chapitre 6

# Méthodes en histopathologie

**Objectif** Vous aider à comprendre les diverses méthodes utilisées en histopathologie pour diagnostiquer l'infection à *M. ulcerans*.

## CE QU'IL FAUT SAVOIR

Il est très important de connaître en détail l'historique et la description de la lésion excisée pour que l'évaluation soit utile et aux fins d'archivage. Le nom, l'âge, le sexe du patient, le numéro du laboratoire ou de l'hôpital et le site de la lésion sont des informations absolument essentielles.

### 1 Sélection du site pour le prélèvement de la biopsie

On conseille l'excision. Les spécimens prélevés à l'emporte-pièce ne sont pas satisfaisants la plupart du temps.

#### **Lésions non ulcératives**

Il faut prélever le spécimen au centre présumé de la lésion et inclure toutes les couches de tissu cutané et sous-cutané, jusqu'à l'aponévrose.

#### **Lésions ulcératives**

On prélève l'échantillon sur les bords de l'ulcère. Là encore, il doit inclure toute l'épaisseur de la peau et du tissu sous-cutané, jusqu'à l'aponévrose.

## 2 Fixation des tissus

On fixe de préférence le tissu dans une solution de formol à 10%, neutre ou tamponnée (pH 7,4). Dans l'idéal, il faut prévoir un volume de solution 10 fois supérieur à celui du tissu et laisser en contact au moins 24 heures avant l'expédition. Après fixation, on peut expédier le tissu dans des volumes moins importants de fixateur. Il faut faire attention de bien identifier les échantillons à l'aide d'un marqueur indélébile sur l'étiquette du récipient. Il faut décalcifier les os avant de les sectionner.

## 3 Préparation des coupes histopathologiques

Il suffit de traiter comme d'habitude les tissus fixés. On prépare des coupes de 4 à 5 microns d'épaisseur que l'on colore : 1) à l'hématoxiline-éosine ; 2) par la méthode de Ziehl-Neelsen pour mettre les BAAR en évidence ; 3) à la méthénamine argentique de Grocott pour la recherche des champignons ; 4) par la méthode de Gram pour mettre en évidence d'autres bactéries (voir annexe 6). Suivre les indications pour l'emploi des autres colorations.

## 4 Modifications grossières

Les modifications à la surface des lésions non ulcératives font apparaître une perte des repères topographiques et une dépigmentation. On observe dans les coupes transversales des modifications de la pigmentation, une nécrose et une minéralisation. Les ganglions lymphatiques apparaissent souvent grisâtres à la surface de la coupe. Après décalcification, on observe dans les coupes transversales d'os une nécrose jaunâtre de la moelle et souvent, un amincissement de la zone corticale.

## 5 Modifications histopathologiques

### Modifications cutanées

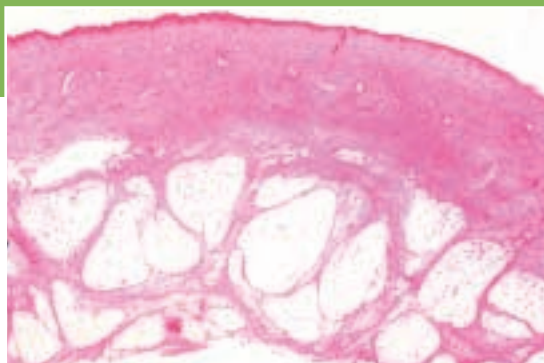
#### Phase nécrosante (évolutive) : lésions non ulcératives



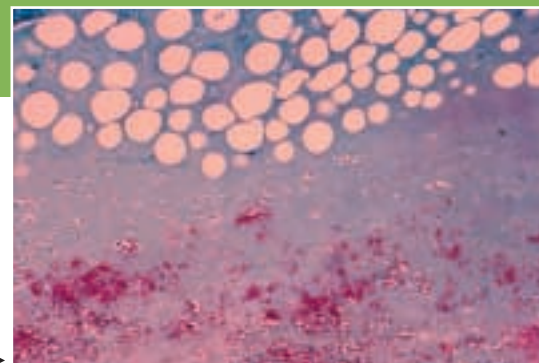
◀ **Figure 17**  
Coupe d'un nodule excisé chirurgicalement. La zone centrale blanchâtre témoigne de la nécrose de coagulation.



**Figure 18** ▶  
Coupe microscopique du nodule de la figure 17. Observer la nécrose massive de coagulation dans la couche profonde du derme et du tissu sous-cutané. H & E x 2



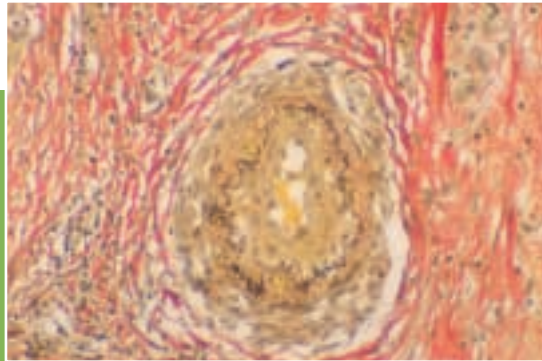
◀ **Figure 19**  
Tissu cutané et sous-cutané provenant d'une lésion non ulcératrice très étendue provoquée par *M. ulcerans*, qui couvrait 50 % de la surface abdominale d'un enfant de 9 ans. L'épiderme est intact. Il y a une nécrose massive de coagulation confluente dans l'ensemble de l'échantillon. H & E x 2



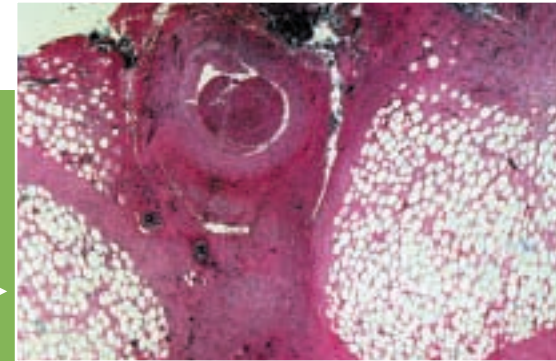
**Figure 20** ▶  
Base nécrosée d'un ulcère de Buruli faisant apparaître de nombreux adipocytes fantômes (dans la partie supérieure) et de nombreux BAAR (dans la partie inférieure). Coloration ZN x 50

L'épiderme est intact mais souvent hyperplasique. Le derme supérieur est en général intact également mais on peut y observer des dégénérescences à divers stades avec l'infiltration d'un petit nombre de cellules inflammatoires. Il y a une nécrose de coagulation confluente dans le derme profond, le tissu sous-cutané et l'aponévrose sous-jacente (Fig. 17 à 19). On observe un œdème avec un nombre remarquablement faible de cellules inflammatoires, à moins que la lésion ne soit surinfectée par une bactérie pyogène. Les adipocytes enflent, mais peuvent perdre leur noyau tout en gardant les parois cellulaires (adipocytes fantômes de la figure 20).

La vascularite est courante dans le tissu sous-cutané, souvent avec occlusion des vaisseaux par des thrombi (Fig. 21 et 22). On observe différents degrés de minéralisation, notamment chez les patients africains. La coloration ZN classique met en évidence un grand nombre de bacilles acido-alcoolrésistants (BAAR) extracellulaires, souvent en amas et confinés dans les zones nécrosées (Fig. 23).



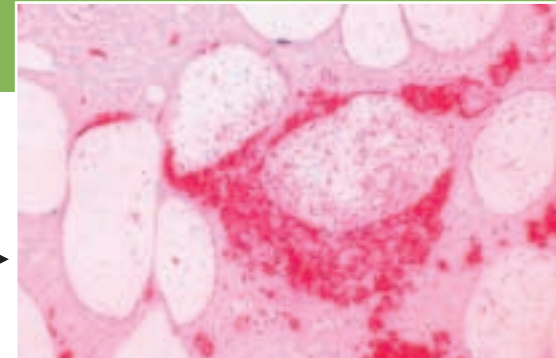
◀ **Figure 21**  
Vascularite sévère dans le tissu sous-cutané d'une lésion de l'ulcère de Buruli. Movat x 80



**Figure 22** ▶  
Adipocytes fantômes et vascularite. Coloration H & E x 50



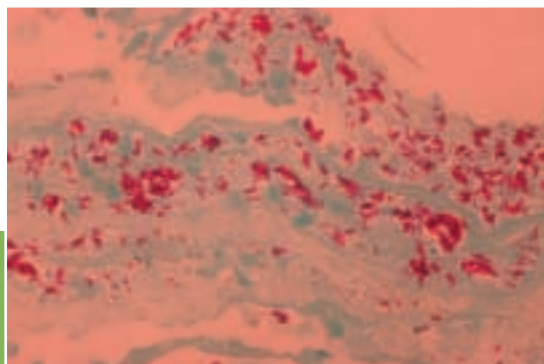
◀ **Figure 23**  
La coloration ZN d'une coupe parallèle à celle de la figure 18 met en évidence des BAAR confinés au centre de la lésion. La nécrose s'étend loin au-delà des BAAR x 2



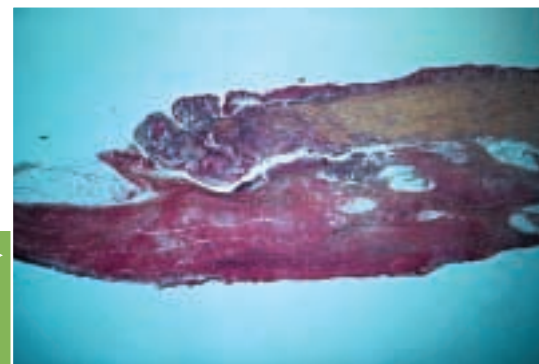
**Figure 24** ▶  
Tissu sous-cutané provenant des bords d'un ulcère de Buruli : on observe des adipocytes fantômes accompagnés de BAAR dans l'espace interstitiel. Coloration ZN x 100

La plupart des bacilles se trouvent dans les zones profondes de l'échantillon mais peuvent envahir l'espace interstitiel dans le tissu adipeux et les cloisons interlobulaires du tissu sous-cutané (Fig. 24).

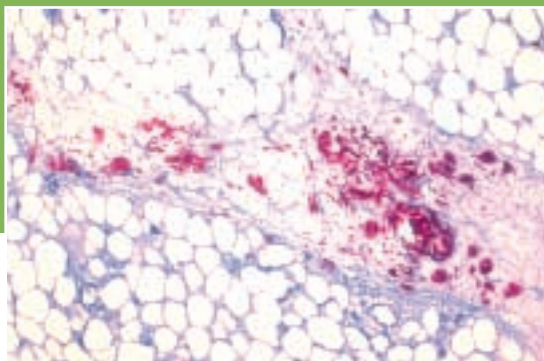
La nécrose persistante du derme aboutit en général à une dégénérescence de l'épiderme et au bout du compte, à l'ulcération. Il arrive néanmoins que la nécrose s'étende latéralement, avec une prolifération des BAAR dans le tissu sous-cutané et l'aponévrose (Fig. 25). L'ulcération de l'épiderme ne se produit alors que très tardivement. La propagation de la maladie de cette manière entraîne la formation des plaques et les formes œdémateuses.



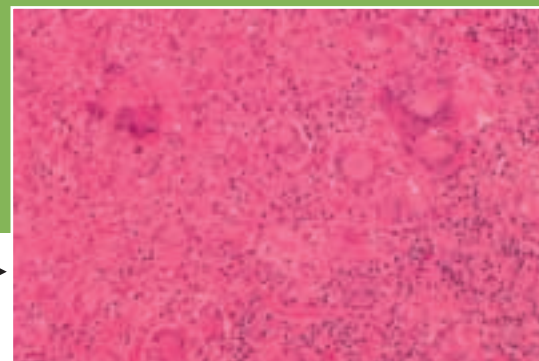
◀ **Figure 25**  
Des amas de BAAR infiltrent la base  
des bords d'un ulcère de Buruli.  
BAAR en amas typiques. ZN x 100



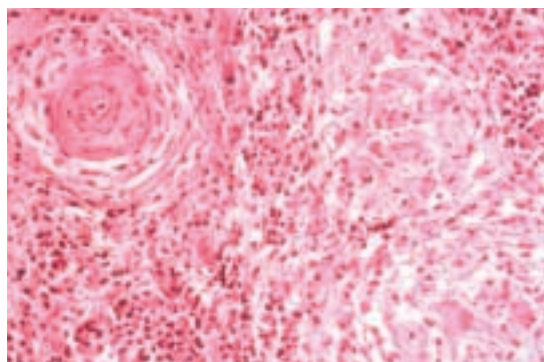
**Figure 26 ▶**  
Echantillon de biopsie provenant du  
bord d'un ulcère de Buruli et montrant le  
détachement du derme et une nécrose  
massive de l'épiderme, du derme, de  
l'hypoderme et de l'aponévrose.



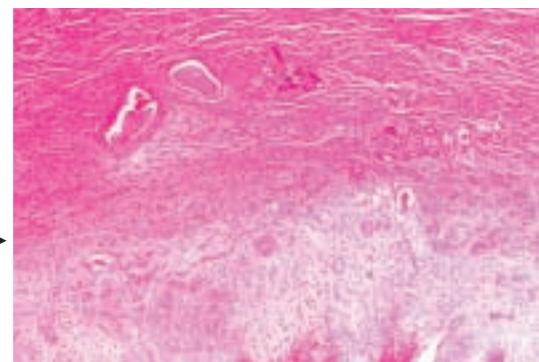
◀ **Figure 27**  
Tissu sous-cutané provenant de la  
marge d'un ulcère de Buruli et  
montrant la nécrose et l'épaississement  
d'une cloison interlobulaire. On y  
observe des amas de BAAR. ZN x 50



**Figure 28 ▶**  
Guérison d'un ulcère de Buruli à un stade  
précoce, dans la phase d'organisation :  
lymphocytes, cellules épithélioïdes et  
cellules géantes. H & E x 50



◀ **Figure 29**  
Granulome bien formé au cours de la  
réaction d'hypersensibilité retardée  
dans un ulcère de Buruli en voie de  
guérison. H & E x 50



**Figure 30 ▶**  
Guérison d'un ulcère de Buruli à  
un stade avancé, avec des  
cicatrices sur la plus grande  
partie de la coupe. H & E x 25



**Phase nécrosante (évolutive) : lésions ulcératives**

Les ulcères sont décollés et l'on observe la formation d'un nouvel épithélium sur les bords de la lésion et la surface en dessous du lambeau de derme qui la recouvre (Fig. 26). L'épiderme adjacent est en général hyperplasique. La base de l'ulcère d'origine comporte une escarre nécrosée de débris cellulaires et de fibrine et parfois une escarre centrale. On observe une nécrose de coagulation du tissu sous-cutané et de l'aponévrose semblable à celle décrite pour les lésions non ulcératives (Fig. 25 et 27). Les BAAR se localisent à la base de l'escarre centrale et du tissu sous-cutané nécrosé. La maladie s'étend rarement au muscle sous-jacent. On observe souvent une vascularite et une minéralisation (Fig. 21).

**Organisation (phase granulomateuse précoce)**

La phase précoce de la guérison se caractérise par une réaction granulomateuse mal organisée dans le derme et le tissu sous-cutané (Fig. 28).

L'infiltration granulomateuse renferme des macrophages enflés (cellules épithélioïdes), des cellules géantes de Langhans et des lymphocytes, qui finissent par former des granulomes tuberculoïdes. On observe parfois des macrophages spumeux, des lymphocytes et des plasmocytes sur les bords de la graisse nécrosée. Les BAAR sont rares ou absents.

**Phase de guérison**

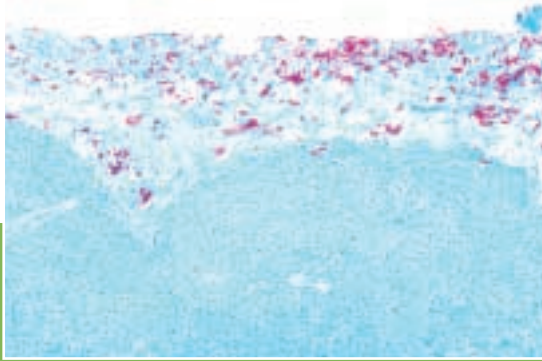
Avec la progression de la guérison, le tissu de granulation se forme, suivi d'une fibrose et d'une cicatrice affaissée (Fig. 29 et 30). On observe rarement des BAAR.

***Ganglions lymphatiques***

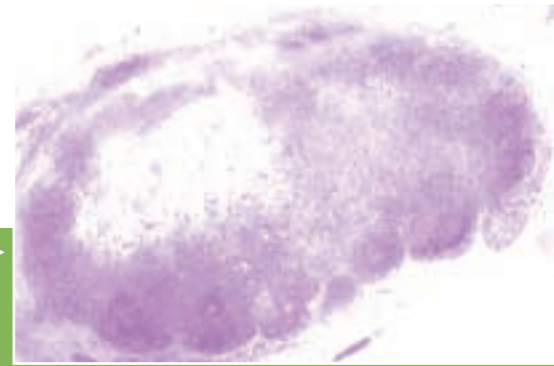
Bien que l'adénopathie clinique soit rarement manifeste, on observe souvent des adénites importantes à l'histopathologie, à la fois au niveau des ganglions adjacents à la lésion et des ganglions régionaux. Pour ceux qui sont adjacents, il arrive qu'il y ait une invasion importante de la capsule par les BAAR (Fig. 31).

On observe souvent une nécrose marquée du parenchyme avec destruction du tissu lymphoïde cortical (Fig. 32).

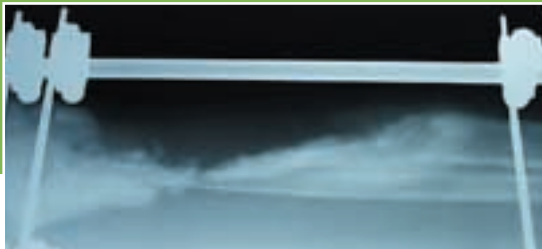
Dans ce cas, il arrive que le ganglion soit entièrement envahi par les BAAR. Les ganglions lymphatiques régionaux cependant peuvent présenter une histiocytose sinusoidale. On observe rarement de modifications granulomateuses et des BAAR dans les ganglions régionaux.



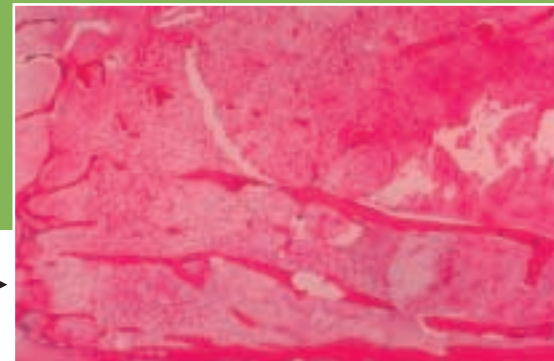
◀ **Figure 31**  
Adénopathie associée à un ulcère de Buruli. Le parenchyme du ganglion est nécrosé et fortement envahi de BAAR. ZN x 100



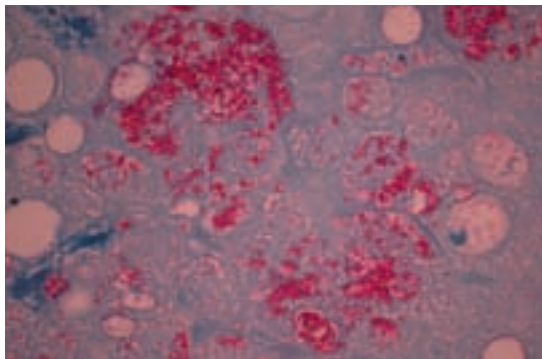
**Figure 32 ▶**  
Adénite nécrosante d'un ganglion lymphatique à proximité d'un ulcère de Buruli. Le centre est détruit et il ne reste que des traces du tissu lymphoïde cortical. Les colorations ZN de coupes parallèles mettent en évidence de nombreux BAAR. H & E x 5



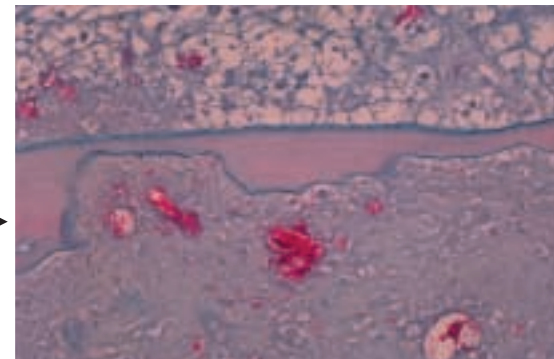
◀ **Figure 33**  
Radiographie de la jambe mettant en évidence la destruction de l'os. A noter : le patient souffrait d'un ulcère de Buruli au-dessus de la zone atteinte.



**Figure 34 ▶**  
Ostéomyélite du tibia avec nécrose de la moelle et érosion de la travée osseuse. H & E x 2,5



◀ **Figure 35**  
Ostéomyélite du tibia avec des amas de BAAR dans la moelle nécrosée. ZN x 50



**Figure 36 ▶**  
Ostéomyélite du tibia avec nécrose de la moelle et une travée osseuse en voie de dissolution dans la zone des BAAR. Coloration ZN x 100

### **Modifications de l'os**

L'os peut être atteint par contamination directe à partir d'une lésion dans les tissus supérieurs, ou à partir de lésions connues distantes, probablement par propagation hématogène de *M. ulcerans* (Fig. 33).

A l'histopathologie, une nécrose étendue de la moelle et une érosion de la travée osseuse apparaissent (Fig. 34). On constate la présence de BAAR en nombre variable, le plus souvent dans la moelle nécrosée (Fig. 35 et 36).

Bien que certaines lésions semblent exclusivement être le résultat de la présence de *M. ulcerans* dans l'os, environ 50% sont surinfectées par des micro-organismes pyogènes, streptocoques, staphylocoques ou corynébactéries par exemple. Dans ce cas, on observe une suppuration et ces agents apparaissent à la coloration de Gram. Des granulomes bien formés peuvent se développer et produire une ostéomyélite chronique, probablement causée par *M. ulcerans*.

### **Commentaire – Patient souffrant d'une forme envahissante de la maladie**

Les patients souffrant de lésions œdémateuses agressives atteignant de grandes parties du corps présentent souvent des œdèmes étendus et des troubles de la fonction rénale ou d'autres symptômes évoquant une atteinte viscérale. Ils meurent parfois assez rapidement au début de l'évolution de la maladie. Certaines autorités soupçonnent un effet systémique de la toxine pour expliquer ces événements mais, pour résoudre cette question, il faudra sans doute intensifier les efforts pour étudier la physiopathologie de ces formes cliniques chez le malade et les échantillons provenant des autopsies.

## OBSERVATIONS SUR L'INTERPRETATION DES ANALYSES DE LABORATOIRE

Comme pour toutes les analyses de laboratoire, les résultats dépendent de la qualité et de la livraison rapide des échantillons. Il ne faut donc pas s'empresse de conclure qu'un patient n'a pas l'ulcère de Buruli, même si tous les tests sont négatifs. De telles situations se produisent si les biopsies ou les écouvillonnages sont pratiqués sur des zones où le micro-organisme est absent, ou bien si le transport dure longtemps.

Par exemple, dans une série de cas, on a établi que 500 patients souffraient d'ulcère de Buruli en faisant appel à une définition stricte, c'est-à-dire qu'ils avaient donné un résultat positif à deux des épreuves suivantes : culture, PCR, histologie ou ZN. Prises séparément, ces méthodes de diagnostic avaient les sensibilités suivantes : ZN, de 40 à 80% ; culture, de 20 à 60% ; histologie, supérieure à 90% ; PCR, supérieure à 90%. La coloration ZN et la culture en particulier dépendent du type de la lésion clinique. Par exemple la sensibilité de ZN pour les nodules étaient de 40%, pour les ulcères de 60% et pour les plaques de 80%. En culture, les échantillons osseux ne sont positifs que dans 20% des cas, les ulcères dans 50% des cas et les plaques dans 60% des cas. On peut améliorer la sensibilité de la culture par un passage initial sur la souris (jusqu'à 75%). Il est donc clair qu'il ne faut ni exclure le diagnostic, ni conclure à un ulcère de Buruli au vu d'une seule épreuve de laboratoire.

Bien qu'ils soient rares, on a obtenu des faux positifs à la coloration ZN, à la PCR ou même à la culture. Si les résultats du laboratoire ne correspondent pas au tableau clinique, ou s'ils sont mis en question par le clinicien, il convient de répéter les tests avec de nouveaux échantillons qui viennent d'être prélevés.

Il faut de préférence étudier les résultats obtenus par plusieurs méthodes et pour de multiples échantillons. Dans la pratique cependant, en zone d'endémie, le tableau clinique permet aux cliniciens expérimentés de poser couramment un diagnostic présomptif exact, seul ou associé à l'examen d'un frottis coloré selon la méthode de Ziehl-Neelsen.

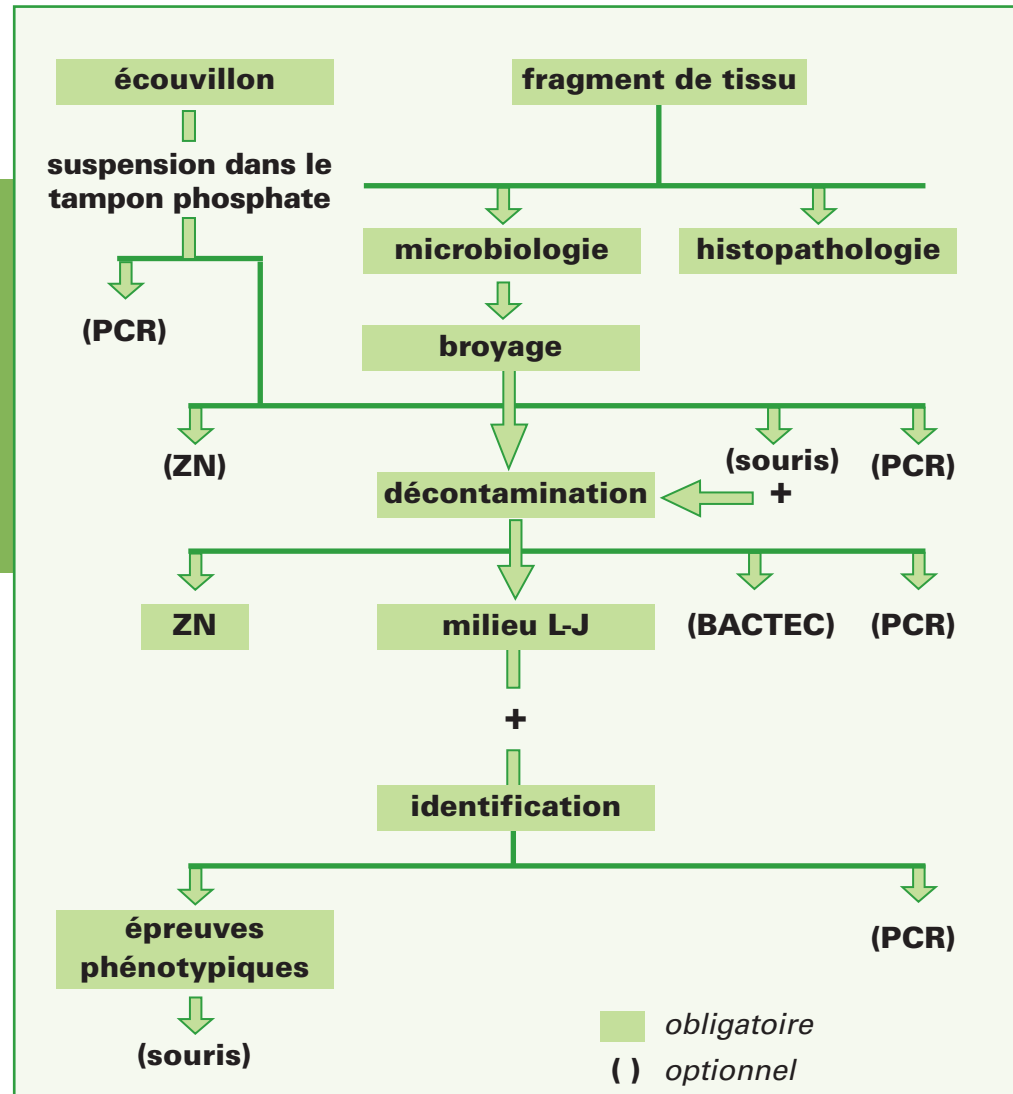
# Annexes



Crédit: WHO

Diagramme pour le diagnostic de laboratoire | Demande d'examens de laboratoire | Rapport d'analyses du laboratoire  
Préparation des milieux de culture | Techniques de coloration en microbiologie | Techniques de coloration en histopathologie |  
Méthodes de décontamination | Culture de *M. ulcerans* en BACTEC 460 TB | Epreuves de biochimie et de culture utilisées pour  
l'identification des mycobactéries à croissance lente | Protocole de l'amplification génique (PCR) | Adresses des fabricants |  
Travail de l'OMS dans le domaine de l'ulcère de Buruli | Quelques instituts de recherche engagés dans des travaux sur l'ulcère  
de Buruli | Quelques organisations non gouvernementales et autres engagées dans la lutte contre l'ulcère de Buruli (partenaires  
actuels) | Membres du Groupe consultatif de l'OMS sur l'ulcère de Buruli | Bibliographie conseillée

# 1 Diagramme pour le diagnostic de laboratoire de la maladie causée par *M. ulcerans*



## 2 Demande d'examens de laboratoire

### A. Renseignements sur l'établissement

1. Nom et adresse de l'établissement.....
2. Sous-district ..... District ..... Région ..... Pays .....
3. Nom et prénom du responsable remplissant le formulaire ..... 4. Titre ..... Spécialité .....

### B. Renseignements sur le patient

- Numéro d'identification du patient .....
5. N° d'identification de l'établissement ..... Date d'admission (j/m/a) .....
6. Nom et prénom ..... 7. Age ..... (mois/ans) 8. Sexe  M  F
9. Adresse .....
10. Profession .....
11. Brève description de la lésion ..... 12. Localisation de la première lésion .....
13. Liste des contacts familiaux.....
14. Classification du patient Nouveau cas  Rechute  Même site   
Site différent

### C. Localisation de la (des) lésion(s)

15. *Membre supérieur* Droit  Gauche  Abdomen  Dos  Fesses, périnée
- Membre inférieur* Droit  Gauche  Thorax  Tête, cou

### D. Présentation clinique

16. Foyer unique
- Forme évolutive*  Nodule  Papule  Plaque  Œdème  Ulcère  Ostéomyélite
- Forme inactive*  Cicatrice  Amputation Autres, préciser .....

## 17. Foyers multiples (veuillez indiquer la localisation de chaque forme clinique)

Location des lésions	Forme clinique
a. ....	.....
b. ....	.....
c. ....	.....
d. ....	.....
e. ....	.....
f. ....	.....

**E. Echantillon envoyé au laboratoire pour diagnostic****Renseignements sur l'établissement**

- a. Nom et adresse de l'établissement.....
- b. Sous-district ..... District ..... Région ..... Pays .....
- c. Nom et prénom du responsable remplissant le formulaire .....
- d. Titre ..... Spécialité .....

**Numéro de l'échantillon au laboratoire**

18. Site de prélèvement.....
19. Nature de l'échantillon .....
20. Milieu de transport .....
21. Conditions de transport .....
22. Date et heure du prélèvement .....

**F. Tests demandés**ZN Culture PCR Histopathologie 

Date de réception au laboratoire (j/m/a) ..... Heure .....

Nom du responsable ..... Signature .....



### 3 Rapport d'analyses du laboratoire

<b>Résumé des résultats</b>	ZN	Culture	PCR on specimen	Histopathologie
<b>Positif</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>Négatif</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

---

<b>Résultats détaillés</b>	ZN	
<b>Positif</b>	<input type="checkbox"/>	Echelle .....
<b>Négatif</b>	<input type="checkbox"/>	Résultats .....
	Culture	
<b>Positif</b>	<input type="checkbox"/>	Temps écoulé entre l'ensemencement et la première culture primaire positive
<b>Négatif</b>	<input type="checkbox"/>	Espèces isolées .....
	PCR sur l'échantillon	
<b>Positif</b>	<input type="checkbox"/>	Observations .....
<b>Négatif</b>	<input type="checkbox"/>	
	Histopathologie	
<b>Positif</b>	<input type="checkbox"/>	Voir rapport joint .....
<b>Négatif</b>	<input type="checkbox"/>	Observations .....

Signature du microbiologiste/du technicien ..... Date (j/m/a) .....

## 4 Préparation des milieux de culture

### *Milieu de Löwenstein-Jensen (L-J)*

Trois groupes de composants, préparés séparément, sont additionnés pour obtenir ce milieu :

1. La solution de sels minéraux
2. La solution de vert malachite
3. Les œufs entiers homogénéisés

#### • Solution de sels minéraux

– phosphate monopotassique anhydre (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2,40 g
– sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0,24 g
– citrate de magnésium	0,60 g
– asparagine	3,60 g
– glycérol	12 ml
– eau distillée	600 ml

Dissoudre dans l'eau distillée les composants dans l'ordre donné ci-dessus en chauffant. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 30 minutes. Laisser refroidir à température ambiante. Cette solution se conserve indéfiniment et les quantités adaptées peuvent être gardées au réfrigérateur.

#### • Solution de vert malachite

– vert malachite	2 g
– eau distillée stérile	100 ml

Dans des conditions d'asepsie, dissoudre le colorant dans l'eau distillée stérile en mettant la solution dans un incubateur pendant 1 à 2 heures. On ne peut pas conserver cette solution en raison du risque de formation d'un précipité ou d'une atténuation de la couleur. Dans les deux cas, il faut la jeter et en préparer une nouvelle.

#### • Œufs entiers homogénéisés

Prendre des œufs de poule frais de moins de sept jours. Les nettoyer en les brossant soigneusement à l'eau chaude avec un savon alcalin. Laisser tremper les œufs 30 minutes dans la solution savonneuse. Les rincer soigneusement, puis les immerger 15 minutes dans de l'alcool à 70%. Ne pas oublier de se laver les mains avant de manipuler les œufs propres et secs. Casser les œufs avec une lame stérile dans un récipient stérile, puis les battre avec un fouet ou un mixeur stérile.

#### Préparation du milieu final

– solution de sels minéraux	600 ml
– solution de vert malachite	20 ml
– œufs homogénéisés (20 à 25 selon la taille)	1000 ml

Le milieu complet avec les œufs est réparti à raison de 6 à 8 ml dans des flacons de McCartney de 14 ou 28 ml stériles ou de 20 ml dans des tubes à bouchon à vis de 20 x 150 mm hermétiquement fermés. Mettre le milieu à coaguler (voir ci-dessous) dans les 15 minutes qui suivent la répartition dans les tubes ou flacons de façon à éviter la sédimentation des éléments les plus lourds.

#### **Coagulation du milieu (épaississement)**

Avant de mettre les flacons à coaguler, préchauffer l'appareil à 80 °C de façon à faire monter plus vite la température. Mettre les récipients en position inclinée et les laisser coaguler à 80–85 °C pendant 45 minutes. Il ne faut pas chauffer de nouveau le milieu. La qualité des milieux à l'œuf se dégrade après coagulation s'ils sont conservés à une température trop élevée ou trop longtemps. Des décolorations éventuelles peuvent être le signe d'une température excessive. L'apparition de trous ou de bulles en surface indique également des problèmes dans le processus de coagulation.

Éliminer les milieux de mauvaise qualité.

#### **Vérification de la stérilité**

Après coagulation et pour vérifier la stérilité, l'ensemble du lot ou un échantillon représentatif de flacons ou tubes est mis à incuber à 35–37 °C pendant 24 heures.

#### **Conservation**

Il arrive parfois que les œufs contiennent des antibiotiques inhibant la croissance des mycobactéries. Il faut donc en connaître l'origine pour contrôler leur qualité. Le milieu doit être daté, puis il peut être conservé au réfrigérateur pendant plusieurs semaines, dans des flacons ou tubes hermétiquement bouchés de façon à éviter la dessiccation. On obtient un résultat optimal pour l'isolement des mycobactéries avec un milieu L-J qui n'a pas été gardé plus de 4 semaines.

#### **Milieu gélosé 7H10 et 7H11 de Middlebrook**

On peut préparer le 7H10 de Middlebrook à partir des ingrédients de base ou à partir de la gélose 7H10 en poudre enrichie en acide oléique-albumine-dextrose-catalase (OADC) de Middlebrook que l'on trouve dans le commerce. Le 7H11 est un 7H10 enrichi par l'addition de caséine hydrolysée par des enzymes. Il vaut mieux préparer les milieux 7H10 et 7H11 en petites quantités, de 200 à 400 ml, afin de réduire la chaleur nécessaire pour faire fondre la gélose. Il faut éviter de faire bouillir le milieu de base avant de le passer à l'autoclave (soit pour solubiliser la gélose, soit pour disposer de réserves susceptibles d'être conservées et bouillies ultérieurement) car les chauffages successifs compromettent la qualité du milieu.

Lorsqu'on utilise les milieux 7H10 ou 7H11 de Middlebrook pour isoler les mycobactéries, il faut les mettre à incuber en atmosphère microaérophile (2,5 à 5,0 % d'oxygène). L'exposition de la gélose 7H10 ou 7H11 de Middlebrook à la lumière ou à la chaleur peut entraîner le dégagement de formaldéhyde en quantité suffisante pour atteindre des concentrations inhibant la croissance des mycobactéries.

## 5 Techniques de coloration en microbiologie

### *Coloration de Ziehl-Neelsen (ZN)*

Les réactifs décrits ci-dessous sont strictement réservés à la méthode de Ziehl-Neelsen à chaud. La méthode à chaud est supérieure aux méthodes à froid, comme la coloration de Kinyoun. Les concentrations recommandées diffèrent légèrement de celles que l'on trouve couramment dans les manuels. La concentration en fuchsine est légèrement augmentée et celle en bleu de méthylène diminuée, de façon à obtenir le meilleur contraste possible (bacilles d'un rouge prononcé sur fond bleu pâle). D'autres concentrations et les méthodes à froid peuvent donner des résultats satisfaisants dans des conditions par ailleurs optimales. Néanmoins, lorsque ces autres conditions ne sont pas optimales (microscope, lumière, expérience du technicien), nous recommandons fortement les concentrations données ci-dessous et la technique à chaud pour obtenir un meilleur contraste.

#### RÉACTIFS

##### • Fuchsine

- |                                        |                   |
|----------------------------------------|-------------------|
| – fuchsine basique                     | 10 g              |
| – éthanol à 95% (qualité technique)    | 100 ml            |
| – dissoudre la fuchsine dans l'éthanol | <b>Solution 1</b> |

##### • Phénol

- |                                               |                   |
|-----------------------------------------------|-------------------|
| – phénol en cristaux                          | 5 g               |
| – eau distillée                               | 85 ml             |
| – dissoudre les cristaux de phénol dans l'eau | <b>Solution 2</b> |

Mélanger 10 ml de la **solution 1** à 90 ml de la **solution 2** et conserver dans un flacon en verre teinté et hermétiquement bouché. Etiqueter la bouteille en indiquant le nom du réactif avec les dates de préparation et d'expiration. La conservation à température ambiante est d'au moins 12 mois. Filtrer à l'avance ou extemporanément.

##### • Solution de décoloration

- |                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| – acide chlorhydrique concentré | 3 ml  |
| – éthanol à 70%                 | 97 ml |

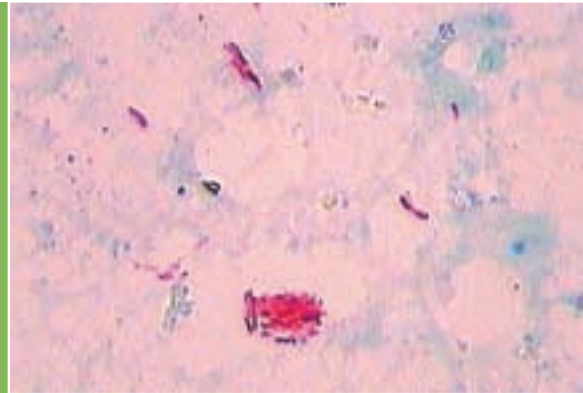
Ajouter avec précaution l'acide chlorhydrique à l'éthanol. Il faut toujours verser doucement l'acide dans l'alcool et non l'inverse. Conserver dans un flacon en verre teinté. Etiqueter la bouteille en indiquant le nom du réactif avec les dates de préparation et d'expiration. Conservation illimitée à température ambiante.

**Colorant de contraste**

- chlorure de bleu de méthylène 0,1 g
- eau distillée 100 ml

Dissoudre le bleu de méthylène dans l'eau distillée dans un flacon en verre teinté et hermétiquement bouché. Etiqueter la bouteille en indiquant le nom du réactif avec les dates de préparation et d'expiration. La conservation à température ambiante est d'au moins 12 mois.

**Figure 37** ►  
Coloration ZN d'un frottis prélevé sur un ulcère de Buruli. Les BAAR extracellulaires apparaissent en rouge sur fond bleu

**Méthode**

1. Placer des lots de lames numérotées (12 max.) sur des portoirs. Veiller à ce que les lames ne se touchent pas.
2. Recouvrir tout le frottis de fuchsine phéniquée de ZN, filtrée avant emploi ; le plus simple pour ce faire est de verser le colorant sur la lame au moyen d'un entonnoir avec un papier filtre.
3. Chauffer doucement la lame 3 fois jusqu'à ce que des vapeurs s'en dégagent. Le colorant ne doit ni sécher, ni bouillir à aucun moment. Ce temps de coloration dure 10 minutes.
4. Rincer doucement à l'eau courante jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de colorant libre sur la lame.
5. Verser sur la lame la solution de décoloration et laisser 3 minutes en contact.
6. Rincer soigneusement la lame à l'eau. Eliminer l'excès d'eau sur la lame.
7. Recommencer les étapes 5 et 6 si le frottis est resté trop rouge.
8. Verser le colorant de contraste.
9. Laisser en contact au maximum 60 secondes. S'il n'a pas été possible de décolorer suffisamment la lame, on peut laisser le colorant de contraste un peu plus longtemps.
10. Rincer soigneusement la lame à l'eau. Eliminer l'eau en excès.
11. Laisser les frottis sécher à l'air. Ne pas employer de buvard. Garder les lames à l'abri de la lumière solaire directe et les examiner le plus rapidement possible.

**Echelle de cotation**

Nombre de BAAR observés en moyenne	Nombre de champs à examiner	Résultat
Nombre de BAAR/100 champs à immersion	100	Nombre de BAAR observés
1-9 BAAR/100 champs à immersion*	100	Noter le nombre exact
10-99 BAAR/100 champs à immersion	100	+
1-10 BAAR par champ à immersion	50	++
> 10 BAAR par champ à immersion	20	+++

*\*Un résultat inférieur à 3 bacilles pour 100 champs risque de ne pas être suivi de la positivité de la culture mais doit être signalé.*

**Coloration au fluorochrome****RÉACTIFS****Auramine O**

- auramine en poudre 0,1 g
- éthanol à 95 % (qualité technique) 10 ml
- dissoudre l'auramine dans l'éthanol **Solution 1**

**N.B.** L'auramine étant cancérigène, il faut éviter le contact direct avec la peau.

**Phénol**

- phénol en cristaux 3,0 g
- eau distillée 87 ml
- dissoudre les cristaux de phénol dans l'eau **Solution 2**

Mélanger les **solutions 1 et 2** dans un flacon en verre teinté et hermétiquement bouché à l'abri de la chaleur et de la lumière. Ne pas utiliser après 3 mois. On observe habituellement la formation d'un précipité qui n'est cependant pas un signe de dégradation ; il faut néanmoins filtrer la solution avant de l'employer pour les colorations.

**Solution de décoloration**

- acide chlorhydrique concentré 0,5 ml
- éthanol à 70% (qualité technique) 100 ml

Ajouter avec précaution l'acide chlorhydrique concentré à l'éthanol. Il faut toujours verser lentement l'acide dans l'alcool et non l'inverse. Conserver dans un flacon en verre teinté. Etiqueter la bouteille en indiquant le nom du réactif et la date de préparation. Conservation illimitée.

**Figure 38** ▶  
Fluorochrome stained smear showing  
AFB as bright yellow rods against  
a dark background

**Colorant de contraste**

- permanganate de potassium (KMnO<sub>4</sub>) 0,5 g
- eau distillée 100 ml

Dissoudre le permanganate de potassium dans l'eau distillée dans un flacon en verre teinté et hermétiquement bouché. Etiqueter la bouteille en indiquant le nom du réactif avec les dates de préparation et d'expiration. Conservation à température ambiante de 3 mois au maximum.

Le permanganate de potassium à 0,5% décrit ci-dessus tend à donner un fond très sombre, ce qui rend difficile la mise au point sur le frottis. Cette inconvénient est atténué à de plus faibles concentrations, mais ces solutions plus faibles sont alors instables et elles ne sont utilisées que par peu de laboratoires.

**Méthode**

Préparer des frottis relativement épais à partir de spécimens de biopsie homogénéisés. Ces frottis sont plus facile à examiner car le fond est plus visible.

1. Placer les frottis numérotés sur des portoirs par lots de 12 au maximum. Veiller à ce que les lames ne se touchent pas.
2. Recouvrir tout le frottis d'auramine O, à l'aide d'un entonnoir muni d'un papier-filtre Whatman #1. Laisser en contact 15 minutes en veillant à ce que la solution reste bien sur les frottis.  
*Ne pas chauffer !*
3. Rincer à l'eau puis éliminer le liquide. On recommande habituellement l'eau distillée mais il risque souvent de ne pas y en avoir sur le terrain. L'expérience de certains laboratoires a montré que l'eau du robinet donnait toujours satisfaction. L'eau déchlorée (en l'exposant à l'air libre pendant 24 heures) représente une autre possibilité.
4. Décolorer pendant 2 minutes avec la solution d'acide-éthanol à 0,5%.
5. Rincer à l'eau et éliminer le liquide.
6. Recouvrir les frottis de colorant de contraste pendant 2 minutes. Il est essentiel de respecter ce temps, car un contact plus long risque d'altérer la fluorescence des BAAR.
7. Rincer à l'eau et éliminer le liquide.
8. Laisser les frottis sécher à l'air. Ne pas utiliser de buvard. Examiner les lames le plus rapidement possible et les garder dans l'obscurité (c'est-à-dire dans une boîte fermée).

**Echelle de cotation (voir celle pour la coloration ZN)**

<b>Grossissement du microscope à fluorescence</b>	200 ou 250x	400x	630x
<b>Numération des BAAR</b>	Diviser le nombre observé par 10	Diviser le nombre observé par 4	Diviser le nombre observé par 2

Pour tenir compte des différences de grossissement du microscope à fluorescence, diviser le nombre de micro-organismes observés par le facteur indiqué dans le tableau, puis comparer avec l'échelle de cotation donnée pour la coloration ZN afin d'obtenir le résultat à notifier.



## 6 Techniques de coloration en histopathologie

*D'après le document technique SOP 5.47 de l'Institut de Pathologie des forces armées, Washington DC (Etats-Unis d'Amérique).*

### 1. Méthode de Harris à l'hématoxyline-éosine (H & E) (sans mercure)

**N.B.** On obtient avec cette méthode une coloration des éléments tissulaires et des bactéries bien plus intense qu'avec toute autre méthode. De plus, l'utilisation de permanganate de potassium à la place des sels de mercure est beaucoup moins dangereuse pour l'environnement comme pour la personne.

Cette méthode convient pour les échantillons fixés dans une solution tamponnée de formol à 10% et pour des coupes de tissu de 4 à 6 µm d'épaisseur. Le tissu témoin doit renfermer des noyaux, des structures cytoplasmiques, du tissu conjonctif et, si possible, des bactéries.

#### SOLUTIONS

##### • Hématoxyline de Harris

- |                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| – alun de potassium ou d'ammonium | 100 g  |
| – eau distillée                   | 500 ml |

Dissoudre à la chaleur. Dans un récipient séparé, mélanger :

- |                            |        |
|----------------------------|--------|
| – hématoxyline en cristaux | 5 g    |
| – alcool absolu            | 50 ml  |
| – eau distillée            | 250 ml |

Dissoudre (éventuellement à la chaleur) et ajouter :

- |                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| – permanganate de potassium à 0,25% | 250 ml |
|-------------------------------------|--------|

Laisser reposer 3 minutes en remuant puis mélanger cette solution avec la précédente. Refroidir à l'eau courante, puis ajouter 20 ml d'acide acétique glacial (à 100%). Filtrer avant usage.

##### • Acide-alcool à 1%

- |                                 |          |
|---------------------------------|----------|
| – 95% ethanol                   | 736 ml   |
| – eau désionisée                | 263,2 ml |
| – acide chlorhydrique concentré | 10 ml    |

##### • Eau ammoniacuée

- |                              |         |
|------------------------------|---------|
| – eau désionisée             | 1000 ml |
| – hydroxyde d'ammonium à 28% | 4 ml    |

##### • Solution-mère d'éosine à 1 %

- |                         |        |
|-------------------------|--------|
| – éosine Y hydrosoluble | 1 g    |
| – eau désionisée        | 100 ml |

• **Solution-mère de phloxine à 1%**

- phloxine B
- eau désionisée

1 g  
100 ml

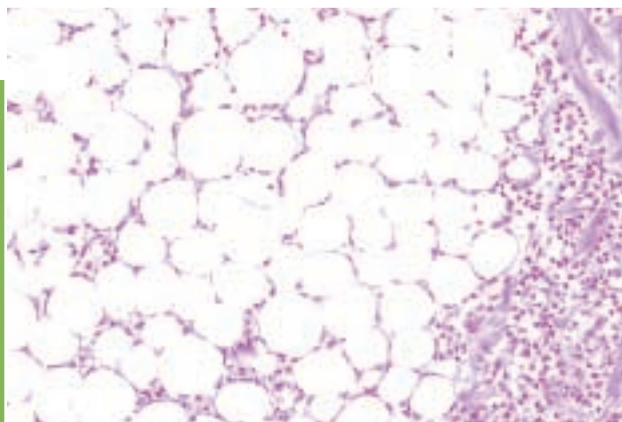
• **Solution de phloxine-éosine**

Mélanger les composants suivants :

Figure 39 ►

Panniculite visible sur une coupe de tissu prélevé sur un ulcère de Buruli et coloré selon la méthode à l'hématoxyline-éosine

N.B. les noyaux des cellules apparaissent bleu et le tissu conjonctif en rose



- solution-mère d'éosine
- solution-mère de phloxine
- éthanol à 95%
- acide acétique glacial

100 ml  
10 ml  
780 ml  
4 ml

Cette solution se conserve une semaine environ.

**Mode opératoire**

1. Déparaffiner les lames et les hydrater.
2. Colorer pendant 10 minutes avec la solution de Harris à l'hématoxyline fraîchement filtrée.
3. Laver à l'eau chaude du robinet pendant 5 minutes.
4. Tremper deux fois dans l'acide-alcool à 1% pour obtenir la différenciation.
5. Stopper la différenciation en trempant l'échantillon dans de l'eau chaude du robinet puis dans une eau faiblement ammoniaquée ou saturée en carbonate de lithium jusqu'à ce que la coupe de tissu commence à prendre une teinte d'un bleu éclatant.
6. Laver à l'eau courante chaude pendant 10 minutes.

**Note:** si la coloration du noyau est trop pâle, reprendre à l'étape n° 2. Si le fond n'est pas clair, reprendre à l'étape n° 4 mais en ne trempant la lame qu'une seule fois et rapidement dans la solution d'acide-éthanol.

7. Appliquer le colorant de fond de phloxine-éosine pendant 2 minutes.
8. Déshydrater puis éclaircir à l'éthanol à 95 à l'alcool absolu et au xylène successivement deux fois.  
Les lames doivent rester à chaque fois deux minutes dans ces réactifs.
9. Monter à la résine.

## 2. Méthode de Ziehl-Neelsen (ZN) pour les germes acido-alcoolorésistants

*D'après le document technique SOP 5.23 de l'Institut de Pathologie des forces armées, Washington DC (Etats-Unis d'Amérique).*

**Note:** On met en œuvre cette méthode pour établir la présence de micro-organismes acido-alcoolorésistants autres que *Nocardia* sp. ou le bacille de la lèpre. Elle s'applique à des échantillons fixés par une solution tamponnée de formol à 10% et à des coupes de 4 à 6 µm de diamètre. Les échantillons témoins devraient être des coupes contenant *M. tuberculosis* ou *M. ulcerans*.

### SOLUTIONS

#### • Solution de fuchsine phéniquée de ZN

– phénol (cristaux fondus)	25 ml
– alcool absolu	50 ml
– fuchsine basique	5 g
– eau désionisée	500 ml

Conserver dans un endroit chaud mais ouvert pour garder la solution à l'état liquide.

#### • Acide-alcool

– éthanol à 70%	100 ml
– acide chlorhydrique concentré	1 ml

#### • Solution de bleu de méthylène

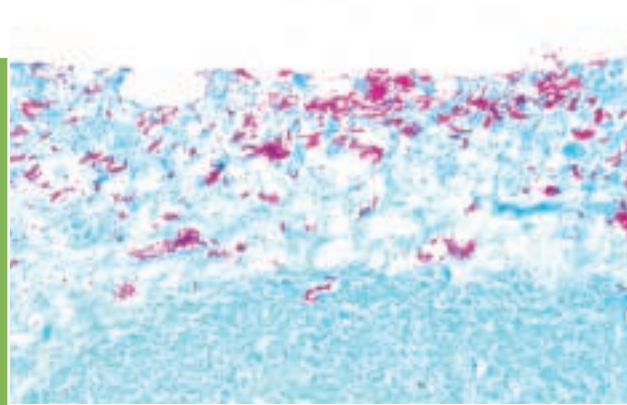
– cristaux de bleu de méthylène	3 g
– eau désionisée	600 ml

**Mode opératoire**

1. Déparaffiner et hydrater avec de l'eau désionisée.
2. Appliquer la solution de fuchsine phéniquée pendant 30 minutes.

**N.B.** Si les germes ne prennent pas la coloration, préparer une nouvelle solution de colorant.

**Figure 40 ►**  
 Dans la coupe d'un ganglion lymphatique provenant d'un patient atteint de l'ulcère de Buruli, la coloration ZN fait apparaître les BAAR en rouge sur le fond tissulaire en bleu.



3. Laver à l'eau froide du robinet pendant 10 minutes.

**N.B.** Si l'eau du robinet est chlorée, laver moins longtemps

4. Différencier les lames séparément à l'acide-alcool.
5. Laver à l'eau courante pendant 3 minutes.
6. Procéder à la coloration du fond en trempant séparément chaque lame dans la solution de bleu de méthylène, puis rincer à l'eau courante.
7. Déshydrater et éclaircir à l'éthanol à 95%, l'alcool absolu et le xylène successivement deux fois.
8. Monter à la résine :
  - BAAR : .....rouge
  - Fond : .....bleu

### 3. Méthode de Grocott pour les champignons

D'après le document technique SOP 5.10 de l'Institut de Pathologie des forces armées, Washington DC (Etats-Unis d'Amérique).

**N.B.** On met en œuvre cette méthode pour établir la présence de toutes sortes de champignons et certaines bactéries; toutefois, *Histoplasma capsulatum* et *Nocardia asteroides* peuvent demander une exposition prolongée à la solution de méthénamine argentique. La méthode s'applique à des échantillons fixés par une solution tamponnée de formol à 10% et à des coupes de tissu de 4 à 6 µm de diamètre. Les tissus témoins doivent provenir d'une mycose connue et renfermer des éléments fongiques ; il ne faut pas prendre des tissus provenant d'une histoplasmose ou d'une nocardiose.

#### SOLUTIONS

- **Acide chromique à 4%**

– trioxyde de chrome (attention : irritant)	4 g
– eau distillée	100 ml

- **Nitrate d'argent à 5%**

– nitrate d'argent	5 g
– eau distillée	100 ml

- **Méthénamine\* à 3%**

– méthénamine	30 g
– eau distillée	1000 ml

- **Métabisulfite de sodium à 1%**

– métabisulfite de sodium	1 g
– eau distillée	100 ml

- **Chlorure d'or à 1%**

– chlorure d'or jaune	5 g
– eau stérile	500 ml

- **Chlorure d'or à 0,1%**

– chlorure d'or à 1%	10 ml
– eau stérile	90 ml

- **Thiosulfate de sodium à 2%**

– thiosulfate de sodium	2 g
– eau stérile	100 ml

\* (synonymes : hexaméthylènetétramine, hexamine, hexaméthylénamine)

• **Solution-mère de méthénamine-nitrate d'argent**

- |                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| – Solution de nitrate d'argent à 5% | 50 ml   |
| – Solution de méthénamine à 3%      | 1000 ml |

**N.B.** On observe la formation immédiate d'un précipité blanc qui se dissout en remuant. La solution limpide se conserve pendant plusieurs mois au réfrigérateur

• **Borate de soude à 5%**

- |                   |         |
|-------------------|---------|
| – borate de soude | 50 g    |
| – eau distillée   | 1000 ml |

• **Solution de travail de méthénamine-nitrate d'argent**

**N.B.** En préparer extemporanément pour chaque lot de tissus.

- |                                                 |       |
|-------------------------------------------------|-------|
| – solution-mère de méthénamine nitrate d'argent | 25 ml |
| – eau distillée                                 | 25 ml |
| – solution de borate de soude à 5%              | 2 ml  |

• **Solution-mère de vert lumière J à 0,2%**

- |                                |        |
|--------------------------------|--------|
| – vert lumière J (C.I. #42095) | 0,2 g  |
| – eau distillée                | 100 ml |
| – acide acétique glacial       | 0,2 ml |

• **Solution de travail de vert lumière J**

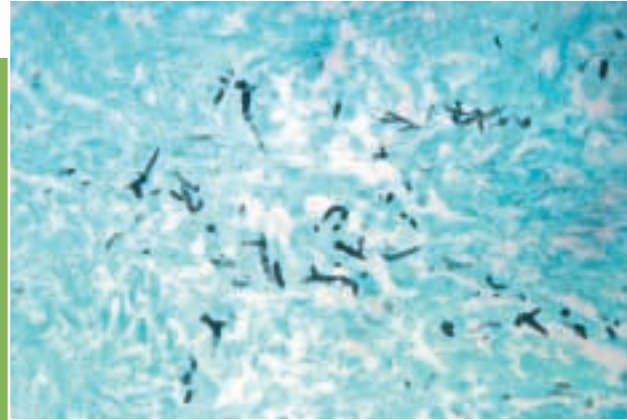
- |                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| – solution-mère de vert lumière | 10 ml |
| – eau distillée                 | 50 ml |

**Mode opératoire :**

1. Déparaffiner et hydrater à l'eau distillée.
2. Oxyder dans la solution d'acide chromique à 4% pendant une heure.
3. Laver à l'eau du robinet pendant au moins 20 minutes. Les lames doivent être incolores.
4. Procéder à une réduction avec le métabisulfite de sodium à 1% pour éliminer les chromates résiduels.
5. Laver à l'eau du robinet pendant 5 minutes.
6. Rincer dans six bains successifs d'eau distillée.
7. Mettre dans la solution de méthénamine-nitrate d'argent préparée extemporanément et à l'incubateur à 60 °C pendant 60 à 70 minutes ou jusqu'à ce que les coupes deviennent brunes (de la couleur du pain grillé). Vérifier au microscope.

8. Rincer dans six bains successifs d'eau distillée.
9. Appliquer la solution de chlorure d'or à 0,1% pendant 1 à 5 minutes. Vérifier au microscope : les champignons doivent apparaître noirs sur fond rose à gris.
10. Rincer à l'eau distillée.

**Figure 41** ▶  
Coupe histologique d'une  
phaeosporotrichose. On observe des  
filaments noirs produits par l'agent  
causal, *Phialophora repens*.



11. Eliminer l'argent qui n'a pas réagi en mettant les lames 2 à 5 minutes dans la solution de thiosulfate de sodium à 2%.
12. Laver soigneusement à l'eau du robinet.
13. Colorer le fond avec la solution-mère de vert lumière pendant 4 minutes.
14. Rincer à l'eau distillée.
15. Déshydrater, éclaircir et monter à la résine.

#### 4. Méthodes de Brown-Hopps pour les bactéries Gram-positives et négatives

*D'après le document technique SOP 5.4 de l'Institut de Pathologie des forces armées, Washington DC (Etats-Unis d'Amérique).*

**N.B.** Cette méthode, qui permet de mettre en évidence de nombreuses bactéries Gram positives et la plupart des Gram-négatives s'applique à des échantillons fixés par une solution tamponnée de formol à 10% et à des coupes de tissu de 4 à 6 µm de diamètre. Les tissus témoins doivent renfermer des germes Gram-positifs et négatifs et les meilleurs proviennent souvent des appendicites.

#### SOLUTIONS

##### • Cristal violet

- |                  |        |
|------------------|--------|
| – cristal violet | 1 g    |
| – eau désionisée | 100 ml |

##### • Solution d'iode de Gram

- |                       |      |
|-----------------------|------|
| – iode (cristaux)     | 1 g  |
| – iodure de potassium | 2 g  |
| – eau désionisée      | 5 ml |

Après dissolution complète de l'iode et de l'iodure de potassium, rajouter 295 ml d'eau désionisée.

##### • Fuchsine basique à 1%

- |                  |        |
|------------------|--------|
| – fuchsine base  | 1 g    |
| – eau désionisée | 100 ml |

##### • Solution de Gallego

- |                               |        |
|-------------------------------|--------|
| – eau désionisée              | 100 ml |
| – formol concentré (37 à 40%) | 2 ml   |
| – acétique glacial            | 1 ml   |

##### • Acide picrique-acétone

- |                                         |        |
|-----------------------------------------|--------|
| – acide picrique (sec, voir ci-dessous) | 0,05 g |
| – acétone (déshydratée)                 | 500 ml |

**N.B.** Pour sécher l'acide picrique : placer une couche d'acide humide (plus que la quantité nécessaire) de moins de 2 mm d'épaisseur entre quatre grande feuilles de papier filtre (deux en dessous et deux au-dessus). Exprimer autant d'eau que possible en faisant rouler une bouteille ou tout autre objet rond sur le papier filtre. On peut alors peser l'acide picrique. Remettre le reste dans le flacon d'origine. Utiliser immédiatement l'acide qui vient d'être pesé. Avant de le jeter, rincer le papier filtre à l'eau courante jusqu'à ce que toute trace de couleur jaune ait disparu. Il faut toujours garder les cristaux d'acide picrique dans l'eau pour éviter une explosion.

##### • Acétone-xylène

- |           |        |
|-----------|--------|
| – acétone | 100 ml |
| – xylène  | 100 ml |



**Mode opératoire :**

1. Déparaffiner et hydrater à l'alcool à 95%.  
**N.B.** On utilise un portoir horizontal pour les étapes 2 à 8 et des bacs de coloration pour les étapes suivantes.
2. Mettre 15 à 20 gouttes de cristal violet à 1% sur chaque lame. Laisser en contact 1 à 2 minutes. Remuer doucement.
3. Rincer à l'eau du robinet.

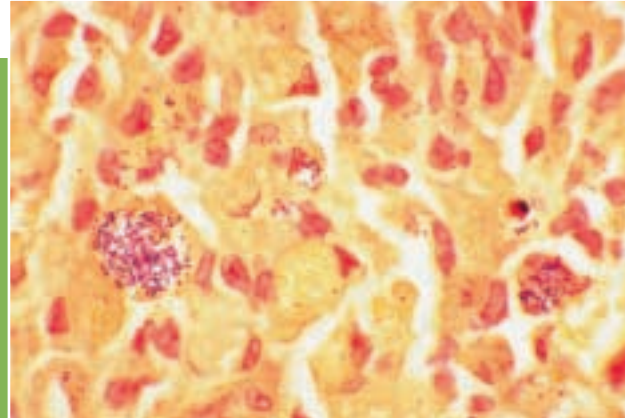


Figure 42 ►

Coloration de Gram de Brown-Hopps d'un tissu infecté par des *Rhodococcus*.

**N.B.** A noter plusieurs groupes de bactéries colorées en bleu (Gram-positives)

4. Mettre les lames dans la solution d'iode de Gram pendant 1 minute.
5. Rincer à l'eau du robinet.
6. Décolorer les lames à l'acétone jusqu'à ce que les derniers vestiges de coloration au cristal violet commencent à disparaître.
7. Laver immédiatement et soigneusement les lames à l'eau.
8. Verser de la fuchsine basique à 1% sur les lames et la laisser 5 minutes.
9. Rincer les lames à l'eau du robinet.
10. Mettre les lames dans 2 bains successifs de solution de Gallego, 60 secondes à chaque fois en agitant vigoureusement.
11. Rincer les lames à l'eau du robinet.
12. Mettre les lames dans l'acétone pendant 30 secondes.
13. Mettre les lames dans la solution d'acide picrique-acétone pendant 2 à 3 minutes.
14. Mettre les lames dans 2 bains successifs d'acétone-xylène, 30 secondes à chaque fois.
15. Eclaircir deux fois les lames au xylène.
16. Monter à la résine.

## 7 Méthodes de décontamination

### 1. Hydroxyde de sodium (Petroff modifié)

#### PRÉPARATION

##### • Solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4%

- pastilles de soude (pour analyse) 4 g
- eau distillée 100 ml

Dissoudre la soude dans l'eau distillée en chauffant. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. Cette solution a une conservation illimitée et peut être gardée au réfrigérateur.

##### • Eau physiologique stérile

- pastilles de chlorure de sodium (pour analyse) 0,85 g
- eau distillée stérile 100 ml

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

#### MÉTHODE

1. Pour 2 ml d'échantillon (écouvillon, pus ou tissu homogénéisé), ajouter 2 ml de solution de NaOH à 4%, selon le degré probable de contamination.
2. Boucher hermétiquement le récipient et agiter pour la digestion.
3. Laisser reposer 15 minutes à température ambiante en agitant de temps en temps.
4. Centrifuger à 3000x g pendant 15 minutes.
5. Éliminer le surnageant.
6. Ajouter 15 ml d'eau physiologique ou d'eau stérile pour remettre le sédiment en suspension.
7. Centrifuger à 3000 g pendant 15 minutes.
8. Décanter le surnageant dans un flacon contenant du désinfectant et ensemercer immédiatement le milieu de culture.

### 2. Méthode de décontamination par digestion à la N-acétyl-L-cystéine/soude

#### PRÉPARATION

##### • Solution A : NaOH à 4%

- NaOH 4 g
- eau distillée 100 ml

• **Solution B : Citrate de sodium à 2,9 %**

- citrate de sodium, 2 H<sub>2</sub>O 2,9 g
- eau distillée 100 ml

Mélanger à parts égales la solution A et la solution B.

Répartir dans des flacons avec un bouchon à vis.

Passer à l'autoclave à 121 °C pendant 20 minutes.

Le jour de l'utilisation, ajouter de la N-acétyl-L-cystéine à 1% dans le flacon.

Bien mélanger.

La N-acétyl-L-cystéine perdant ses propriétés mucolytiques si elle est conservée trop longtemps, le réactif final doit être employé dans les 24 heures.

**MÉTHODE**

• **Ecouvillons**

Agiter avec des mouvements rotatifs l'écouvillon dans 2 ml d'eau distillée stérile dans un tube à centrifuger, puis enlever l'écouvillon.

• **Tissus**

Broyer les fragments de tissus au pilon dans un mortier stérile ou à l'aide d'un broyeur stérile (de type Potter), avec 2 ml d'eau physiologique stérile.

Verser le surnageant dans un tube à centrifuger stérile.

Ajouter 2 ml du mélange N-acétyl-L-cystéine-NaOH ; boucher hermétiquement les tubes et mélanger au Vortex pendant 20 secondes.

Pour la décontamination, garder les tubes 20 minutes à température ambiante.

Diluer l'échantillon digéré et décontaminé dans 30 ml d'eau distillée stérile.

Mélanger en renversant le tube et centrifuger à 3 000x g pendant 20 minutes.

Éliminer le surnageant dans un flacon contenant un désinfectant.

Remettre le sédiment en suspension dans 1 ml d'eau distillée stérile ; bien mélanger.

A l'aide d'une seringue, ensemercer 0,5 ml de l'échantillon dans un flacon contenant du 7H12B et 0,2 ml sur un milieu L-J.

Étaler 0,1 ml de l'échantillon sur une lame et colorer. Incuber le milieu à 30 °C.

**N.B.** La N-acétyl-L-cystéine, (l'agent mucolytique utilisé pour la digestion rapide des expectorations) permet d'utiliser l'agent de décontamination (NaOH) à une plus faible concentration (1%). Le citrate de sodium est inclus dans le mélange pour lier les ions de métaux lourds qui pourraient être présents et inactiver la N-acétyl-L-cystéine.

- La méthode avec la N-acétyl-L-cystéine donne, si elle est correctement exécutée, plus de cultures positives que toute autre méthode (elle tue environ 30% des bacilles).
- Le temps nécessaire pour traiter un seul échantillon est d'environ 40 minutes ; le traitement de 20 échantillons prend environ 60 minutes.
- La N-acétyl-L-cystéine perd rapidement son activité en solution et il faut donc préparer chaque jour un nouveau mélange de digestion.
- Il faut respecter scrupuleusement les temps d'exposition indiqués et l'on doit préparer une dilution au 1/10 du sédiment remis en suspension pour abaisser la concentration en composés toxiques susceptibles d'inhiber la croissance à partir de l'échantillon.

## 8 Culture de *M. ulcerans* en BACTEC 460 TB

### Milieu de culture

On ensemence un flacon de milieu de Middlebrook 7H12B qui est ensuite mis à incuber à 30 °C. Le milieu 7H12B peut être utilisé seul ou pour récupérer un maximum de *M. ulcerans*, on peut aussi utiliser un tube de milieu de L-J (ou L-J modifié), ou les milieux 7H10 ou 7H11 de Middlebrook.

### Addition d'un antimicrobien (PANTA)

On peut diminuer les contaminations en ajoutant au milieu un mélange d'antimicrobiens avant l'ensemencement. Le PANTA renferme de la polymyxine B, de l'amphotéricine B, de l'acide nalidixique, du triméthoprime et de l'azlocilline et on le trouve sous forme lyophilisée. (Le milieu BACTEC 12B devient sélectif après addition de PANTA).

On reconstitue le PANTA lyophilisé en ajoutant 5 ml de liquide réservé à cet usage puis on ajoute 0,1 ml de cette solution à chacun des flacon de milieu 12B (4 ml), avant d'inoculer l'échantillon.

### Création d'une atmosphère riche en CO<sub>2</sub>

Relier le BACTEC 460 TB à une arrivée d'air renfermant 5 à 10% de CO<sub>2</sub>.

Avant l'ensemencement, il faut tester tous les flacons 12B de BACTEC pour éliminer ceux qui donnent des résultats de base élevés et pour créer l'atmosphère riche en CO<sub>2</sub>. Tout flacon ayant un indice initial de croissance de 20 ou plus doit être éliminé.

### Ensemencement des milieux de culture

Prendre une seringue à tuberculine avec une aiguille fixe pour tous les ensemencements.

Prendre une nouvelle seringue pour chaque échantillon et ensemercer le milieu avec 0,5 ml.

Après chaque ensemencement d'un flacon 12B, nettoyer le bouchon en caoutchouc du flacon avec le désinfectant qui convient (éthanol à 70% par exemple).

Tous les flacons ensemencés doivent être mis à incuber à 30 °C. On vérifie chaque semaine la croissance des cultures en mesurant l'indice de croissance (Growth Index : GI).

*M. ulcerans* est une bactérie à croissance lente. Il faut garder les flacons pendant deux mois au moins ou, si possible, plus longtemps encore. Des indices de croissance de 10 ou moins sont considérés comme négatifs et ils deviennent positifs au-dessus de 10. Les flacons positifs sont testés deux fois par semaine. Le temps de génération de *M. ulcerans* chez la souris est d'environ 3,5 jours.

## 9 Epreuves de biochimie et de culture utilisées pour l'identification des mycobactéries à croissance lente

La plupart de ces épreuves reposent sur la classification effectuées par le Groupe de travail international de taxonomie des mycobactéries (IWGMT), qui a décrit des épreuves hautement reproductibles pour le classement systématique du genre *Mycobacterium* (Wayne et al., 1974, 1976). Les épreuves minimales recommandées pour l'identification des mycobactéries à croissance lente ont été décrites en 1992 par Vincent Lévy-Frébault et Portaels.

Figure 43 ►

Les deux premiers tubes sur la gauche ont étéensemencés avec une souche photochromogène (pigmentation produite à la lumière, mais pas à l'obscurité)

Les deux tubes suivants ont étéensemencés par une souche scotochromogène (pigmentation produite à l'obscurité et à la lumière)

Les deux derniers tubes sur la droite ont étéensemencés avec une souche africaine de *M. ulcerans* (pigmentation produite à l'obscurité et à la lumière)



**Pigmentation et photoréactivité.** Les mycobactéries peuvent synthétiser des pigments caroténoïdes conférant aux colonies une coloration jaune à rouge. Les mycobactéries scotochromogènes réalisent la caroténogénèse en l'absence de lumière. Celle-ci joue pour elles un rôle essentiel et une incubation prolongée à la lumière ne peut qu'intensifier leur pigmentation. La lumière et l'oxygène sont indispensables à la caroténogénèse chez les mycobactéries photochromogènes. D'autres mycobactéries ne développent aucun pigment, quelles que soient les conditions d'éclairage. Il peut arriver néanmoins, pour quelques souches non chromogènes, qu'elles développent une certaine pigmentation en vieillissant (jaune pâle à éclatant, ou rose à corail). A cause de ces conditions variables pour la formation des pigments, on détermine la pigmentation comme suit : une suspension de cellules, à la dilution qui convient pour obtenir des colonies isolées, estensemencée dans deux tubes contenant le milieu solide adapté. Il est important d'obtenir des colonies isolées pour assurer l'oxygénation maximale nécessaire à la caroténogénèse. Un des tubes est enveloppé ou mis dans un dispositif assurant une obscurité totale. Le tube protégé ainsi et le tube non protégé sont mis à incuber à la température optimale jusqu'à ce que l'on observe une croissance pleinement visible dans le tube sans protection.

L'épreuve doit être réalisée dès que l'on observe des colonies bien développées, la photo-induction de la caroténogénèse pouvant ne pas se produire dans les vieilles cultures. De plus, comme nous l'avons indiqué plus haut, la pigmentation peut se développer lentement tandis que les témoins ne se pigmentent pas. Le tube incubé à l'obscurité est mis à 20 cm d'une lampe fluorescente de 60 W (ou d'une ampoule équivalente au tungstène) pendant 1 à 2 heures. Il est capital d'assurer une bonne oxygénation des cultures en dévissant le bouchon, la caroténogénèse dépendant de la présence d'oxygène. On remet ensuite les cultures à incuber et l'on examine leur pigmentation 24 heures après la séance d'éclairage.

La comparaison de la pigmentation du tube protégé exposé à la lumière avec le tube non protégé permet de déterminer si la bactérie est scotochromogène, photochromogène ou non chromogène, sur la base des critères décrits dans la figure 43.

**Résistance à l'isoniazide, à l'hydrazide d'acide thiophène-2 carboxylique, à l'hydroxylamine, à l'acide para-nitrobenzoïque et au NaCl.** On évalue la résistance aux agents d'inhibition en intégrant chacun d'eux dans des tubes séparés de milieu de L-J. La plupart de ces composants sont incorporés avant la coagulation de la solution préparée comme le montre le Tableau 7.

Tableau 7 Préparation des agents d'inhibition\*

Médicament	Concentration finale (µg/ml)	Solvant	Concentration dans la solution-mère (mg/ml)	Quantité nécessaire pour 100 ml de milieu (ml)
Isoniazide	1	eau	0,1	1
Isoniazide	10	eau	1	1
Hydrazide d'acide thiophène-2 carboxylique	2	éthanol à 50%	0,1	2
Hydroxylamine	500	eau	25	2
Acide p-nitrobenzoïque	500	propylène-glycol	50	1

\* On prépare en outre une solution de NaCl à 5% (concentration finale) en mettant 5 g de NaCl dans 100 ml d'eau

Préparer des dilutions à  $10^{-2}$  et  $10^{-4}$  d'une suspension standard de culture et ensemercer des doses de 0,2 ml de la dilution à  $10^{-2}$  dans des milieux en tube contenant les agents d'inhibition. On ensemece en outre des tubes témoins avec 0,2 ml de chacune des deux dilutions. Les colonies sont comptées après au moins trois semaines d'incubation, ou quand la croissance est devenue visible dans les tubes témoins. Si la croissance dans le milieu renfermant un agent inhibiteur est inférieure à celle observée dans le tube témoin ensemené avec la dilution à  $10^{-4}$  (c'est-à-dire une résistance de moins de 1%), la culture est considérée comme sensible ; si la croissance dans le tube renfermant le médicament est équivalente à celle du tube témoin avec la dilution à  $10^{-2}$  (c'est-à-dire une résistance de plus de 1%), la culture est considérée comme résistante. Les colonies dans les tubes témoins avec la dilution à  $10^{-2}$  doivent être nombreuses (plusieurs centaines ou confluentes), faute de quoi l'interprétation du test peut s'avérer inexacte.

**Catalase.** L'épreuve utilisée pour détecter la catalase est semi-quantitative et reflète les différences de cinétique enzymatique (Wayne et al., 1976). On utilise des tubes verticaux avec le milieu de L-J au coagule en position verticale et non des tubes inclinés avec le milieu en pente (Fig. 44).

On ensemence la surface plate circulaire du milieu avec 3 gouttes de suspension non diluée de mycobactéries, préparée comme pour la détermination de la vitesse de croissance (voir plus haut la description).

Figure 44 ►

Le tube 1 a été ensemencé avec une souche ne produisant pas de catalase (pas de mousse).

Les tubes 2 et 3 ont été ensemencés avec des souches produisant moins de 45 mm de mousse.

Le tube 4 a été ensemencé avec une souche positive pour la catalase et produisant plus de 45 mm de mousse.



Les tubes sont incubés à température optimale pour la croissance. Après avoir examiné le milieu pour s'assurer de la croissance, on ajoute 1 ml de réactif venant d'être préparé. Ce réactif est un mélange de 0,5 ml d'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) à 30% et de 0,5 ml de Tween 80 à 10% dans l'eau. On place le tube verticalement et l'on mesure la hauteur de la colonne de mousse produite en 5 minutes exactement. Lorsque cette colonne a une hauteur de plus de 45 mm au-dessus de la surface du milieu, le résultat est positif. Si la colonne a moins de 31 mm, il est négatif. Si la colonne a une hauteur comprise entre 31 et 45 mm, il faut recommencer le test. Il ne faut pas remplacer le milieu L-J par un milieu gélosé, car l'on obtient alors des résultats irréguliers.

**Hydrolyse du Tween 80.** Cette épreuve (Wayne et al., 1974) repose sur le fait que le rouge neutre devient jaune orange, même à un pH correspondant à celui de la forme rouge, lorsqu'il est combiné au Tween 80 (un dérivé polyéthylénique du monooléate de sorbitane). L'hydrolyse du Tween 80 entraîne une modification de la couleur du substrat qui devient rose. Ce changement n'est pas dû à une variation du pH entraînée par la production d'acide oléique, mais à la destruction du Tween 80.



Le substrat est une solution de 0,5 ml de Tween 80 dans 100 ml de tampon phosphate 0,067 M (pH 7,0) à laquelle on ajoute 2 ml de solution de rouge neutre à 1%. La solution est répartie dans des tubes à bouchon à vis (16 x 125 mm), en fractions de 4 ml, puis les préparations sont stérilisées à l'autoclave. Après refroidissement, on met en suspension le contenu d'une anse en bactéries dans les 4 ml de substrat, puis on met chaque tube à incuber à 30–33 °C pendant une durée allant jusqu'à 10 jours. Un changement de la couleur ambrée qui passe à rose ou rouge entre 24 heures et 5 à 10 jours d'incubation est enregistré comme une réaction positive. La teinte rose doit se développer dans le liquide lui-même, de sorte qu'il ne faut pas remuer la suspension avant d'avoir fait toutes les observations. Autrement, le fait que les cellules puissent être elles-mêmes sensibles au rouge neutre et prendre la teinte rose entraîne des faux-positifs (Wayne, 1985).

**Uréase.** On utilise la méthode de Steadham (1979). On prélève une anse de culture en croissance active sur milieu L-J qu'on émulsionne dans 1 ml de bouillon d'urée préparée selon les indications du Tableau 8.

Tableau 8 Activité de l'uréase

Composant	Quantité
Peptone	1 g
Dextrose	1 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate de potassium (monobasique)	0,4 g
Urée	20 g
Rouge de phénol sodique (solution à 1%)	1 ml
Tween 80	0,1 ml
Eau distillée	1 000 ml

Les tubes sont mis à incuber à 30–33 °C puis lus à 1 et 7 jours.

Tout changement de couleur de la solution, de jaune éclatant à rose foncé ou rouge indique la décomposition de l'urée et une réaction positive.

**Niacine test.** Certaines mycobactéries ont un blocage au niveau du dinucléotide nicotinamide-adénine inhibant la voie métabolique avec accumulation d'acide nicotinique extracellulaire. La méthode standard mise en œuvre pour le niacine test demande 3 à 6 semaines d'incubation sur milieu L-J. On recouvre une culture d'1 ml d'eau distillée stérile. La surface de la culture est rompue à l'aide d'une spatule afin d'améliorer l'extraction de la niacine qui est *excrtée* et *s'accumule* dans le milieu. Il faut placer le tube horizontalement afin de favoriser un contact maximal entre la culture et l'eau.

Après une extraction de 20 minutes, on transfère 0,5 ml du liquide dans un tube à bouchon à vis, puis l'on ajoute 0,5 ml d'une solution contenant de l'aniline à 4% dans de l'alcool à 95% et 0,5 ml d'une solution de bromure de cyanogène à 10%.

Pour des raisons de sécurité, le tube est immédiatement refermé hermétiquement. S'il y a de la niacine, une teinte jaune apparaît dans les 5 minutes.

Pour éviter toute erreur d'interprétation due aux pigments jaunes extraits des mycobactéries chromogènes, on peut remplacer l'aniline par une solution de benzidine à 3% dans l'alcool absolu. On obtient par cette méthode une teinte rouge en cas de réaction positive.

**N.B.** La benzidine est cancérigène et certains pays en interdisent l'utilisation. Ce composé, comme le bromure de cyanogène, doit être manipulé avec le plus grand soin ; l'opérateur doit porter un masque et des gants pour peser la poudre et manipuler la solution dans l'enceinte de sécurité.

On trouve dans le commerce des bandelettes imprégnées des réactifs et il faut alors suivre les instructions du fabricant. La couleur apparaissant dans le liquide, et non celle sur la bandelette, signe la réaction.

**Nitrate réductase.** L'épreuve de la nitrate réductase fait appel en général à une solution tampon simple contenant 0,01 M de  $\text{NaNO}_3$  dans M/45 de tampon phosphate (pH 7,0) préparée avec 0,085 g de  $\text{NaNO}_3$ , 0,117 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et 0,485 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 12  $\text{H}_2\text{O}$  dans 100 ml d'eau distillée. Le contenu en cellules d'une anse est mis en suspension dans 2 ml du substrat puis la préparation est mise à incuber à 37 °C pendant deux heures. On décèle la formation de nitrite en ajoutant 1 goutte de solution aqueuse d'acide chlorhydrique (vol/vol), puis 2 gouttes d'une solution de sulfanilamide à 0,2 % et enfin 2 gouttes d'une solution de naphthyléthylènediamine à 0,1%. L'intensité de la coloration, qui peut aller du rose pâle (+/-) au rouge foncé (5+) est déterminée par comparaison avec les étalons décrits ci-dessous. Pour être positive, la réaction doit au moins atteindre 2+ sur cette échelle.

Le substrat et tous les réactifs de l'épreuve doivent être conservés dans l'obscurité à 4 °C. Si l'on observe la formation d'un précipité ou si un réactif change de couleur, la solution doit être jetée et il faut en préparer une nouvelle. Les étalons colorimétriques pour l'interprétation sont préparés comme suit.

On commence par préparer une solution tampon de travail (**solution 1**) en additionnant 35 ml de phosphate disodique à 0,067 M (9,47 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhydre par litre), 5 ml de phosphate monopotassique à 0,067 M (9,07 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  par litre), et 100 ml de phosphate trisodique à 0,067 M (25,47 g de  $\text{Na}_3\text{PO}_4 - 12 \text{H}_2\text{O}$  par litre). On ajoute ensuite à 10 ml de **solution 1**, 0,1 ml de phénolphtaléine alcoolique à 1 % et 0,2 ml de bleu de bromothymol à 0,01% (1 ml de bleu de bromothymol alcoolique à 1% dans 100 ml d'eau distillée) pour faire la **solution 2**. L'étalon 5+ correspond à 2 ml de la **solution 2** dans le tube approprié (tube 1). On met ensuite 2 ml de **solution 1** dans 7 autres tubes (tubes 2 à 8), puis l'on ajoute 2 ml de **solution 2** au tube 2. Une fraction de 2 ml est ensuite transférée du tube 2 au tube suivant. Une dilution en série avec 2 ml d'eau distillée est ensuite faite dans les tubes restants (2 ml sont jetés à partir du tube 8). Le tube 2, qui contient les **solutions 1 et 2** en quantité égale correspond à une coloration de 4+ sur l'échelle colorimétrique. Les tubes 3, 5, 6 et 8 indiquent les valeurs de 3+, 2+, 1+ et +/- respectivement.

**Phosphatase acide.** Le substrat pour cette épreuve (Wayne, 1985) se compose de 100 mg phosphate de pyridine-phénolphtaléine dissout dans 100 ml de tampon acide acétique-acétate de sodium à 0,2 M (pH 5,2). Le tampon doit être chauffé à 100 °C pendant 30 minutes puis refroidir à température ambiante avant de pouvoir lui ajouter le substrat phosphaté. On inocule dans 1 tube contenant 1 ml de substrat le contenu en cellules d'une anse puis la préparation est mise à incuber à 37 °C pendant 4 heures. On ajoute ensuite 1 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 10% dans l'eau pour arrêter la réaction et faire apparaître la coloration.

On prépare les dilutions adaptées de la solution-mère servant d'étalon (1 mg de phénolphtaléine libre par ml d'alcool à 95 %) dans l'eau pour obtenir des concentrations de phénolphtaléine de 2,5, 5 et 10 µg/ml. Des parties aliquotes sont traitées aux carbonate de sodium de la même manière que la solution testée. On considère que le test est négatif si la préparation est incolore ou si elle a une coloration rose moins intense que celle de l'étalon à 2,5 µg/ml. En revanche, les préparations dont la coloration correspond en intensité à celle des étalons à 5 ou 10 µg/ml sont enregistrées comme positives.

## 10 Protocole de l'amplification génique (PCR – *polymerase chain reaction*)

### Éviter les faux-positifs – Principe des trois salles

Lors de la réalisation de la PCR, il est crucial d'éviter les faux-positifs dus à des contaminations.

**On recommande le principe des « 3 salles »:**

- **Salle 1:**
  - strictement pas d'ADN
  - salle réservée à la préparation du mélange réactif pour la PCR
- **Salle 2:**
  - salle à faible niveau d'ADN
  - préparation des échantillons de tissu et des écouvillons pour la PCR
  - travail effectué dans une enceinte de sécurité biologique de classe II ou une enceinte pour PCR
- **Salle 3:**
  - haut niveau d'ADN
  - salle où ont lieu l'amplification génique et les manipulations après la réaction
  - manipulation des gels d'agarose
  - hybridation de Southern (Southern blot)

*Le matériel, les vêtements, les échantillons, le matériel d'écriture, etc. ne doivent pas être déplacés de la salle 3 aux salles 1 ou 2, ni de la salle 2 à la salle 1.*

### MÉTHODE DE DIAGNOSTIC

**Le diagnostic de l'infection à *M. ulcerans* par l'amplification génique se déroule en 4 étapes principales :**

1. Préparation de l'échantillon
2. Chauffage et lyse alcaline (pour libérer l'ADN des cellules de *M. ulcerans*)
3. Extraction et purification de l'ADN total de l'échantillon
4. Amplification génique et visualisation des produits de la PCR (électrophorèse en gel d'agarose)

## 1. Préparation de l'échantillon

***Il faut toujours inclure dans l'ensemble de la procédure un témoin négatif constitué d'un soluté de tampon phosphate.***

### • Tissu frais

- couper, à l'aide d'un bistouri jetable, le tissu en petits cubes mis dans un volume réduit de tampon phosphate (2 à 5 ml par exemple)
- bien agiter au Vortex et verser 1 ml dans un tube à microcentrifugation de 1,5 ml et laver (voir ci-dessous)

### • Ecouvillons

- placer l'extrémité de l'écouvillon dans un tube de 5 ml ; ajouter du tampon phosphate (2 ml par exemple, bien mélanger)
- verser 1 ml dans un tube à microcentrifugation de 1,5 ml et laver (voir ci-dessous)

### • Blocs de paraffine

- prélever 4 à 5 coupes minces à l'aide d'un bistouri jetable et les mettre dans un tube à microcentrifugation de 1,5 ml
- ajouter 1 ml de xylène, mélanger, laisser reposer 10 minutes à température ambiante
- centrifuger à vitesse élevée pendant 5 minutes dans une microcentrifugeuse
- éliminer le xylène et répéter la déparaffination au xylène 2 ou 3 fois
- recommencer l'opération deux fois de plus avec de l'alcool absolu
- laisser sécher le culot à l'air
- remettre le culot en suspension dans le tampon phosphate, le couper en petits morceaux à l'aide d'un bistouri jetable
- bien mélanger au Vortex et verser 1 ml dans un tube à microcentrifugation de 1,5 ml
- laver (voir ci-dessous)

#### ***Lavages***

- passer le tube de 1,5 ml à la microcentrifugeuse pendant 2 minutes à grande vitesse
- éliminer le tampon phosphate et laver le culot avec 1 ml de tampon phosphate ; centrifuger de nouveau pendant 2 minutes
- éliminer le tampon phosphate et remettre le culot en suspension dans 180 µl d'eau distillée (conservée dans une bouteille en téflon et changée tous les mois)

## 2. Chauffage et lyse alcaline (pour libérer l'ADN des cellules de *M. ulcerans*)

- ajouter 20 µl de NaOH 0,5 M au tube contenant l'échantillon dans 180 µl d'eau distillée
- ajouter 4 µl de dodécylsulfate de sodium à 10%
- mélanger, placer sur un bloc chauffant à 95 °C pendant 15 minutes

### 3. Extraction de l'ADN total de l'échantillon

- **Faire deux extractions au phénol<sup>1</sup>/chloroforme (1/1) :**
  - ajouter 200 µl de phénol/chloroforme à l'échantillon
  - bien mélanger au Vortex, centrifuger à vitesse élevée pendant 5 minutes dans la microcentrifugeuse
  - verser la couche supérieure (la phase aqueuse) dans un nouveau tube contenant 200 µl de phénol/chloroforme et recommencer l'opération.
- **Faire une extraction au chloroforme :**
  - ajouter 200 µl de chloroforme à l'échantillon
  - bien mélanger au Vortex, centrifuger à vitesse élevée pendant 5 minutes dans la microcentrifugeuse
  - verser la couche supérieure (la phase aqueuse) dans un nouveau tube
- **Précipitation à l'éthanol :**
  - ajouter 200 µl d'eau distillée à l'échantillon purifié
  - ajouter 1 µl de glycogène<sup>2</sup>
  - ajouter 16 µl de NaCl 5M
  - ajouter 800 µl d'alcool absolu
  - centrifuger à vitesse élevée pendant 15 minutes à la microcentrifugeuse
  - éliminer le surnageant et laver le culot avec 500 µl d'éthanol à 70%, centrifuger 1 minute
  - laisser sécher le culot à l'air
  - remettre le culot en suspension dans 50 µl d'eau distillée (= échantillon d'ADN testé prêt pour la PCR)

<sup>1</sup> Phénol : équilibré à pH 8 en tampon Tris sans nucléase (Amersham)

<sup>2</sup> Glycogène : 20 mg/ml (Boehringer Mannheim)

### 4. Amplification génique et visualisation des produits de la PCR (5 étapes)

- A. Préparer le mélange réactif
- B. Ajouter l'ADN à tester (préparé à la section 3)
- C. Faire l'amplification
- D. Visualiser le produit d'amplification
- E. Faire l'hybridation de Southern pour vérifier les séquences d'ADN dans le produit d'amplification (le cas échéant)

**A. Mélange réactif** (tous les réactifs sont fournis par Promega)

On trouvera ci-dessous les quantités suffisantes pour une réaction (en pratique, elles sont multipliées pour permettre la réalisation de 10 réactions ou plus).

Réactif (concentration de départ)	Quantité à ajouter (en µl)
eau distillée	9
tampon (10x)	2
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,2
Nucléotides (2 mM)	2
** amorce 1 de <i>M. ulcerans</i> (20 µM)	1
** amorce 2 de <i>M. ulcerans</i> (20 µM)	1
Taq polymérase (5 unités/µl)	0.2

= 16,4 µl de mélange réactif

\*\* *M. ulcerans* 1–GAT CAA GCG TTC ACG AGT GA

\*\* *M. ulcerans* 2–GGC AGT TAC TTC ACT GCA CA

(produit en général en volumes de 164 µl ou plus puis réparti en parts aliquotes dans de multiples tubes)

**B. Ajouter l'ADN à tester dans les tubes contenant le mélange réactif :**

- mettre 15 µl de mélange réactif dans chaque tube de PCR
- ajouter 5 µl d'ADN à tester ; on obtient alors dans chaque tube un volume de 20 µl
- à chaque essai, inclure toujours des témoins positifs et négatifs
- pour vérifier la présence éventuelle d'inhibiteurs de la PCR, mettre 4 µl de l'échantillon d'ADN à la place de 5 µl et 1 µl du témoin positif renfermant l'équivalent de 100 molécules d'ADN de *M. ulcerans*\* (pour éliminer toute éventualité d'inhibition, ce tube doit donner un résultat positif)

**C. Faire l'amplification**

L'amplification se fait dans un thermocycleur automatisé en suivant le protocole suivant :

94 °C — 4 minutes

94 °C — 40 secondes	} 35 cycles
60 °C — 40 secondes	
72 °C — 40 secondes	

72 °C — 5 minutes

4 °C — garder l'échantillon jusqu'à ce qu'il soit prêt pour l'électrophorèse en gel d'agarose

**D. Visualisation du produit de la PCR :**

- 9 µl des produits de la réaction plus 1 µl de solution tampon\*\* sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose à 2% contenant du bromure d'éthidium à 0,5 µg/ml
- les gels sont mis dans un tampon TAE (Tris base/acétate 40 mM et EDTA 1 mM) et soumis à 100 V pendant 20 minutes (en fonction de l'appareil utilisé)
- visualiser les produits de la PCR colorés au bromure d'éthidium sous éclairage UV (transilluminateur)
- les échantillons sont considérés comme positifs s'ils donnent un fragment à 515 paires de base correspondant exactement au témoin positif
- tous les témoins négatifs doivent être négatifs
- un résultat négatif pour l'échantillon consacré au test « d'inhibition » (voir ci-dessus B) indique que la PCR a été inhibée. Il faut alors recommencer la procédure avec une dilution au 1/10 de l'ADN testé. S'il y a encore inhibition, on ne peut pas donner de résultat pour cet échantillon

**E. Vérification de la séquence du produit de la PCR par une hybridation de Southern** (pour le contrôle de la qualité, mais pas obligatoire — Boehringer Mannheim fournit le matériel de marquage « DIG-RNA » et « DIG-DNA ». Voir Ross et al. dans *Journal of Clinical Microbiology*, 1997; 35:1696–1700)

**• Transfert de Southern :**

- transférer les fragments d'ADN sur des membranes en Nylon positivement chargées (Boehringer Mannheim)
- utiliser un appareil de transfert sous vide (Hybaïd, Royaume-Uni), avec un vide atteint correspondant à 40 cm d'eau dans le tampon alcalin de transfert (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M)
- laisser la membrane sécher à l'air, à 37 °C pendant une heure

**• Préhybridation et hybridation :**

- placer le support de transfert dans un sachet en plastique contenant 20 ml d'une solution standard de préhybridation pour 100 cm<sup>2</sup> de surface de membrane
- sceller le sachet et préhybrider dans un bain d'eau à 68 °C sous agitation pendant une heure au moins
- éliminer du sachet la solution de préhybridation. Ajouter la solution standard d'hybridation renfermant les sondes marquées à la DIG. Laisser les sondes s'hybrider toute la nuit à 68 °C
- le jour suivant, verser la solution d'hybridation avec les DIG sondes du sachet dans un tube en polypropylène (congeler à – 20 °C pour les utilisations ultérieures)
- laver la membrane deux fois dans le tampon de lavage 2x, 5 minutes à chaque fois à température ambiante
- laver la membrane deux fois dans le tampon de lavage 0,1x, 15 minutes à chaque fois à 78 °C dans un bain d'eau à agitation. La sonde marquée à la DIG est le produit à 200 paires de bases obtenu par l'amplification



de *M. ulcerans*-NEST1/2PCR, décrite par Ross et al. Les sondes peuvent être de l'ADN ou de l'ARN. Les sondes d'ARN peuvent mieux convenir pour les laboratoires traitant des volumes importants ; il faudra néanmoins utiliser un mélange marqueur « DIG-RNA ».

• **Révélation de l'hybridation par la méthode de Southern :**

(Pour plus d'informations, voir le kit de détection non radioactive des acides nucléiques [Boehringer Mannheim])

- à la suite des lavages après l'hybridation, équilibrer la membrane avec le tampon I
- mettre dans un nouveau récipient et bloquer la membrane dans le tampon II pendant au moins 30 minutes, à température ambiante et en agitant doucement
- diluer de la phosphatase alcaline anti-DIG à 1/5000 dans le tampon II, porter sur la membrane bloquée, incubé à température ambiante pendant 30 minutes en agitant doucement
- mettre la membrane dans un nouveau récipient et laver deux fois pendant 15 minutes à chaque fois dans le tampon I, à température ambiante
- équilibrer la membrane avec le tampon III pendant 2 minutes
- révéler la membrane à l'aide du substrat chimioluminescent CSPD (Boehringer Mannheim) ; diluer le CSPD (25 mM) au 1/100 dans du tampon III
- porter sur la membrane, incubé 15 minutes à 37 °C pour renforcer la réaction lumineuse
- exposer 5 à 30 minutes sur un film sensible aux rayons X à température ambiante (film Kodak X-omat pour imagerie scientifique)
- développer le film dans un appareil automatique

**NOTES**

\* *Préparation des témoins positifs d'ADN de M. ulcerans (épreuve d'inhibition et témoin positif)*

- extraire l'ADN de *M. ulcerans* (Boddinghaus et al. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990 ; 28 : 1751–1759)
- digérer 0,5 µg d'ADN ( $10^8$  moles) avec l'enzyme Alu I (Promega) pendant 2 heures à 37 °C dans un volume de 20 µl
- extraire une fois au phénol/chloroforme
- précipiter l'ADN à l'éthanol
- remettre en suspension dans 100 µl d'eau distillée ( $10^8$  mole/100 µl)
- diluer pour obtenir  $10^2$  mole/µl et prendre 1 µl pour la PCR

\*\* *Préparation de la solution tampon*

- i) dissoudre 250 mg de bleu de bromophénol dans 33 ml de Tris 150 mM à pH 7,6 ii) - ajouter 60 ml de glycérol et 7 ml d'eau distillée iii) conserver à température ambiante

## 11 Adresse des fabricants

La liste donnée ci-dessous de fabricants de milieux et réactifs couramment utilisés ne suppose pas, de la part de l’OMS, une quelconque homologation de ces produits ou de ces fabricants. Veuillez suivre attentivement les instructions du fabricant lors de l’utilisation de ces milieux et réactifs.

### **Becton-Dickinson**

250 Schilling Circle  
Cockeysville, MD 21030, USA  
Tél: (1) 800 638 8663  
Fax: (1) 410 584 8129

### **BBL Microbiology Systems**

(pour les commandes, s’adresser à:  
Fisher Scientific Co.)  
PO Box 4829  
Norcross, GA 30091, USA  
Tél: (1) 800 766 7000  
Fax: (1) 800 926 1166

### **bioMérieux SA**

69280 Marcy-l’Étoile, France  
Tél: (33) 478 87 2000  
Fax: (33) 478 87 2090

### **BACTEC System**

Becton-Dickinson & Company  
7 Loveton Circle, Sparks  
MD 21152, USA

### **Wellcome Diagnostics**

Laboratories Wellcome SA  
Division Diagnostics  
159, rue Nationale  
75640 Paris Cedex 13, France

## 12 Travail de l'OMS dans le domaine de l'ulcère de Buruli

Suivant les conseils des spécialistes mondiaux, l'OMS dirige et coordonne dans le monde entier les actions de lutte et les travaux de recherche sur l'ulcère de Buruli. Son rôle est essentiel pour maintenir l'efficacité et le cap. Depuis sa création au début de 1998, l'initiative OMS/GBUI a accompli les actions suivantes :

- 1) La réunion préliminaire d'un groupe spécial a été organisée en février 1998. Il y a eu ensuite la création du Comité consultatif réunissant 18 spécialistes, des sommités mondiales dans le domaine de l'ulcère de Buruli et des représentants des pays d'endémie. Certains des membres de ce groupe ont apporté leur contribution à la rédaction de la monographie parue récemment et au présent manuel.
- 2) La première conférence internationale sur la recherche et la lutte contre l'ulcère de Buruli a été organisée à Yamoussoukro (Côte d'Ivoire), du 6 au 8 juillet 1998 et elle a abouti à une sensibilisation accrue à cette maladie. Lors de cette conférence, trois chefs d'Etats et le Directeur général de l'OMS ont signé la Déclaration de Yamoussoukro sur l'ulcère de Buruli. Le rapport, en anglais et en français, est disponible sur demande.
- 3) Des évaluations au Bénin, en Côte d'Ivoire, au Ghana et au Togo ont eu lieu entre mars et juillet 1998 dans le but d'appréhender le problème posé par l'ulcère de Buruli et de discuter de l'importance de la maladie avec diverses autorités. En conséquence, ces quatre pays ont établi des programmes spécifiques et sont désormais imités par d'autres.
- 4) La prise de conscience de l'importance de l'ulcère de Buruli a progressé. Toutefois, beaucoup ne connaissent toujours pas cette maladie et il faut en faire plus. Le nouveau site Web ([www.who.int/gtb-buruli](http://www.who.int/gtb-buruli)) répondra à la très grande nécessité de diffuser le plus largement possible les informations. Les premières brochures éducatives de l'OMS, en anglais et en français, destinées aux agents locaux travaillant au niveau des villages et des districts, ont été imprimées et distribuées dans les pays d'endémie.
- 5) Le Comité consultatif de l'OMS, en consultation avec des spécialistes du monde entier, a élaboré des définitions de cas standardisées, des formulaires de surveillance et de prise en charge des patients, ainsi que des principes directeurs pour le traitement et le transfert des malades.
- 6) Un groupe de travail scientifique de l'OMS, composé d'une quarantaine de spécialistes mondiaux de la maladie, dénommé IMuST (Equipe internationale d'étude de *Mycobacterium ulcerans* – International *Mycobacterium ulcerans* Study Team), a été créé en collaboration avec le Dr John Hayman, qui travaillait au Box Hill Hospital en Australie. IMuST a pour but de développer les actions de lutte et les travaux de recherche, ainsi que d'aider à la coordination des efforts mondiaux contre cette maladie.

- 7) Des centres collaborateurs seront créés dans certains instituts de recherche internationaux pour soutenir la recherche et la formation.
- 8) Le Groupe consultatif de l’OMS et l’IMuST ont recommandé d’effectuer des travaux dans certains domaines prioritaires susceptibles d’avoir des effets sur la lutte contre la maladie :
  - étapes opérationnelles dans la mise en œuvre des mesures de lutte ;
  - mode(s) de transmission ;
  - modifications de l’environnement qui favorisent l’apparition de la maladie ;
  - enquêtes pour établir la charge de morbidité ;
  - structure chimique de la toxine ;
  - méthodes rapides de diagnostic ;
  - action des antimicrobiens connus sur *M. ulcerans*, en commençant par l’animal de laboratoire et en poursuivant par des essais cliniques.

## 13 Instituts de recherche engagés dans des travaux sur l'ulcère de Buruli

- Armed Forces Institute of Pathology (AFIP), Washington DC, Etats-Unis d'Amérique
- Austin and Repatriation Medical Centre, Department of Infectious Diseases, Melbourne, Australie
- Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Department of Microbiology, Hamburg, Allemagne
- Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Laboratoire de Bactériologie, Angers, France
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Géorgie, Etats-Unis d'Amérique
- Emory University School of Medicine, Department of Medicine, Atlanta, Géorgie, Etats-Unis d'Amérique
- Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, Bactériologie et Hygiène, Paris, France
- Institut de Médecine tropicale, Anvers (Belgique)
- Institut Pasteur, Unité Génétique Moléculaire Bactérienne, Paris, France
- Institut Pasteur de Guinée, Cayenne, Guinée française
- Korle-Bu Teaching Hospital, Plastic Surgery & Burns Centre, Accra, Ghana
- Monash University, Department of Anatomy and Cell Biology, Melbourne, Australie
- Monash University, Department of Microbiology, Victoria, Australie
- Nippon Medical School, Tokyo, Japon
- Noguchi Memorial Institute for Medical Research, Accra, Ghana
- Royal Children's Hospital, Microbiological Research Unit, Melbourne, Australie
- St George's Hospital Medical School, Londres, Angleterre
- Swiss Tropical Institute, Basel, Switzerland
- Université de Nagoya, Graduate School of Medicine, Nagoya, Japon
- University Hospital, Department of Internal Medicine, Groningen, Hollande
- Université du Tennessee, Department of Microbiology, Knoxville, Tennessee, Etats-Unis d'Amérique

## 14 Organisations non gouvernementales et autres engagées dans la lutte contre l'ulcère de Buruli (partenaires actuels)

- Acción Sanitaria y Desarrollo Social (ANESVAD), Espagne
- Aide aux Lépreux Emmaüs-Suisse (ALES), Suisse
- American Leprosy Missions (ALM), Etats-Unis d'Amérique
- Association Française Raoul Follereau (AFRF), France
- Associazione Italiana Amici di Raoul Follereau (AIFO), Italie
- Catriona Hargreaves Charitable Trust (CHCT), Angleterre
- Direction générale de la Coopération internationale, Belgique
- Fondation Luxembourgeoise Raoul Follereau (FFL), Luxembourg
- Fondation Damien, Belgique
- Fondation nippone, Japon
- Gouvernement du Japon
- Humanitarian Aid Relief Team (HART), Etats-Unis d'Amérique
- Institut Raoul Follereau, Adzopé, Côte d'Ivoire
- Japan Tissue Engineering Co., Ltd, Japon
- MAP International, West Africa, Côte d'Ivoire
- Médecins Sans Frontières (MSF), Luxembourg
- Pfizer Pharmaceuticals Inc., Etats-Unis d'Amérique
- Pharmaciens Sans Frontières, France
- Projet Humanitaire Afrique Nord Sud (PHANS), France
- Rotary Club de Milan, Italie
- Sasakawa Memorial Health Foundation, Japon
- Université internationale de Kobé, Japon

## 15 Membres du Groupe consultatif de l'OMS sur l'ulcère de Buruli

- **Dr George Amofah**, Public Health Division, Ministry of Health, P. O. Box M-44, Accra, Ghana
- **Dr David Ashford**, Meningitis and Special Pathogens Branch, CDC, 1600 Clifton Rd, Atlanta, GA 30333, Etats-Unis d'Amérique
- **Dr John Buntine**, Cornell Specialists' Centre, 13 Cornell Street, Camberwell, Victoria, 3124, Australie
- **Prof. Jacques Grosset**, Bactériologie et Hygiène, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, 91, bd de l'Hôpital, 75634 Paris Cedex 13, France
- **Dr Augustin Guédénon**, Programme National de Lutte contre l'Ulcère de Buruli, Ministère de la Santé publique, 06 BP 2572, Cotonou, Bénin
- **Prof. John Hayman**, Department of Anatomy and Cell Biology, Monash Univ., Clayton, Melbourne, 3800, Australie
- **Prof. Paul Johnson**, Department of Infectious Diseases, Austin and Repatriation Medical Centre, Heidelberg, 3084 Melbourne, Australie
- **Sister Joseph**, Wewak General Hospital, Private Mailbag, Wewak, East Sepik Province, Papouasie-Nlle Guinée
- **Prof. Jean-Marie Kanga**, Programme National de Lutte contre l'Ulcère de Buruli, 18 BP 2890, Abidjan 18, Côte d'Ivoire
- **Prof. Kenzo Kiikuni**, Sasakawa Memorial Health Foundation, 1-2-2 Akasaka, Minato-Ku, Tokyo 107-0052, Japon
- **Dr Harold King**, Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Emory School of Medicine, 69 Butler Street, S.E., Atlanta, GA 30303, Etats-Unis d'Amérique
- **Dr Wayne M. Meyers**, Division of Microbiology, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 20306-6000, Etats-Unis d'Amérique
- **Prof. Françoise Portaels**, Department of Microbiology, Institute of Tropical Medicine, Nationalestraat 155, B-2000, Anvers, Belgique
- **Dr Roger Pradinaud**, Service de Dermatologie, Centre hospitalier général de Cayenne, Cayenne Cedex, Guyane Française
- **Dr G. Battista Priuli**, Hôpital Saint-Jean-de-Dieu, BP 7, Tanguiéta, Bénin
- **Dr Pamela L. Small**, Department of Microbiology, 409 Walters Life Sciences, University of Tennessee, Knoxville, TN 37996-0845, Etats-Unis d'Amérique
- **Dr Napo Tignokpa**, Programme contre la Lèpre et la Tuberculose, Ministère de la Santé, BP 2271, Lomé, Togo
- **Dr Mark Wansbrough-Jones**, Division of Infectious Disease, St. George's Hospital Medical School, Cranmer Terrace, London SW17 0RE, Angleterre

## 16 Bibliographie conseillée

1. WHO–Laboratory services in tuberculosis control. Part III: Culture. WHO, 1998, 95 p.
2. CDC Laboratory manual. Isolation and identification of *Mycobacterium tuberculosis*. A guide for the level II laboratory. 1981, 143 p.
3. Vincent Lévy-Frébault, Portaels F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1992; **42**:315–323.
4. Meyers WM. Mycobacterial infections of the skin. Tropical Pathology. Springer-Verlag Berlin, Germany, 1995; **8**:291–377.
5. Hayman J, McQueen A. The pathology of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Pathology*, 1985; **17**:594–600.
6. Connor DH, Lunn HF. Buruli ulceration. *Archives of Pathology*, 1966; **81**:183–199.
7. Ross BC et al. Development of a PCR assay for rapid diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997; **35**:1696–1700.
8. Portaels F et al. Variability in 3' end of 16S rRNA sequence of *Mycobacterium ulcerans* is related to geographic origin of isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996; **34**:962–965.
9. Palomino JC, Portaels F. Effects of decontamination methods and culture conditions on viability of *Mycobacterium ulcerans* in the BACTEC system. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998; **36**:402–408.
10. Steadham JE. Reliable urease test for identification of *mycobacteria*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1979; **10**:134–137.
11. Wayne LG. The “atypical” *mycobacteria*: recognition and disease association. *Critical Reviews of Microbiology*, 1985; **12**:185–222.
12. Wayne LG et al. Highly reproducible techniques for use in systematic bacteriology in the genus *Mycobacterium*: tests for pigment, urease, resistance to sodium chloride, hydrolysis of Tween 80, and b-galactosidase. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1974; **24**:412–419.
13. Wayne LG et al. Highly reproducible techniques for use in systematic bacteriology in the genus *Mycobacterium*: tests for niacin and catalase for resistance to isoniazid, thiophene-2-carboxylic acid hydrazide, hydroxylamine, and p-nitrobenzoate. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1976; **26**:311–318.
14. Rikimaru T et al. Efficacy of common antiseptics against *mycobacteria*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases*, 2000; **4**:570–576.







## Autres matériels d'information

- Ulcère de Buruli (Infection à *Mycobacterium ulcerans*). WHO/CDS/CPE/GBUI/2000.1 (*anglais, espagnol, français*)
- Rapport sur la troisième réunion du Comité consultatif sur l'ulcère de Buruli (Infection à *Mycobacterium ulcerans*). WHO/CDS/CPE/GBUI/2000.2 (*anglais, français*)
- Diagnostic de l'infection à *Mycobacterium ulcerans* (ulcère de Buruli). WHO/CDS/CPE/GBUI/2001.4 (*anglais, espagnol, français*)
- Bande dessinée sur l'ulcère de Buruli. WHO/CDS/CPE/GBUI/2001.5 (*anglais, français*)
- Brochure sur l'ulcère de Buruli. WHO/CDS/CPE/SMT/2001.6 (*anglais, espagnol, français*)
- Rapport sur la quatrième réunion du Comité consultatif sur l'ulcère de Buruli (infection à *Mycobacterium ulcerans*). WHO/CDS/CPE/GBUI/2001.7 (*anglais, français*)
- Posters et dépliants sur l'ulcère de Buruli (*anglais, français*)
- Vidéo de 9 minutes 25 secondes sur l'ulcère de Buruli (*anglais, espagnol, français*)
- Logiciel Epi-info de gestion des données (*anglais, français*)
- Vidéo de formation – diagnostic et prise en charge de l'ulcère de Buruli (*anglais, français*)

## Pour en savoir plus :

### Initiative mondiale contre l'ulcère de Buruli

Maladies transmissibles

Organisation mondiale de la Santé

1211 Genève 27, Suisse

Tél. (41) 22 791 2803/2498

Fax (41) 22 791 4777

Mél : Buruli@who.int

Internet: [www.who.int/gtb-buruli](http://www.who.int/gtb-buruli)

Le présent manuel est un guide spécialisé sur les techniques et les méthodes de laboratoire à utiliser pour le diagnostic de l'ulcère de Buruli, une maladie complexe provoquée par *Mycobacterium ulcerans*. Cette maladie, encore insuffisamment comprise, affecte les populations rurales et pauvres dans un nombre croissant de pays tropicaux sur lesquels elle fait peser un énorme fardeau socio-économique.

Destiné aux agents de santé comme au personnel des laboratoires des pays d'endémie, le présent manuel vise à faciliter la compréhension à la fois du tableau clinique de la maladie et des méthodes exactes à mettre en œuvre pour réaliser un certain nombre d'épreuves diagnostiques. Les procédures recommandées, utilisables dans l'ensemble du système de santé, sont adaptées aux services périphériques, des districts et centraux et conformément aux ressources, compétences et matériel variables que l'on trouve classiquement dans les pays d'endémie. La cinquantaine de photos en couleur, les tableaux, les diagrammes et les modèles d'imprimés pour les laboratoires (demandes et rapports d'analyses) renforcent encore l'utilité pratique du manuel.

Le premier chapitre, sur le diagnostic clinique, passe en revue les diverses formes, ulcéraires ou non, de l'ulcère de Buruli, les caractéristiques des atteintes osseuses, ainsi que les complications courantes et les séquelles. Les chapitres suivants couvrent les précautions à prendre au niveau de la sécurité biologique, la tenue des dossiers, le recueil et le transport des échantillons cliniques, le diagnostic des surinfections bactériennes. C'est dans ce cadre que l'essentiel du manuel décrit les méthodes de diagnostic et détaille pas à pas les instructions pour réaliser un grand nombre d'analyses en microbiologie et histopathologie. Il donne également des conseils très complets sur l'interprétation des résultats.

Il est complété par un deuxième volume sur les méthodes de diagnostic au laboratoire de l'infection à *Mycobacterium ulcerans*, ***Diagnostic de l'infection à Mycobacterium ulcerans : manuel destiné au personnel de santé.***

