

La tuberculose humaine et animale au Tchad:
Contribution à la mise en évidence et caractérisation
des agents causaux et leur implication en santé publique

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der Würde einer Doktorin der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Colette Diguimbaye

aus dem Tschad

Genehmigt von der Philosophisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Universität Basel auf Antrag von

Herrn Prof. Dr. Niklaus Weiss und Frau Prof. Gabriela E. Pfyffer

Basel, den 22. Oktober 2004

Prof. Dr. Hans-Jakob Wirz

Dekan

DEDICACE

Je dédie cet ouvrage

En mémoire de

Ma mère **Madjimta Marie Louise Kimto**,

Ma sœur aînée **Thérèse Sayallah Diguimbaye**

Mon neveu **Christophe Diguimbaye, Kito**.

À mes enfants

Solgoty et Thérèse

Pour tous les moments passés loin de vous.

&

A mon époux

Ngombaye Djaibé

Pour sa compréhension, sa patience, son soutien permanent en dépit de ses multiples tâches et surtout pour son amour.

A tous ceux qui m'ont assuré leur soutien dans le difficile exercice de concilier vie familiale et activités estudiantines, je les remercie de tout cœur, je pense à ***toute ma grande famille***.

Table des matières

REMERCIEMENTS		i
RÉSUMÉ		v
SUMMARY		vii
ZUSAMMENFASSUNG		ix
PREMIÈRE PARTIE		1
INTRODUCTION		3
	<u>Contexte institutionnel et conceptuel de l'étude</u>	3
Chapitre I	LA TUBERCULOSE	5
I-1	Historique	5
I-2	Infection et maladie	7
I-2-1	Chez l'homme	7
I-2-2	Chez l'animal	8
I-2-3	Immunologie de la tuberculose	9
I-3	Diagnostic clinique et de laboratoire	10
I-3-1	Chez l'homme	10
	<u>La tuberculose pulmonaire</u>	10
	<u>Les tuberculoses extra pulmonaires</u>	11
I-3-2	Chez l'animal (bovin)	13
	<u>Le diagnostic in vivo</u>	13
	<u>Le diagnostic post-mortem</u>	14
I-4	Prévention et Traitement	14
I-4-1	Chez l'humain	14
I-4-2	Chez les bovins	15

Chapitre II	GENRE <i>MYCOBACTERIUM</i>	17
II-1	Description du genre	17
II-2	Définition du genre	18
II-2-1	L'acido- alcool- résistance	18
II-2-2	La structure des acides mycoliques	19
II-2-3	Le contenu en Guanosine-Cytosine (G+C%) de l'ADN	19
II-3	Classification	19
II-3-1	Importance clinique	19
II-3-2	Vitesse de croissance	20
II-3-3	Classification des mycobactéries non tuberculeuses ou atypiques	20
II-4	Le complexe <i>M. tuberculosis</i>	21
Chapitre III	ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA TUBERCULOSE HUMAINE ET BOVINE EN AFRIQUE	25
III-1	Epidémiologie de la tuberculose humaine	25
III-2	Epidémiologie de la tuberculose bovine	27
III-3	La tuberculose- Zoonose	28
Chapitre IV	SITUATION DE LA TUBERCULOSE AU TCHAD	31
IV-1	Données générales sur le pays	31
IV-2	La tuberculose humaine	32
IV-3	La tuberculose bovine	33

DEUXIÈME PARTIE		35
BUT DE L'ÉTUDE		37
Chapitre V	OBJECTIF GÉNÉRAL	37
Chapitre VI	OBJECTIFS SPÉCIFIQUES	39
TROISIÈME PARTIE		41
MÉTHODOLOGIES		43
Chapitre VII	ZONES DE COLLECTE ET LIEU DE L'ÉTUDE	43
VII-1	Zone de collecte	43
VII-2	Lieu de l'étude	43
VII-2-1	Au LRVZ/F, N'Djaména- TCHAD	43
VII-2-2	Au CNM, Zurich- SUISSE	43
Chapitre VIII	MÉTHODES DE LABORATOIRE	45
VIII-1	Le recueil des prélèvements	45
VIII-2	L'examen microscopique	45
VIII-3	La culture des mycobactéries	45
VIII-4	L'identification phénotypique	45
VIII-5	Le test de sensibilité aux antibiotiques	46
VIII-6	Le «Real time PCR»	46
VIII-7	Le «Spoligotyping»	46
VIII-8	RFLP IS6110	47

QUATRIÈME PARTIE		49
RÉSULTATS		49
Chapitre IX	<i>Mycobacterium bovis</i> Isolates from Tuberculous Lesions in Zebu Carcasses at the Slaughterhouse of N'Djaména, Chad	51
Chapitre X	Identification of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Complex in Chad: Molecular Characterization and Drug Resistance.	67
Chapitre XI	Comparaison des méthodes de disques et MGIT® pour tester la résistance de <i>M. tuberculosis</i> aux anti-tuberculeux essentiels	81
Chapitre XII	Species identification of non-tuberculous mycobacteria from humans and cattle of Chad	93
CINQUIÈME PARTIE		105
DISCUSSION ET CONCLUSIONS		105
Chapitre XIII	DISCUSSION	107
Chapitre XIV	CONCLUSIONS, PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS	111
RÉFÉRENCES		113

ANNEXES		123
Annexe 1	MESURES DE SECURITE AU LABORATOIRE	125
Annexe 2	MILIEUX DE CULTURES	129
	<u>1. Milieu de Löwenstein- Jensen</u>	129
	<u>2. Milieu liquide pour culture primaire</u>	130
	<u>3. Milieu de Middlebrook 7H-10 enrichi à l'OADC</u>	131
	<u>4. Milieu de Lebek modifié</u>	132
Annexe 3	LA COLORATION DE ZIEHL-NEELSEN	135
Annexe 4	DÉCONTAMINATION ET MISE EN CULTURE	137
Annexe 5	CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DES SOUCHES DE <i>MYCOBACTERIUM</i>	141
	<u>1. Catalase thermostable</u>	141
	<u>2. Réduction des nitrates</u>	142
	<u>3. Détection de la Niacine</u>	144
Annexe 6	TEST INDIRECT DE SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES: MÉTHODE DES DISQUES	147
	<u>1. Préparation de l'inoculum à partir de la culture solide</u>	147
	<u>2. Préparation de l'inoculum à partir du milieu liquide Tween- Albumine</u>	148
	<u>3. Préparation du milieu avec disques pour l'antibiogramme</u>	149
Annexe 7	BRUCELLOSIS AND Q-FEVER SEROPREVALENCES OF NOMADIC PASTORALISTS AND THEIR LIVESTOCK IN CHAD	151
	Schelling, E., C. Diguimbaye, S. Daoud, J. Nicolet, P. Boerlin, M. Tanner, and J. Zinsstag. 2003. Brucellosis and Q-fever seroprevalences of nomadic pastoralists and their livestock in Chad. <i>Prev Vet Med</i> 61 :279-293.	
Curriculum vitae		167

Liste des figures

Figure 1	Schéma du mode de transmission de la tuberculose entre l'homme et le bovin	29
Figure 2	La carte du Tchad	32
Figure 3	Profils génomiques en spoligotyping des membres du complexe <i>M. tuberculosis</i>	48
Figure 4	Spoligotypes obtained from 55 <i>M. bovis</i> isolates from Chad	59
Figure 5	RFLP patterns of 15 Chadian <i>M. bovis</i> strains of which 14 were within spoligotype clusters	60
Figure 6	Map of Chad with the location of the 5 health centres from where samples were derived in this study	70
Figure 7	Spoligo-patterns of 35 <i>M. tuberculosis</i> isolates of Chad	74

Liste des tableaux

Tableau 1	Caractères cultureux et biochimiques des espèces du complexe <i>M. tuberculosis</i>	24
Table 2	Specimens collected at the main slaughterhouse of N'Djaména, Chad, and specifications of the condemned carcasses	56
Table 3	Slaughterhouse data of investigated zebu carcasses	56
Table 4	Microscopy's results	57
Table 5	Cultures	57
Table 6	Specimens collected in 2001 and 2002 and proportion of AFB-smear and culture positive (on at least one medium)	73
Table 7	Characteristics and results of drug resistance testing of 35 isolates	75
Tableau 8	Résultats comparatifs obtenus par MD au LRVZ/F et par MGIT® au CNM	88
Table 9	Classification of mycobacteria isolates by laboratory	98
Table 10	Results of NTM species identification with the two methods INNO-LiPA and PRA- <i>hsp65</i> at the IP	98
Table 11	NTM species identification by 16S (rRNA) sequencing at the NCM	99

Liste des photos

Photo 1	(A) Poumon affecté par la tuberculose, prélevé sur la Momie d'un nouveau- né mâle. (B) un humérus droit affecté par la tuberculose	5
Photo 2	Robert Koch, Albert Calmette et Camille Guérin	7
Photo 3	Un cas de tuberculose milliaire saisi à l'abattoir de Farcha en Août 2004	34

ABBREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
AFB (BAAR)	Acid fast bacilli (Bacille acido-alcool-résistant)
ATB	Antibiogramme
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BK	Bacille de Koch
CMT (MTC)	Complexe <i>M. tuberculosis</i> (<i>M. tuberculosis</i> complex)
CNM (NCM) mycobacteria)	Centre national des mycobactéries (National center of
DOTS	Direct observed therapy strategy
DR	Direct repeat [répétitions directes]
HBS	Hotte de biosécurité
HGRNT	Hôpital Général de Référence Nationale du Tchad
IDC	Intra dermo- réaction comparée
IDR	Intra dermo- réaction
IDS	Intra dermo- réaction simple
IS	Insertion sequence [Séquence d'insertion]
Kb	Kilobase
LCR	Liquide céphalo- rachidien
LJ	Löwenstein- Jensen
LRVZ/F	Laboratoire de recherches vétérinaires et zootechniques de Farcha
MGIT	Mycobacterial growth indicator tube
NALC	N-Acetyl-L-Cystéine
NTM	Non tuberculous mycobacteria
OADC	Oleic acid, bovine Albumin, Dextrose, Catalase
OMS (WHO)	Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organisation)
PANTA Azlocillin	Polymyxin, Amphotericin B, Nadilixic acid, Trimethoprim,
Pb	Paire de base
PCR chaîne]	Polymerase Chain Reaction [Réaction de polymérisation en
PRA	Polymerase Restriction Analysis
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SIDA	Syndrome de l'Immunodéficience acquis
TCH	Acide thiophène-2-carboxylique
TPM+	Tuberculose pulmonaire à microscopie positive
UICTMR	Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VPH	Veterinary Public Health

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce travail n'aurait pas été effective sans l'implication, la disponibilité et le support de nombreuses personnes tant en Suisse qu'au Tchad.

Au Professeur Dr. Marcel Tanner

Mes sincères remerciements pour m'avoir permis d'intégrer votre illustre institution.

Au Professeur Dr. Niklaus Weiss

Tous mes remerciements pour avoir accepté de faire partie du comité de thèse dans le cadre de cette étude.

A la Commission Fédérale Suisse de Bourse pour Etudiants Etrangers

Qu'il me soit permis de témoigner ma profonde gratitude à votre endroit pour avoir financé mes trois séjours en Suisse, nécessaires pour la réalisation de ce travail.

Au Dr. Jakob Zinsstag

Vous avez su me convaincre avec beaucoup de bienveillance et de patience afin que j'entreprenne ce travail. Vos critiques, suggestions et conseils formulés ont enrichi ce travail. Durant cette formation vous n'avez ménagé aucun effort pour m'offrir des conditions de travail idéales tant au Tchad qu'en Suisse, sans oublier l'accueil toujours chaleureux au sein de votre merveilleuse famille à Bâle. Que ce travail soit le témoignage de ma grande reconnaissance.

Au Professeur. Dr. Gabriela E. Pfyffer

Vous m'avez chaleureusement accueillie au sein de votre équipe et m'avez offert dans votre imminent centre des conditions de travail idéales. Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance pour les conseils et les encouragements que vous m'avez prodigués tout au long de ce travail.

Au Dr. Bidjeh Kebkiba

Vous n'avez ménagé aucun effort pour me convaincre à mener cette étude. Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance pour les conseils et encouragements prodigués.

Au Dr. Franca Baggi

Merci d'avoir autorisé la poursuite de cette collaboration jusqu'à la finalisation de ce travail. Et merci pour votre implication personnelle malgré vos nombreuses tâches en tant que responsable du Centre National des Mycobactéries.

Au Dr. Esther Schelling

Votre collaboration permanente tout au long de ce parcours et votre gentillesse m'a été infiniment précieuse pour parvenir à la réalisation de mes objectifs. Que ce travail soit le témoignage de ma grande reconnaissance et de mon amitié.

A toute l'équipe du laboratoire du Centre National de Mycobactéries de Zurich

Tous mes remerciements pour les techniques apprises, en dépit des problèmes de communications liées à la langue. Un grand merci à **madame Franziska Palicova** qui a facilité mon intégration dans ce laboratoire.

A l'équipe du Centre de Support en Santé International (Dr. Doumagoum Daugla, Mr Yémadji, Mr Nathan, Mr Naissengar, Mmes Charline et Albertine). Merci pour votre permanente disponibilité dans la résolution de multiples problèmes tant sur le plan financier que technique.

A l'équipe «Santé des nomades» (Dr. Saada Daoud, Dr. Esther Schelling, Richard Bongo Ngandolonare, Naissengar Kemndongarti, Kol Dossoum et Tchari Doungous). Votre collaboration m'a été infiniment précieuse pour la réalisation de cette étude.

Aux Directeurs du Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha. Dr. Anaclet Guelmbaye Ndoutamia et Dr. Hassane Mahamat Hassane

Merci pour avoir autorisé de mener ce travail au détriment des activités du service dont j'étais en charge.

A tous les collaborateurs du Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha (LRVZ/F)

Merci pour votre soutien permanent et vos encouragements prodigués durant cette période.

MERCI à l'équipe de l'inspection de l'Abattoir de Farcha et aux techniciens du laboratoire de l'Hopital Général de Référence National qui nous ont fournis les prélèvements indispensables pour mener à bien cette étude.

RÉSUMÉ

Le Tchad est un pays à forte incidence tuberculeuse. L'incidence annuelle a triplé en une décennie, en passant de 120 cas en 1994 à 370 cas pour 100 000 en 2004. La tuberculose animale, et plus précisément la tuberculose bovine avait été suspectée dans le pays à travers des tests de tuberculination et des saisies de carcasses aux abattoirs. Malgré la disponibilité de méthodes de diagnostics plus sensibles et plus spécifiques, le diagnostic microbiologique de la tuberculose ne se résumait jusqu'à lors qu'à la microscopie, c'est à dire à la mise en évidence des Bacilles Alcoolo- Acido- Résistants (BAAR) dans les prélèvements de sujets suspectés. Cette méthode ne permet pas l'identification des différentes espèces mycobactériennes d'une part et d'autre part, elle est très peu sensible car il faut un minimum de 10^4 bacille /mL pour avoir un frottis positif en BAAR. Les mycobactéries forment un groupe très hétérogène tant sur plan de leur habitat que par rapport aux pathologies qu'ils engendrent. L'identification différentielle de chacun d'eux ne peut être établie que suite à leur isolement. A ce stade le laboratoire de culture devient un passage obligé pour obtenir les informations adéquates sur la tuberculose dans un pays.

Le laboratoire de mycobactériologie comporte un certain nombre de particularités par rapport à celui de la bactériologie classique, c'est ainsi que durant cette étude, nous avons eu à établir les conditions de base nécessaires pour l'identification des mycobactéries. Quelques étapes essentielles dans la mise en place du laboratoire méritent d'être énoncées:

- 1) La préparation des milieux de culture en particulier le milieu de Löwenstein-Jensen,
- 2) La méthode de décontamination au N-Acetyl-L-Cystéine,
- 3) Les tests d'identification biochimiques,
- 4) Le typage moléculaires «spoligotyping»
- 5) Le test de sensibilité aux antibiotiques.

Les matériels biologiques utilisés dans cette étude étaient constitués pour l'essentiel de crachats et d'urines de patients adressés au laboratoire des centres de santé en vue d'une recherche de BAAR et de spécimens de tissus d'organes prélevés sur les carcasses de bovins saisies partiellement ou totalement à l'abattoir de N'Djaména. Au total, 639 prélèvements cliniques et 201 spécimens, collectés à l'abattoir ont été cultivés et

respectivement 26.4% et 65.6% de mycobactéries ont été isolées. Le typage des mycobactéries du complexe tuberculeux par le spoligotyping a révélé 35 *Mycobacterium tuberculosis*, tous issus de spécimens humains et 55 *M. bovis* de bovins. Vingt-cinq différents spoligotypes ont été obtenu avec les souches *M. tuberculosis*, sept étaient en grappe et 18 unique. La comparaison de nos spoligotypes avec ceux qui ont été décrit auparavant montre que 10 souches *M. tuberculosis* sont du type «famille Cameroun» et que 10 spoligotypes ont déjà été décrits dans la base (SpolDB3.0). Trente-deux pour cent des spoligotypes n'ont jamais été décrits. Le test de sensibilité aux antituberculeux réalisé avec les souches *M. tuberculosis* a révélé un taux global de résistance de 39% et 27% de résistance à l'isoniazide. La résistance à la rifampicine et à la streptomycine était nulle. Il a été observé que la majorité des souches résistantes à l'isoniazide étaient issues de patients originaires de la zone sahélo-saharienne.

Parmi les 55 *M. bovis* typées, 26 étaient issus de bovins de race arabe et 29 de race Mbororo. Douze différents spoligotypes ont été identifiées et 92.7% des souches sont en grappe. Dans la majorité des spoligotypes (11/12), il a été notifié l'absence du DR 30 comme pour les souches décrites au Cameroun. Aucune spécificité de spoligotype liée à une des races bovines étudiée n'a été observée.

Le typage de 52 isolements de mycobactéries atypiques provenant des spécimens cliniques et de l'abattoir a permis d'identifier 15% de *M. fortuitum* et 3 d'entre eux, qui provenaient des prélèvements d'abattoir étaient de la 3^{ème} variante. Cette dernière est génétiquement affiliée au *M. farcinogenes*- qui est l'agent causal du farcin fréquemment isolé en Afrique centrale.

L'étude microbiologique de la tuberculose au Tchad a permis de confirmer les suspicions des cas de tuberculose chez l'homme et l'animal par l'isolement et le typage de l'agent causal, qui a été *M. tuberculosis* chez l'humain et *M. bovis* chez les bovins.

Le test de sensibilité aux antibiotiques a été établi et le profil des souches isolées chez l'humain a révélé un taux élevé de souches résistantes à l'isoniazide. L'importance de la tuberculose bovine chez les zébus de race Mbororo par rapport à ceux de la race arabe à l'abattoir a pu être démontrée par les isolements de *M. bovis*.

Les résultats obtenus durant cette étude constituent les premières données microbiologiques sur la tuberculose humaine et animale au Tchad et de nombreux points soulevés dans ce travail devront faire l'objet d'études plus approfondies.

SUMMARY

Chad is a high-incidence country for clinical tuberculosis. Within the last decade, the annual incidence rate increased from 120 human tuberculosis cases per 100'000 people to 370/100'000 in 2004. The presence of bovine tuberculosis was suspected through tuberculation studies and meat inspections at slaughterhouses.

Although more sensitive and specific tuberculosis diagnostic tests exist, before this thesis, tuberculosis was solely diagnosed in Chad by microscopy of acid-fast bacilli (AFB) in specimens from suspected cases. Microscopy alone does not allow the identification of different mycobacteria species nor is it a sensitive method; the detection threshold is higher than 10^4 bacilli / ml for a smear to be classified as AFB positive. Mycobacteria are very heterogeneous with regard to their host tropism, their habitat and their pathogenicity. The identification of the different mycobacterial species is only possible after strain isolation and subsequent typing. Thus, a laboratory culture represents a key element to obtain adequate information on the situation of tuberculosis in a country.

A mycobacteriology laboratory has its specificities in comparison to a classical bacteriology laboratory and during this study the following relevant steps to identify mycobacterial species were established:

- 1) Preparation of culture media and especially the Lowenstein-Jensen medium
- 2) Decontamination of specimens with N-acetyl-L-cysteine sodium hydroxide
- 3) Biochemical testing
- 4) Molecular spoligotyping
- 5) Diagnosis of anti-tuberculosis drug resistance

The specimens treated during the study were mainly sputum and urine samples of patients coming to a health center for smear examination and specimens of affected organs from condemned livestock carcasses after meat inspection in N'Djaména. In total, 639 clinical samples and 201 organ samples from the slaughterhouse were cultivated and from 26.4% and 65.6% of cultures, respectively, mycobacteria were isolated. Spoligotyping revealed 35 *M. tuberculosis* strains - all isolates being from human specimens - and 55 *M. bovis* strains from organs of cattle.

We obtained 25 different spoligotypes of *M. tuberculosis*, of which 7 were clustered and 18 were unique. Ten *M. tuberculosis* strains corresponded to the "Cameroon family"

and 10 spoligotypes were already described in the international spoligotype database (SpolDB3.0). Thirty-two percent of our spoligotypes have not yet been described in literature or entered into a database. Drug resistance testing of *M. tuberculosis* strains showed 39% were resistant to at least one drug and 27% were resistant to Isoniazide. The majority of patients with strains resistant to Isoniazide originated from the sahelian-saharian zone rather than from the more humid Southern zones of Chad. No strain was resistant to Streptomycin or to Rifampicin.

Out of the 55 *M. bovis* isolates, 26 derived from cattle of the Arab breed and 29 of the Mbororo breed. Twelve different spoligotypes were identified and 92.7% of strains were clustered. Within our typed isolates, most strains lacked the direct repeat (DR) 30 as described for Cameroonian strains. Typical spoligotypes could not be assigned to one of the two cattle breeds.

Typing of 52 non-tuberculous mycobacteria from clinical specimens and organs from the slaughterhouse showed that 15% were *M. fortuitum*. Three strains isolated from cattle were *M. fortuitum* 3rd variant which is genetically closely related to *M. farcinogenes* - the causal agent of farcy in Central Africa.

The microbiological study of tuberculosis in Chad has confirmed through isolation and strain typing the existence of tuberculosis among suspected cases in humans and in livestock. Anti-tuberculosis drug testing has now been established in Chad and has revealed that the proportion of strains resistant to Isoniazide is high. The higher incidence of bovine tuberculosis in Mbororo cattle in comparison to Arab cattle was demonstrated by isolation and characterization of *M. bovis* strains.

In conclusion, this study has generated the first microbiological results on human and animal tuberculosis in Chad. These results will inform Chadian public health specialists and can serve as the basis to define further investigations.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Tschad ist ein Hochinzidenzland der Tuberkulose. Während dem letzten Jahrzehnt ist die jährliche Inzidenz von 120 Fällen pro 100'000 Einwohner auf 370/100'000 im Jahre 2004 gestiegen. Das Vorkommen der Rindertuberkulose im Tschad wurde anhand von positiven Befunden nach Tuberkulinstudien und nach Fleischinspektionen am Schlachthof vermutet.

Obwohl es sensiblere und spezifischere Diagnostikmethoden für die Tuberkulose heutzutage gibt, vor dieser Dissertation wurde im Tschad die Diagnose lediglich durch den mikroskopischen Nachweis von säurefesten Stäbchen in Verdachtsmaterialausstrichen gemacht. Mikroskopie alleine erlaubt weder die Bestimmung von verschiedenen Mycobakterien Arten, noch ist diese Nachweismethode sensibel; der Nachweissschwellenwert liegt bei mehr als 10^4 Bakterien / mL. Mycobakterien sind sehr heterogen hinsichtlich ihrem Wirtsspektrum und ihrem Lebensraum, sowie ihrer Pathogenität. Nur nach Isolation und Typisierung von Stämmen können verschiedene Mycobakterien Arten unterschieden werden. Deshalb ist ein Kultivierungslabor eines der Schlüsselemente zum Erhalt genügender Information über die landesinterne Situation der Tuberkulose.

Im Vergleich zu klassischen Bakteriologielabors hat ein Mycobakterien Labor seine Eigenheiten und während dieser Studie wurden die folgenden relevanten Schritte zur Erfassung von Mycobakterien etabliert:

- 1) Vorbereitung von Kulturmedium, im speziellen von Löwenstein-Jensen
- 2) Dekontamination von Proben mit N-Azetyl-L-Cystein Sodium Hydroxid
- 3) Biochemische Tests
- 4) Molekulare Genotypisierung ("spoligotyping")
- 5) Nachweis von Resistenzen gegen Medikamente

Das Untersuchungsmaterial dieser Studie bestand hauptsächlich aus Sputum- und Urinproben von Patienten, die für eine Ausstrichuntersuchung ins Spital von N'Djaména gegangen sind, und aus veränderten Organen, welche nach der Schlachthof-Fleischuntersuchung in N'Djaména von beschlagnahmten Tierkörpern entnommen worden sind.

Insgesamt wurden 639 klinische Proben und 201 Organproben vom Schlachthof kultiviert. Von diesen angesetzten Kulturen wurden in 26.4% und 65.6% der Fälle

Mycobakterien isoliert. Anschliessende Spoligotypisierung hat 35 *M. tuberculosis* Stämme - alle stammten von Proben von Personen - und 55 *M. bovis* Stämme von Rinderorganen, erkennen lassen.

Wir haben 25 verschiedene Spoligomuster von den *M. tuberculosis* Isolaten erhalten, wobei 7 Muster geklumpt und 18 einzeln vorkamen. Zehn *M. tuberculosis* Muster entsprachen der „Kamerun Familie“ und zehn waren bereits in der internationalen Datenbank (SpolDB3.0) erfasst. Zweiunddreissig Prozent unserer Spoligomuster sind noch nie beschrieben oder in die Datenbank eingegeben worden. Resistenzen gegen Tuberkulosemedikamente wurden bei 39% der Stämme gefunden (mindestens gegen eines der vier getesteten Medikamente), wobei bei 27% eine Resistenz gegen Isoniazid gefunden wurden. Die Mehrheit der Patienten mit einer Isoniazid-Resistenz stammte aus der Sahel oder Sahara-Zone im Vergleich zu den feuchteren Gebieten im Landessüden. Es wurden keine Resistenzen gegen Streptomycin und Rifampicin gefunden.

Von den 55 *M. bovis* Isolaten waren 26 von Rindern der Araber und 29 der Mbororo Rasse. Bei 12 dieser wurden verschiedene Spoligomuster gefunden und hiervon waren 92.7% geklumpt. Den meisten Stämmen fehlte die direkte Repetition (DR) 30, wie dies auch für die Kamerunstämme der Fall war. Fast allen unseren Stämmen fehlte die DR 15. Wir konnten den beiden Rinderrassen keine typischen Spoligomuster zuordnen.

Weitere 52 atypische Mycobakterienstämme, isoliert aus klinischem Material und Schlachthofproben, wurden typisiert, wobei 15% *M. fortuitum* war. Drei Rinderstämme waren *M. fortuitum* 3. Variante, welche genetisch mit *M. farcinogenes* sehr eng verwandt ist - dem ätiologischen Erreger der Lymphangitis farcimiosa des Rindes bei zentralafrikanischen Rindern.

Die mikrobiologische Tuberkulosestudie im Tschad hat durch Isolation and Genomtypisierung die Existenz der Tuberkulose bei Verdachtsfällen in Personen und Nutzvieh bestätigt. Das Überprüfen der Medikamentresistenzen ist nun etabliert und wir konnten einen hohen Anteil von Isoniazid-Resistenzen nachweisen. Das erhöhte Vorkommen der Rindertuberkulose bei Mbororo im Vergleich zur der Araber Rindern wurde durch Isolation und Charakterisierung von *M. bovis* Stämmen bewiesen.

Schlussfolgernd können wir sagen, dass diese Studie die ersten mikrobiologischen Resultate über die Human- und Rindertuberkulose im Tschad hervorgebracht hat. Diese Resultate werden die Tschadischen Spezialisten im Gesundheitswesen in ihren Entscheidungen zu leiten und sie stellen die Grundlage für weitere Abklärungen dar.

PREMIÈRE PARTIE

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Contexte institutionnel et conceptuel de l'étude

Le projet « Santé des nomades au Tchad » est dirigé et appuyé par l'Institut Tropical Suisse (ITS, Bâle), le Centre de Support en Santé Internationale (CSSI, N'Djaména) et le Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha (LRVZ/F, N'Djaména). C'est un projet pluridisciplinaire de recherche appliquée dans le domaine de la santé publique. L'équipe pluridisciplinaire était composée d'un géographe, d'épidémiologistes en santé humaine et animale, de biologistes et d'un ethnologue. Les zones d'interventions étaient le Kanem et le Chari-Baguirmi.

La mise en place de ce dispositif a démarré par une étude exploratoire basée sur la géographie de la zone d'étude et les mouvements saisonniers des pasteurs nomades (Wiese, 1997). Par la suite une étude ethnographique sur la perception des maladies et spécifiquement des zoonoses en milieu Foulbé s'en est suivie (Krönke, 2001). Les études épidémiologiques et biomédicales en santé humaine et animale ont été réalisées dans le cadre du projet : L'interface entre la santé humaine et animale chez les nomades en Afrique : vers une « médecine unie » (Zinsstag et coll., 1998), qui est une composante du projet « Santé des nomades au Tchad ». Ces études ont été menées par une équipe pluridisciplinaire composée de médecin, vétérinaire et biologiste (Diguimbaye et coll., 2000). Le site choisi pour abriter le projet a été le Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha (LRVZ/F), institution qui relève du ministère de l'Elevage du Tchad. Ce laboratoire créé depuis 1952 est d'abord au service de la santé animale, en effet ses principales activités sont axées sur (1)- La production des vaccins prioritaires pour le bétail (charbon bactérien, charbon symptomatique et la pasteurellose), (2)- Le diagnostic et la surveillance des maladies du bétail, ainsi que certains diagnostics humains et (3)- La recherche. Cette dernière s'articule en 5 programmes : (1) Elevage et Environnement, (2) Zoonoses et maladies transmises par les vecteurs, (3) Pastoralisme, instabilité écologique et vulnérabilité, (4) Développement des filières et (5) La « médecine unie ».

Ainsi les objectifs du projet cité en haut s'intégraient parfaitement dans le programme de recherche (2) du LRVZ/F. L'approche de ce projet est basé sur le concept de la « médecine unie », ou « one medicine », proposé par l'épidémiologiste américain Calvin Schwabe. Ce concept est fondé sur les liens intrinsèques qui existent entre la

médecine humaine et vétérinaire. En effet ces deux disciplines partagent les mêmes paradigmes, car elles se basent toutes les deux sur un ensemble de connaissances en anatomie, physiologie, pathologie et étiologie des maladies (Schwabe, 1984). Le projet visait à établir la morbidité humaine et animale simultanément, au vu de l'interdépendance homme animal chez les pasteurs nomades. En même temps, il s'agissait d'étudier certaines zoonoses en milieu nomade chez l'homme et ses animaux simultanément. Parmi les maladies retenues, il y avait: la brucellose, la fièvre Q, la toxoplasmose, la Fièvre de la Vallée du Rift (chez les humains seulement) et la tuberculose. Concernant les 3 premières zoonoses, le diagnostic a pu être établie par la sérologie chez les deux espèces et la plupart des analyses biomédicales concernant ces maladies ont été réalisées au LRVZ/F. Mis à part la brucellose (Massenet et coll., 1993; Lefèvre et coll., 1970), les autres zoonoses précitées n'ont jamais fait l'objet d'étude épidémiologique chez l'homme et l'animal simultanément. Au terme de cette étude une situation sur l'état de santé des nomades a pu être faite (Daoud et coll., 2000; Daoud, 2001) et des résultats sur l'épidémiologie de certaines zoonoses ont été obtenus (Schelling et coll., 2000; Schelling, 2002). Les analyses sur la Fièvre de la Vallée du Rift ont été effectuées à l'Institut Pasteur de Dakar. Concernant la tuberculose, les investigations microbiologiques n'ont pu être menées en même temps que les autres maladies, car il n'existait pas de laboratoire approprié pour la culture des mycobactéries au Tchad.

Chapitre I LA TUBERCULOSE

I-1 Historique

La tuberculose est une affection très ancienne. Les échantillons de tissus prélevés des tombes ont montré aussi bien par la morphologie que par les analyse d'ADN, que l'espèce humaine a été affectée par la tuberculose il y plus de 5400 ans. Sur les momies égyptiennes des déformations de la colonne vertébrale indiquant le mal de Pott ont été observées, après séquençage des fragments d'ADN, celui-ci s'est avéré être spécifique de *Mycobacterium* du complexe *Mycobacterium tuberculosis* de nos jours (Crubezy et coll., 1998).

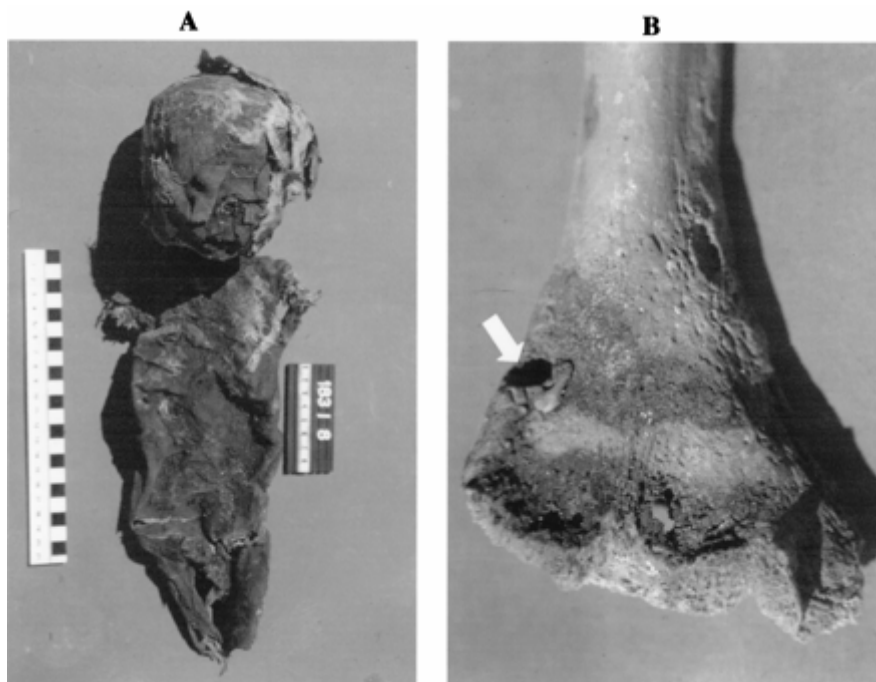


Photo 1 (A) Poumon affecté par la tuberculose, prélevé sur la Momie d'un nouveau-né mâle. (B) un humérus droit affecté par la tuberculose (Zink et coll., 2003).

En 460 avant J.-C., Hippocrate identifiait « phtisies », mot grec signifiant dégénérescence ou tuberculose comme étant la maladie la plus répandue en ces temps. C'est à partir du XVI^{ième} siècle que la littérature médicale européenne publiait sur la tuberculose. En 1546, Girolamo Tracastoro était le premier à expliquer dans son livre « De Morbis Contagiosis » que la tuberculose était contagieuse et que cette

contamination ne se transmettait pas seulement du malade mais aussi à partir des habits et de la literie de ce dernier. En 1679, Sylvius de la Boe en Hollande a eu à établir le lien causal entre les symptômes et la maladie. Il utilisa « tubercula » pour désigner les nodules pulmonaires observés à l'examen nécrosique des phtisiques, puis il décrit les tubercules comme étant un changement caractéristique des poumons ou d'autres organes du corps du patient phtisique. Mais c'est seulement à la fin du 18^{ième} siècle que la maladie humaine fut réellement caractérisée avec les travaux des médecins anglais Reid (1785) puis Baillie (1793). Ceux-ci attirèrent l'attention sur les granulations et les tubercules dont le volume et le centre devenait purulent jusqu'à former de vastes abcès dans la masse du poumons. En 1810, Carmichael publiait que la tuberculose bovine se transmettait à l'homme par la consommation de la viande ou du lait infecté et en 1865, Jean Antoine Villemin fournissait les preuves expérimentales de l'inoculabilité du tubercule et de la matière caséuse ainsi que la transmission de la tuberculose entre l'homme et l'animal (bovin, lapin) (New Jersey Medical School National Tuberculosis center, 1996). Et c'est à Robert Koch que devait revenir le mérite de la découverte du bacille en 1882. Il établissait d'une façon définitive l'étiologie bactérienne de la tuberculose et démontrait que le Bacille spécifique existe dans les crachats de tous les phtisiques et dans toutes les excréments provenant de l'homme et l'animal tuberculeux. Enfin il fournissait la preuve que ce microbe pouvait être décelé facilement là où il existait grâce aux artifices de coloration (Calmette, 1936). Dès lors ce bacille est appelé Bacille de Koch (BK) ou *Mycobacterium tuberculosis*. Pour Koch, la maladie chez l'homme et l'animal était causée par le même organisme. En 1898, Theobald Smith fit la distinction entre *M. bovis* et *M. tuberculosis* sur la base de leur caractéristiques culturales in vitro et l'étude de leur virulence (Gallagher et Jenkins, 1998). Avec la découverte de l'agent causal, la lutte contre la maladie pouvait réellement commencer. En 1921, le bactériologiste français Albert Calmette en collaboration avec Camille Guérin atténuent la virulence de la bactérie responsable de la tuberculose bovine par des passages répétés sur milieu spécifique et mirent au point le vaccin BCG (Bacille Calmette Guérin) qui est largement utilisé de nos jours pour prévenir la tuberculose chez les humains.



Photo 2 Robert Koch, Albert Calmette et Camille Guérin

Le traitement de la tuberculose par les antibiotiques a été effectif en Novembre 1944, grâce aux travaux de Selman A. Waksman qui a purifié la streptomycine à partir du *Streptomyces griseus*. Cependant cette monothérapie à la streptomycine a rapidement engendrée des mutants résistants ce qui suscitera la mise au point de nouveaux antibiotiques: PAS- Acide para-amino-salicylique (1949), Isoniazide (1952), Pyrazinamide (1954), Cyclosérine (1955), Ethambutol (1962) et Rifampine ou Rifampicine, (1963). L'association de 3 ou 4 antibiotiques est formalisée afin de résoudre le problème des mutants résistants (New Jersey Medical School National Tuberculosis center, 1996).

I-2 Infection et maladie

I-2-1 Chez l'homme

L'infection de la tuberculose s'acquiert suite à un contact avec une personne malade de tuberculose ou par ingestion d'aliments infecté (lait ou viande). Les bacilles virulents inhalés vont se loger dans les alvéoles pulmonaires où ils sont phagocytés par les macrophages alvéolaires. A ce stade, il n'y a ni expression clinique, ni expression radiologique et le crachat est négatif en BAAR: c'est le stade de primo-infection qui se traduit par des phénomènes immunitaires à type d'hypersensibilité retardée avec virage des tests tuberculiques (réaction significative du test cutané Mantoux). L'évolution vers le stade maladie chez les personnes n'ayant pas reçu de thérapie préventive ne se fait, en moyenne, que dans 10% des cas (ATS, 2000).

La maladie tuberculeuse est plus souvent pulmonaire mais elle peut être aussi extra pulmonaire. Elle se traduit par une multiplication intense des bacilles, des réactions immunitaires importantes et par la caséification des lésions (*caseum* : lésion spécifique de la tuberculose) qui entraîne la nécrose totale des cellules. Les lésions caséuses solides (nodules) peuvent évoluer vers la liquéfaction et se vider dans les bronches avec formation de cavernes. Les cavernes sont les lésions les plus riches en bacilles et constituent ainsi la source de contamination pour l'entourage du malade.

La tuberculose clinique est caractérisée par l'apparition des symptômes (légère hyperthermie, sueurs nocturnes, fatigue, perte de poids et toux persistante), une réaction significative du test cutané Mantoux et la détection de germes de la tuberculose dans le crachat par la microscopie.

I-2-2 Chez l'animal

Le principal mécanisme de l'infection se fait par les aérosols qui sont disséminés suite à la toux produite par l'animal malade et qui sont inhalés par les animaux en contact, mais, elle peut aussi se faire par ingestion (lait), par voie congénitale et sexuelle (Neill et coll., 1994). Les bovins ainsi que les autres ruminants rejettent les gaz du rumen et créent ainsi des aérosols dans la cavité orale. Par inhalation ou ingestion, les bacilles tuberculeux atteindront les poumons.

Chez le bétail, le développement de la tuberculose maladie dépend de l'habilité de *M. bovis* à survivre et à se multiplier dans les macrophages de l'hôte (Thoen et Bloom, 1995).

La maladie s'installe lentement, mais lorsqu'elle est cliniquement évidente, elle devient fatale. L'infection par voie gastro-intestinale nécessite l'implication d'un plus grand nombre d'organismes par rapport à celle par voie pulmonaire (Pritchard, 1988). 80-90% des lésions tuberculeuses chez le bétail se retrouvent au niveau des poumons. L'infection des autres organes (foie, rein et rate) est beaucoup moins fréquente. Les mammites sont rares, elles représentent environ 2% de toutes les tuberculoses chez le bétail et constitue une source majeure de dissémination de la tuberculose dans le troupeau et chez les humains par ingestion du lait infecté (Calmette, 1936). Lorsque l'infection primaire est localisée aux poumons, les premiers symptômes observés sont la toux, la perte de poids et une chute dans la production laitière. Les organismes sont évacués dans les sécrétions de toux, dans le lait, les matières fécales, les urines et les pertes utérines (Pritchard, 1988).

I-2-3 Immunologie de la tuberculose

Le bacille de la tuberculose est un parasite intracellulaire, il survit à l'intérieur des macrophages grâce à ses lipides de surface qui inhibent la fusion phagosome-lysosome. Le phénomène de Koch est spécifique du bacille de la tuberculose. Les antigènes responsables de cette allergie sont les antigènes protéiques de bacille qui, reconnus et présentés par les macrophages, activent les lymphocytes T (et leur expansion clonale) gardiens d'une immunité durable lymphocyte-T dépendante. Les lymphocytes immuno réactifs activent à leur tour des macrophages effecteurs de l'allergie. Le bacille tuberculeux détermine la formation, dans les tissus infectés, de lésions granulomateuses (expression de l'allergie tuberculinique). La formation de granulome est une réponse immunitaire qui limite la dissémination du microorganisme. La réaction granulomateuse de l'hôte est renforcée par la réponse à médiation cellulaire T. L'immunité à médiation cellulaire implique une sous-classe de lymphocytes appelés lymphocyte T, ou cellule T. Ces cellules contrôlent les réponses immunitaires. Chaque type de réponse est contrôlé par des lymphocytes différents. Les cellules T assurent trois fonctions principales : une fonction auxiliaire, une fonction suppressive et une fonction cytotoxique.

- Les lymphocytes T auxiliaires stimulent la synthèse des anticorps par les cellules B et elles expriment l'antigène de surface CD4.
- Les lymphocytes T suppressives, jouent un rôle inhibiteur et contrôlent le niveau et la qualité de la réponse immunitaire.
- Les cellules T cytotoxiques ont pour fonction de reconnaître et de détruire les cellules infectées ou de stimuler la destruction des pathogènes ingérés par les phagocytes.

Ces dernières interviennent dans la réaction d'hypersensibilité retardée.

L'hypersensibilité retardée ou de type IV

Cette réaction immunologique apparaît quand les macrophages ne parviennent pas à éliminer les antigènes qu'ils ont ingérés. Les lymphocytes T sont alors activés et produisent des lymphokines qui entraînent tout une variété de réponses inflammatoires. Chez l'hôte infecté, le bacille induit une allergie avec hypersensibilité retardée à médiation cellulaire (en 24 à 48H) utilisée pour l'intra dermo-réaction (IDR) (Milstein, 1993).

I-3 Diagnostic clinique et de laboratoire

Le diagnostic clinique de la tuberculose est essentiellement basé sur l'ensemble des symptômes qui concourent à la suspicion d'une tuberculose. Ces symptômes varient avec la localisation de la maladie au niveau du corps. Le test cutané à la tuberculine positif permet de déceler les sujets qui ont déjà été infectés par des mycobactéries à un moment donné de leur vie, mais elle n'est pas la preuve d'une tuberculose maladie (Ait Khaled et Enarson, 1999). Le diagnostic de laboratoire permet de localiser la maladie ou de déceler l'agent causal au moyen d'autres outils techniques (radiographie, microscope, culture et les tests in vitro). Il permet de confirmer la suspicion établie lors du diagnostic clinique.

I-3-1 Chez l'homme

Avant l'apparition du VIH, la majorité des cas de tuberculose était pulmonaire à 85% et 15% de tuberculose extra-pulmonaire (Farer et coll., 1979). Cette répartition est très différente avec la pandémie du VIH/SIDA, selon les travaux de Small et coll. (1991), la tuberculose chez les malades en état avancé de SIDA se répartit comme suit : 38% de tuberculose pulmonaire, 30% de tuberculose extra pulmonaire et 32% des deux formes associées.

La tuberculose pulmonaire

La toux persistante est le plus commun des symptômes de la tuberculose pulmonaire et l'expectoration due à cette toux constitue la base de diagnostic de cette forme de tuberculose, cependant d'autres signes cliniques ne sont pas à négliger (la fièvre, la perte de poids, les sueurs nocturnes anorexie) (ATS, 2000). Dans tous les cas, les crachats des personnes suspectées d'une tuberculose pulmonaire doivent être analysés par un examen microscopique. Cet examen est qualifié de direct, car le crachat du malade est observé directement au microscope après coloration du frottis par les méthodes existantes. Si après coloration, on détecte des Bacilles Alcoolo- Acido-Résistants ou BAAR, alors on dit que le patient souffre de tuberculose pulmonaire à microscopie positive (TPM+). Cet examen microscopique est le seul moyen de confirmer le diagnostic de la tuberculose dans la plupart des pays en développement. Sa pratique est indispensable car elle permet d'identifier de manière précise les cas contagieux, qui nécessitent des soins en priorité (Enarson et coll., 2000). Cependant,

elle est très peu sensible car il faudrait avoir au moins 10^4 bacille/ml de produit pathologique pour qu'elle soit positive (Garg et coll., 2003). La culture est le moyen le plus sûr d'établir le diagnostic, c'est une méthode sensible car tout bacille viable donne naissance à une colonie. La culture est l'élément de référence auquel sont comparées les autres méthodes (Carbonnelle et Carpentier, 1995). Les méthodes de diagnostic basées sur la biologie moléculaire sont utilisées pour un diagnostic rapide de la tuberculose en révélant l'agent causal. Certaines de ces méthodes ont l'avantage de déceler l'agent causal directement à partir du prélèvement sans passer par la culture mais, leur utilisation reste limitée par le coût.

La radiation, découverte en 1895 par Wilhelm Konrad von Röntgen permet de révéler les anomalies au niveau des poumons. Cette technique constitue un moyen supplémentaire pour le diagnostic de la tuberculose pulmonaire.

Les tuberculoses extra pulmonaires

Dans les tuberculoses extra- pulmonaires, qui font suite à une dissémination hématogène des bacilles, les lésions sont presque toujours fermées et peu riches en bacilles. Son diagnostic est plus compliqué, cela est dû au fait que les sites d'implantation de la maladie ne sont pas évidents et facilement accessibles. L'inaccessibilité au site et la quantité infime de bacille compliquent un diagnostic bactériologique de confirmation. Les méthodes de diagnostic les plus utilisées en laboratoire sont l'examen anatomo- pathologique et la culture de fragments tissulaires prélevés par ponction ou au cours d'intervention chirurgicales permettent de faire la preuve de la tuberculose dans la majorité des cas (Ait Khaled et Enarson, 1999). D'autre part, en cas de co-infection par le VIH, la progression vers le stade maladie est souvent accélérée, et les localisations extra- pulmonaires sont plus fréquentes. (Murray, 1996). Toutes les localisations de la tuberculose situées en dehors du parenchyme pulmonaire sont des tuberculoses extra- pulmonaires. Selon leur site d'implantation on distingue 7 types de tuberculoses extra- pulmonaires, parmi lesquelles la miliaire et la méningite représentent leurs formes aiguës et sévères.

- *La tuberculose miliaire* est une tuberculose disséminée qui atteint tous les organes. Les lésions se présentent sous forme de nodules ou granulomes. Dans cette forme de tuberculose tous les signes cliniques sont observés. La radiographie de la cavité thoracique permet de diagnostiquer aisément cette tuberculose. Les examens

microscopiques des frottis d'expectoration en cas de tuberculose miliaire sont généralement négatifs.

- *La méningite tuberculeuse*, c'est une maladie dévastatrice qui prend naissance à la base du cerveau. Les symptômes observés sont les maux de tête, la perte de mémoire et la raideur du cou. Le diagnostic de cette tuberculose ne peut être établi en laboratoire, compte tenu du traitement à administrer en urgence. Cependant la réalisation du « scanner » du cerveau suivi d'une ponction lombaire de 3 échantillons du liquide céphalo-rachidien (LCR) en vue d'une recherche de BAAR pourrait donner une meilleure indication sur la maladie (Ait-Khaled et Enarson, 2000).

- *La lymphadénite tuberculeuse*, un ou plusieurs ganglions lymphatiques peuvent être impliqués mais les ganglions périphériques cervicaux sont plus concernés. Cette forme de tuberculose est souvent causée par *M. bovis* (Dankner et Davis, 2000). L'intra-dermo réaction (IDR) à la tuberculine est généralement positive. Cliniquement, l'évolution de la maladie se caractérise par l'inflammation de la peau due à une augmentation de la masse ganglionnaire. Le diagnostic microbiologique ne peut être établi qu'après ponction du contenu ganglionnaire ou suite à une ablation chirurgicale du ganglion. L'examen microscopique et la culture du pus ou d'un fragment du ganglion permettent de prouver l'étiologie tuberculeuse du ganglion dans la plupart des cas.

- *La pleurésie tuberculeuse*, elle se manifeste par une maladie intense accompagnée de fièvre et de douleur pleurétique. Le test à la tuberculine est le plus souvent positif. En raison de la pauvreté du liquide pleural en bacilles, l'examen microscopique direct du culot est rarement positif, mais la culture peut être positive. Si la biopsie pleurale peut être faite, on peut l'utiliser pour une mise en culture.

- *La tuberculose urogénitale*. Chez les patients avec une tuberculose urogénitale, les symptômes locaux sont prédominants (pyurie, hématurie et urines fréquentes). Lorsque ces symptômes sont subtilisés, souvent il y a destruction intense des reins. L'analyse des urines est anormale et dans 90% des cas elle révèle une pyurie et ou une hématurie. Le diagnostic bactériologique doit être effectué par la mise en culture des urines acides et l'isolement de la mycobactérie, car la microscopie directe de l'urine peut révéler des BAAR qui serait lié à la présence de *Mycobacterium smegmatis* dans les sécrétions génitales (Ait Khaled et Enarson, 1999).

- *La tuberculose osseuse*. Le symptôme le plus fréquemment observé est la douleur généralisée (Berney et coll., 1972). L'absence des signes cliniques habituels rend le diagnostic difficile. Le « Mal de Pott » ou la tuberculose de la colonne vertébrale est

une forme grave de la maladie par les conséquences neurologiques qu'elle peut générer. Le scanner et la RMI de la colonne vertébrale sont les techniques les plus sensibles pour confirmer une suspicion du « Mal de Pott ». Au cas où la radiographie est normale et que la microscopie et la culture du crachat sont négatifs, alors une biopsie de l'os s'avère nécessaire pour le diagnostic bactériologique de la maladie (ATS, 2000).

- *La tuberculose abdominale*, elle peut impliquer différents organes (le péritoine, intestins, rectum et anus). La tuberculose du péritoine se manifeste par des signes cliniques généraux et digestifs qui s'accompagnent d'un gonflement de l'abdomen. Il existe deux formes cliniques différentes de tuberculose péritonéale: l'ascite tuberculeuse simple, décelable à l'aide de la laparoscopie où on peut voir des granulations blanchâtres et la péritonite tuberculeuse résultant de l'évolution d'adénopathies rétro-péritonéales et mésentériques. Leur rupture dans le péritoine entraîne la formation de foyers caséux cloisonnés. Dans la plupart des cas l>IDR à la tuberculine est positive. Les symptômes observés sont la fièvre, la perte de poids et l'anorexie. Le diagnostic de laboratoire est effectué sur des biopsies dans le cas d'une suspicion de la tuberculose (ATS, 2000).

I-3-2 Chez l'animal (bovin)

Le diagnostic in vivo

Le diagnostic in vivo de la tuberculose chez les animaux et plus spécifiquement chez les bovins met à contribution le test de tuberculation intradermique ou cutané et le test cellulaire in vitro basée sur la quantification de l'interféron gamma produit par les lymphocytes suite à une sensibilisation de ces dernières avec un antigène spécifique (Wood et coll., 1990). Les tuberculines sont constituées d'un mélange complexe d'antigènes solubles produits par les mycobactéries (*M. bovis* ou *M. avium*), cultivées sur milieux synthétiques liquides, après centrifugation de la culture, les mycobactéries sont tuées par chauffage, et la tuberculine est obtenu par filtration, suivi d'une concentration à chaud et d'une purification par fractionnement chimique (purified protein derivative [PPD]). Ces protéines purifiées sont les plus utilisées. Chez les bovins, on utilise soit le PPD- bovis seul en « Intra Dermo tuberculation Simple (IDS)» soit les deux: PPD-bovis et PPD- avium en «Intra Dermotuberculation Comparative (IDC)». Quelque soit la méthode choisie, au lieu de l'injection, la peau est nettoyée et rasée, l'épaisseur de la peau est mesurée à l'aide d'un pieds de coulisse ou cutimètre, puis 100µl de la tuberculine est injectée au bovin soit à un côté du cou pour

l'IDS, soit de chaque côté du cou si on fait une IDC. L'augmentation de l'épaisseur de la peau au site d'injection est mesurée 72 heures après à l'aide du même instrument (OIE, 1996).

Le diagnostic post-mortem

Ce diagnostic se fait généralement lors des inspections aux abattoirs. La mise en évidence de la maladie se fait par différentes méthodes depuis la plus grossière par observation des lésions en passant par l'histopathologie, la microscopie et la culture jusqu'aux plus pointues qui font appel à la biologie moléculaire, Gene Probe, PCR, Amplification et Hybridation de l'ADN (Adam, 2001).

I-4 Prévention et Traitement

I-4-1 Chez l'humain

Le vaccin BCG mise au point en 1921 est celui qui est utilisé jusqu'alors pour prévenir la maladie chez l'homme. L'immunité liée à cette vaccination est partielle, essentiellement contre les tuberculoses aiguës (miliaires et méningites) de l'enfant (Ait Khaled et Enarson, 1999). La prévention de la transmission de la tuberculose bovine à l'homme doit être assurée par la pasteurisation du lait et l'inspection des animaux abattus destinés à la consommation.

Le traitement de la tuberculose repose sur la chimiothérapie. Elle diminue rapidement la contagiosité, c'est donc le moyen le plus efficace pour prévenir la dissémination des bacilles tuberculeux. Une chimiothérapie correcte est une association appropriée de médicaments antituberculeux pour éviter l'émergence d'une résistance à ces médicaments, la prescription de ces médicaments à des doses adéquates et leur prise régulière par le patient et ce, pendant un temps suffisant pour prévenir les rechutes de la maladie après l'arrêt du traitement. Les médicaments antituberculeux essentiels sont au nombre de cinq: Isoniazide (H), Rifampicine (R), Pyrazinamide (Z), Streptomycine (S) et Ethambutol (E). La Thioacétazone (T) est répertoriée dans la liste complémentaire des médicaments essentiels, mais son utilisation est déconseillée chez les patients atteints du VIH. Aucun de ces antibiotiques n'est suffisamment efficace pour détruire tous les bacilles tuberculeux chez un malade, c'est pourquoi l'association de plusieurs médicaments est indispensable pour obtenir la guérison définitive d'un malade. Le régime du traitement- 2ERHZ/4R₃H₃ préconisé par l'OMS comprend deux phases:

- la phase initiale et intensive, durant laquelle 4 médicaments antituberculeux sont prescrits et elle dure en général 2 mois.
- la phase de continuation durant laquelle le patient prend le plus souvent 2 médicaments; cette phase est longue, le traitement dure au minimum 4 mois et dans certains cas il peut être prolongée notamment en présence d'une forme sévère de la maladie (Ait Khaled et Enarson, 1999).

Le traitement chirurgical est utilisé pour les lésions caséuses et scléreuses. Ce mode de traitement est souvent pratiqué dans les cas de tuberculoses urogénitales (Le Guillou et coll., 1993).

I-4-2 Chez les bovins

Il n'existe pas de traitement pour le moment. La seule mesure consiste à tester les animaux, isoler les réacteurs et les éliminer. Toutefois, il faut mentionner que la recherche sur la mise au point d'un vaccin plus efficace pour les bovins est en cours. Ce vaccin serait d'une grande utilité pour la lutte contre la tuberculose bovine en en Afrique, compte tenu de la non application des mesures policières classiques (Buddle et coll., 2003; Ayele et coll., 2004).

Chapitre II GENRE *MYCOBACTERIUM*

II-1 Description du genre

Le genre *Mycobacterium* fait partie du groupe des Actinomycètes, contenant des acides mycoliques et dénommé « genera mycolata » (Pfyffer et coll., 2002). Le groupe « genera mycolata », comprend 9 genres, qui diffèrent par la taille de leur chaîne de carbone qui entre dans la composition de l'acide mycolique (Butler et Guthertz, 2001) :

- *Corynebacterium* (C₂₀-C₃₈)
- *Dietzia* (C₃₄-C₃₈)
- *Rhodococcus* (C₃₄-C₅₂)
- *Nocardia* (C₄₀-C₆₀)
- *Gordania* (C₄₈-C₆₆)
- *Williamsia* (C₅₀-C₅₆)
- *Skermania* (C₅₀-C₆₄)
- *Tsukamurella* (C₆₄-C₇₈)
- *Mycobacterium* (C₆₀-C₉₀).

Les mycobactéries sont aérophiles. Morphologiquement, elles varient de la forme coccoïde à celle en bâtonnet (0.3 à 0.6µm de large et 0.5 à 6 µm de long). Les bacilles sont immobiles, et non sporulés. La morphologie des colonies varie de lisse à rugueux selon les espèces décrites (Good et Shinnick, 1998). L'appellation *Mycobacterium* est due à la croissance en pseudo mycélium rudimentaire dans certaines conditions. La propriété bien connue du genre est la capacité de leur paroi cellulaire à résister à la décoloration avec l'acide dilué dans de l'alcool après coloration d'où le terme de bacille alcoolo- acido- résistant (BAAR). Mis à part le BAAR, une autre caractéristique des mycobactéries est sa forte teneur en lipide dans la paroi cellulaire. L'épaisseur de la paroi cellulaire est unique en son genre, elle est composée de 4 couches, dont la première est la plus inerte et est constituée de peptidoglycane; les 3 autres couches sont composées de lipides sous différentes formes d'acides mycoliques, de glycolipides, du facteur corde et de wax D. La paroi représente jusqu'à 60% de la matière sèche de la bactérie. Cette caractéristique de la paroi contribue à résister à l'action des agents chimiques (base et acide) et à sa nature hydrophobe qui favorise le flottement de l'organisme à la surface de milieu hydrique. La paroi intégrale est relativement imperméable à de fortes concentrations de base, mais elle devient pénétrable, lorsque la solution basique est associée au phénol (Jawetz et coll., 1968).

II-2 Définition du genre

La définition du genre *Mycobacterium* se base sur 3 critères :

- l'acido- alcoolo- résistance,
- la structure des acides mycoliques,
- le contenu en guanine- cytosine (GC%) de l'ADN.

II-2-1 L'acido- alcoolo- résistance

La plupart des mycobactéries poussent lentement, par conséquent la mise en évidence des bacilles acido- alcoolo- résistants (BAAR) joue un rôle important dans le diagnostic rapide des infections mycobactériennes. La microscopie est la méthode de laboratoire la plus abordable pour détecter la présence des BAAR. L'examen direct du frottis nécessite une quantité importante de bacille (10^4 BAAR/ml de crachat). L'examen direct de frottis de crachat ou d'autres matériels cliniques est très utile dans certains cas:

1. Il fournit le diagnostic présomptif d'une maladie mycobactérienne
2. Les patients à microscopie positive sont rapidement identifiés d'autant plus qu'ils constituent les cas les plus infectieux.
3. Il peut être utilisé pour suivre l'évolution des patients sous traitement.
4. Il sert à confirmer la présence de BAAR dans les milieux de culture.

Bien que la capacité de maintenir la carbo- fuschine ou l'auramine O après lavage avec de l'alcool ou de l'acide faible est une caractéristique fondamentale du genre *Mycobacterium* cependant elle n'est pas spécifique au genre. D'autres bactéries qui contiennent les acides mycoliques comme *Nocardia*, ont aussi cette capacité.

Trois méthodes de coloration sont communément utilisées pour la mise en évidence des BAAR. Deux méthodes, Ziehl- Neelsen et Kinyoun qui utilisent la microscopie optique pour observer les BAAR colorés en rouge par la carbo fuschine et une méthode utilisant le microscope à fluorescence pour visualiser les BAAR fluorescents suite à leur coloration à l'auramine O.

II-2-2 La structure des acides mycoliques

Les acides mycoliques sont des acides gras à longues chaînes carbonées, isolés de la fraction lipidique après une saponification prolongée (80h). Chimiquement, les acides mycoliques des mycobactéries se caractérisent par des longues chaînes d'atomes de carbone (environ 88) et sont porteurs de fonctions oxygénées (groupes méthoxyl et

hydroxyl). Ils constituent le support moléculaire de l'acido- alcool- résistance. Contrairement aux acides mycoliques de *Nocardia* et *Rhodococcus*, ceux de *Mycobacterium* sont insolubles dans l'alcool. Les acides mycoliques ont une grande valeur diagnostic, car ils permettent de caractériser les différents genres du groupe « genera mycolata » (Butler et Guthertz, 2001).

II-2-3 Le contenu en guanosine-cytosine (G+C%) de l'ADN

Le génome de mycobactérie possède un contenu en GC élevé, qui varie de 61 à 71 mol.% (Levy-Frebault et Portaels, 1992), à l'exception de *M. leprae* avec 57.8% (Honore, 2002).

II-3 Classification

Différentes classifications sont utilisées pour les mycobactéries, selon leur importance clinique et leur vitesse de croissance.

II-3-1 Importance clinique

En fonction de leur signification clinique, les mycobactéries sont classées en 3 groupes majeurs qui sont:

- Les espèces strictement pathogènes sont: les bacilles du complexe tuberculeux, le bacille de la lèpre, *M. ulcerans*, *M. paratuberculosis*, *M. haemophilum* et *M. marinum*.

M. leprae, responsables de la lèpre chez l'homme est non cultivable sur milieu synthétique.

M. ulcerans, agent d'ulcère nécrosant est la seule espèce capable de sécréter une toxine.

M. paratuberculosis est l'agent causal de la para- tuberculose, entérite hypertrophique des ruminants.

M. marinum est responsable de granulomes.

M. haemophilum provoque des lésions cutanées disséminées en particulier chez les immunodéprimés.

- Les mycobactéries pathogènes opportunistes, pouvant entraîner des affections humaines appelées mycobactérioses. Ces espèces sont en général responsables des

infections pulmonaires chez l'homme et ce même en absence de toute immunodépression, des adénites chez l'enfant et de rares infections osseuses ou cutanées. Contrairement à la tuberculose et à la lèpre, les mycobactérioses ne se transmettent pas entre individu. Il est généralement admis que la source d'infection est l'environnement où ces mycobactéries sont largement répandues (Phillips et von Reyn, 2001)

- Les espèces saprophytes ou commensales, qui sont jamais ou rarement responsables d'infection.

II-3-2 Vitesse de croissance

Selon la vitesse de croissance sur les milieux de culture à température optimale, le genre *Mycobacterium* se divise en deux groupes: les mycobactéries à croissance lente et les mycobactéries à croissance rapide. (Runyon, 1959). Les mycobactéries à croissance lente nécessitent plus de 7 jours jusqu'à 3 mois pour former des colonies visibles, elles ont un temps de génération compris entre 12 et 24 heures, alors que celles à croissance rapide ont un temps de génération qui varie entre 2 et 6 heures avec formation de colonies visibles en moins de 7 jours.

II-3-3 Classification des mycobactéries non tuberculeuses ou atypiques

La classification des mycobactéries atypiques en 4 groupes (Runyon, 1959), basée sur les critères phénotypiques: la pigmentation et la vitesse de croissance. Les groupes I, II et III ne renferment que les organismes à croissance lente alors que le groupe IV ne comprend que ceux à croissance rapide.

Le groupe I de Runyon se compose des espèces photochromogènes dont les colonies se pigmentent en présence de la lumière (*M. kansasii* et *M. marinum*).

Le groupe II, inclut les bactéries scotochromogènes, dont les colonies sont pigmentées en présence ou en absence de la lumière (*M. gordonae*, *M. scrofulaceum*).

Le groupe III comprend les non chromogènes, qui donnent des colonies non pigmentées (*M. avium*, *M. intracellulare* et *M. xenopi*).

Le groupe IV, regroupe les individus à croissance rapide, pigmentés ou non (*M. fortuitum* et *M. chelonae*).

II-4 Le complexe *M. tuberculosis*

Le complexe du bacille tuberculeux (CBT), terme utilisé pour la première fois par Tsukamura pour désigner les 4 espèces pathogènes strictes de *Mycobacterium* (Hoffner et coll., 1993). Ces dernières présentent une homologie ADN/ADN supérieure à 95% (Bradley, 1973). Cette homologie a été démontrée aussi par le séquençage du gène de l'ARNr 16S et des séquences inter géniques de l'ARNr 16S- 23S (Kirschner et coll., 1993). L'espèce *M. canettii* est la dernière décrite et présente les mêmes caractéristiques. (Van Soolingen et coll., 1997). Au total ce sont 5 espèces reconnues par la nomenclature qui composent le CBT.

1. *Mycobacterium tuberculosis*

C'est le principal agent de la tuberculose humaine, elle a été décrite par Robert Koch en 1882. *M. tuberculosis* ne se trouve pas dans la nature en dehors de produits provenant de l'homme infecté. Certains animaux vivant au contact de l'homme peuvent en être contaminés (Michalak et coll., 1998). Le bacille mesure 1 à 4 μ de long sur 0.2 μ de large, légèrement incurvé, avec des extrémités arrondies; dans les produits pathologiques il se présente isolé ou en amas. Il se multiplie en moyenne toutes les 20 heures sur les milieux de cultures enrichis, dont le plus connu est le milieu de Löwenstein- Jensen additionné de glycérine. Sur ce milieu, les colonies qui se développent en 3 à 4 semaines ont un aspect caractéristique: sèches, rugueuses, en «chou fleur», elles peuvent atteindre 5 à 10 mm de diamètre (eugoniques) et sont de couleur crème; elles se détachent facilement du milieu et se dispersent mal dans l'eau.

2. *Mycobacterium bovis*

M. bovis, c'est l'agent causal de la tuberculose du bétail, mais contrairement à *M. tuberculosis* chez l'animal, il est fréquemment identifié comme agent causal de la tuberculose chez les humains (Cosivi et coll., 1998). Le bacille est court et trapu sur le milieu de Löwenstein- Jensen, la culture est très lente et prend toujours plus de 30 jours à l'isolement. Les colonies sont d'abord plates et transparentes, puis bombées, le diamètre ne dépasse pas 1mm. Elles se dissocient facilement dans l'eau. La croissance de *M. bovis* est inhibée par la glycérine à 0.075% et à l'inverse elle est stimulée par la présence de 0.6% de pyruvate de sodium dans le milieu de culture.

La dissociation spontanée des colonies sur milieu de culture artificielle est fréquente. Elle se traduit par l'apparition sur une colonie d'un bourgeon satellite d'aspect rugueux. Celui-ci donne naissance à une colonie eugonique et rugueuse, d'aspect similaire à *M. tuberculosis*, on pense que c'est ainsi qu'est apparu le BCG, mutant rugueux et avirulent de *M. bovis*.

Il existe deux sous-espèces de *M. bovis*.

M. bovis BCG a été obtenu par Calmette et Guérin en 1921 à partir d'une souche *M. bovis*, après 230 passages en séries dans un milieu contenant du glycérol, de l'extrait de pomme de terre et sels biliaires. Au cours de ces passages la souche *M. bovis* est devenue inoffensive, avirulente mais protectrice (Calmette, 1927).

M. bovis caprae comb. Nov, cette souche a été décrite en 1999 sous le nom de *M. tuberculosis subsp. Caprae* (Aranaz et coll.1999), puis a été reclassée sous le nom de *M. bovis susp. Caprae* (Niemann et coll., 2002a) Elle a été identifiée comme agent causal de la tuberculose des chèvres et moutons. Cette sous-espèce diffère de *M. bovis* par sa sensibilité à la pyrazinamide (Aranaz et coll., 1999; Niemann et coll., 2002a).

3. *Mycobacterium africanum*

Elle a été décrite pour la première fois en 1968 à partir d'un isolement réalisé au Sénégal chez un patient atteint de tuberculose pulmonaire. (Castets et coll., 1968). Ce germe occasionne chez l'homme surtout une tuberculose pulmonaire et est fréquemment responsable de tuberculose chez les patients originaires ou vivant en Afrique sub-saharienne. (Baril et coll., 1995). En raison de leur origine géographique, ces souches ont été appelées *M. africanum*. Par la suite deux sous-types ont été identifiés: le sous-type I avec les caractéristiques culturales et biochimiques proche de *M. bovis*, qui est surtout isolé en Afrique de l'Ouest, alors que le sous-type II semblable au *M. tuberculosis* est localisé en Afrique de l'Est (Niemann et coll., 2002b). *M. africanum* représente 20 à 40% des souches tuberculeuses isolées au Sénégal. (Diop et coll., 1976).

A l'examen microscopique, son aspect est identique à celui de *M. tuberculosis*. La croissance de la culture est stimulée par 0,25% de pyruvate de sodium. Les colonies sont dysgoniques, plates, de couleur mâte avec un bourgeon central et s'enchâssent dans la gélose, les bacilles sont micro aérophiles. Les caractères biochimiques : absence habituelle de nitrate réductase, et le test à la niacine est parfois positif mais

souvent faiblement positif ou négatif. *M. africanum* est sensible au TCH et à 50µg/ml de pyrazinamide (Castets et coll., 1968).

4. *Mycobacterium microti*

M. microti a été découvert par Wells en 1937 sur la chauve souris (*Microtus agrestis*) (Wells et Oxon, 1937) sous le nom de «vole bacillus». *M. microti* est classé comme membre du complexe *M. tuberculosis* (Wayne et Kubica, 1986). Il est responsable de la tuberculose murine et plus tard il a été isolé chez d'autres mammifères: les rongeurs sauvages, les chats, les porcs et le Lama du zoo (Cavanagh et coll., 2002). Récemment il a été identifié comme agent causal de la tuberculose humaine aussi bien chez les patients immunocompétents qu'immunodéprimés (Van Soolingen et coll., 1998; Horskotte et coll., 2001).

5. *Mycobacterium canettii*

Isolé et identifié par G. Canetti en 1969 chez un patient français présentant une tuberculose pulmonaire cavitaire. *M. canettii* a été décrit comme une espèce du CBT en 1997 (van Soolingen et coll., 1997). Les cas d'infection à *M. canettii* n'ont été décrits que chez des patients originaires ou ayant séjourné en Afrique de l'Est. (Pfyffer et coll., 1998; Miltgen et coll., 2002).

Caractères	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis BCG</i>	<i>M. caprae</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. microti</i>	<i>M. canettii</i>
Aspect des colonies	Rg/E	L/D	Rg/E	L/D	R/D	minuscule	Très lisse
Type respiratoire	aérobie	Micro aéroophile	Micro aéroophile	Micro aéroophile	Micro aéroophile		
Catalase 68°C, 20mn	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate	+	-	-	-	V	-	+
Niacine	+	-	-	-	V	+	-
Sensibilité au PZA	S	R	R	S	S	S	S
TCH	+	-	-	-	+/-	-	+

PZA: pyrazinamide; TCH: thiophen-2-carboxylic acid

Rg : rugueux ; E : eugonique ; L : lisse ; D : dysgonique ; V : variable ; + : positif ; - : négatif ; S : sensible ; R : rugueux ; TCH+ : croissance ; TCH- : absence de croissance.

Tableau 1 Caractères cultureux et biochimiques des espèces du complexe *M. tuberculosis*

Chapitre III ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA TUBERCULOSE HUMAINE ET BOVINE EN AFRIQUE

III-1 Epidémiologie de la tuberculose humaine

La recrudescence de la tuberculose dans le monde est devenue un sujet d'inquiétude pour les spécialistes, les politiciens et le public (Billo, 1996). Pourtant à partir de 1952, avec l'apparition d'une chimiothérapie efficace le déclin de la tuberculose était réel, cependant la diminution du risque d'infection entre les pays développés et l'Afrique était sensiblement différente, 10 à 15% pour les premiers contre 3% seulement pour l'Afrique sub-saharienne. Dès 1986, on a assisté à une recrudescence de la tuberculose dans le monde. Les causes évoquées pour expliquer cette recrudescence sont l'épidémie d'infection par le VIH, la migration importante des populations, et l'augmentation de la résistance à plusieurs antibiotiques antituberculeux (Bloch et coll., 1994; Frieden et coll., 1993 ; Grosset, 1993). Selon l'OMS, un tiers de la population mondiale est infecté par un membre du complexe *M. tuberculosis* et environ 10 millions d'entre eux font une tuberculose maladie et presque 3 millions en meurent (Dolin et coll., 1994). En Afrique, de tous temps la tuberculose a constitué un fléau malgré les efforts des programmes de lutte. L'importance de l'endémie tuberculeuse et la prévalence élevée de l'infection à VIH ont rendu cette situation plus tragique qu'ailleurs. Dans la plupart des pays africains le taux d'incidence annuel varie entre 100 et 500 cas pour 100'000 habitants (Massenet et coll., 1994; Kallenius et coll., 1999; Heyderman et coll., 1998; Niobe-Eyangoh et coll., 2003; Lockman et coll., 2001). Les mauvaises conditions socio-économiques des populations africaines contribuent à la maintenance de ces taux d'incidences très élevés (Heyderman et coll., 1998).

Le complexe *M. tuberculosis* comprend les espèces génétiquement liées et pathogènes, malgré leur lien génétique très prononcé, ces espèces diffèrent dans leur épidémiologie. En Afrique, toutes les espèces décrites ont été isolées chez l'homme avec des fréquences variables. Les premiers isolements effectués en Afrique ont été identifiés comme *M. tuberculosis* ou *M. bovis* sur la base des caractères cultureux et biochimiques. A partir de 1968 avec la découverte de *M. africanum* (Castets et coll., 1968) et l'utilisation des méthodes de biologie moléculaires dans le diagnostic de la tuberculose, *M. tuberculosis* et *M. africanum* se positionnent comme les principaux agents causaux des tuberculoses pulmonaires en Afrique (Viana-Niero et coll., 2001;

Huet et coll., 1971; Källenius et coll., 1999; Niemann et coll., 2002b). Géographiquement, il existe deux sous- types de *M. africanum*: le sous-type I qu'on rencontre surtout en Afrique de l'Ouest avec des caractères phénotypiques proches de *M. bovis* et le sous-type II plus fréquemment isolé en Afrique de l'Est avec des caractères semblables à *M. tuberculosis* (Niemann et coll., 2002b).

L'isolement de *M. bovis* chez l'humain est relativement rare au vue des travaux effectués en Afrique (Idigbe et coll., 1986; Hoffner et coll., 1993; Kazwala et coll., 2001a; Koeck et coll., 2002), cela pourrait s'expliquer par le fait que les laboratoires dans les pays en développement et plus particulièrement en Afrique concentrent leur effort sur l'isolement de *M. tuberculosis*, sachant que certaines conditions favorables à *M. tuberculosis* sont tout à fait néfastes pour la mise en évidence de *M. bovis* (par ex: présence de la glycérine dans le milieu de culture). Dans certains pays africains moins nantis, le diagnostic de laboratoire ne se résume qu'à la microscopie, alors que cette dernière ne fait pas de distinction entre les espèces de mycobactéries (Cosivi et coll., 1995). Il faut noter le manque de ressources pour mener à bien le diagnostic microbiologique de la tuberculose jusqu'au stade de l'identification des espèces impliquées (Kleeberg, 1984). En définitif le rôle attribué à *M. bovis* dans les cas de tuberculose en Afrique reste mal défini (Cosivi et coll., 1998).

Sachant que la tuberculose due à *M. bovis* est une zoonose et que son réservoir constitue l'animal infecté d'une part, et d'autre part dans la majorité des pays africains aucune mesure n'est appliquée en vue d'estimer la prévalence de l'infection et d'éliminer la maladie au niveau du cheptel, malgré le manque de preuves bactériologiques, nous sommes en mesure de comparer la situation de l'Afrique aujourd'hui à celle qui prévalait en Europe avant l'instauration de la pasteurisation du lait et l'éradication de la maladie par élimination des réacteurs détectés dans les élevages. La proportion des cas de tuberculoses humaines due à *M. bovis* dépend de l'importance de l'infection animale, des conditions socio-économiques de la population, de la situation en hygiène alimentaire et des mesures préventives utilisées pour lutter contre la propagation de *M. bovis* (Moda et coll., 1996). *M. bovis* se transmet généralement par ingestion du lait ou de la viande contaminé et cause des tuberculoses extra- pulmonaires surtout chez les enfants (Kleeberg, 1984; Dankner et Davis, 2000). En Tanzanie, Kazwala a démontré qu'il existait une corrélation positive entre le ratio de la population bovine sur la population humaine totale et la proportion du nombre de cas de tuberculoses extra- pulmonaires sur le nombre total de tuberculoses humaines (Kazwala, 1996). *M. bovis* a

été plusieurs fois isolés du lait (Okolo, 1992; Kazwala et coll., 1998; Vekemans, 1999). Les souches de *M. canettii* isolées jusqu'alors l'ont été que chez des sujets qui sont originaires ou ont séjourné en Afrique de l'Est (Van Soolingen et coll., 1997; Pfyffer et coll., 1998; Miltgen et coll., 2002; Simon et coll., 2003).

III-2 Epidémiologie de la tuberculose bovine

M. bovis est le principal agent causal de la tuberculose du bétail cependant il peut infecter d'autres animaux domestiques et sauvages (Thoen, 1994; Cosivi et coll., 1995). L'implication de *M. tuberculosis* dans les cas de tuberculose bovine est rare (Sulieman et Hamid, 2002; Vekemans et coll., 1999). La prévalence de la tuberculose bovine varie sensiblement d'une zone géographique à une autre, comme par exemple en Tanzanie, la prévalence individuelle de bovins tuberculine positifs était de 13.2% dans la zone des haut plateaux au Sud (Kazwala et coll., 2001b), alors que aux alentours du Lac Victoria la prévalence n'était que de 0.2% (Jiwa et coll., 1997). Elle dépend aussi du mode d'élevage pratiqué, généralement, les taux de prévalence élevés sont enregistrés dans les élevages sédentaires ou ceux qui font de la production laitière (Cosivi et coll., 1995), car dans ces conditions de confinement la transmission de l'infection par contact est plus évidente. En Afrique, le problème lié à la tuberculose bovine est négligé, il n'existe pratiquement pas de données fiables sur l'ampleur de la maladie. Les indications sur la prévalence de la tuberculose bovine sont très rares (Benkirane, 1998). En 1993, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a initié une réunion sur la tuberculose zoonotique en collaboration avec la FAO où il a été mentionné que plus de 90% de la population bovine africaine n'est soumise à aucun test de contrôle du *M. bovis* (Veterinary Public Health Unit, 1994). Selon l'Office International des Epizooties (OIE), 32/ 50 pays africains ont signalé la présence de la tuberculose bovine en 2002 et un seul pays à savoir la Libye a eu à le confirmer par le test de tuberculination et l'isolement de l'agent causal. Ceci démontre l'absence d'un dispositif de surveillance de la maladie en Afrique sub-saharienne. Des travaux effectués dans des zones à forte prévalence de tuberculose bovine ont indiqué que cette maladie constituait un risque pour la santé humaine (Mposhy et coll., 1983; Bonsu et coll., 2000; Kazwala et coll., 2001b; Ameni et coll., 2003). Les études sur la surveillance de la tuberculose bovine au niveau des abattoirs en Afrique ne font que confirmer la présence de la maladie et les

taux de prévalence varient selon les abattoirs et les saisons (Delafosse et coll., 1995; Igbokwe et coll., 2001; Doutoum et Toko, 2002).

III-3 La Tuberculose- Zoonose

La tuberculose humaine causée par *M. bovis* est une zoonose. La tuberculose bovine peut être transmise à l'homme par l'ingestion d'aliments contaminés. Les animaux jouent un rôle essentiel en entretenant l'infection dans la nature et l'homme n'est alors qu'un hôte accidentel (Acha et Szyfres, 1989).

La tuberculose chez les mammifères est généralement causée par un membre du complexe *M. tuberculosis*. *Mycobacterium tuberculosis* chez l'humain et *M. bovis* pour les bovins. La fréquence de la tuberculose humaine à *M. bovis* est étroitement liée à la présence de *M. bovis* dans le cheptel bovin. Dans les pays développés, avant la pasteurisation obligatoire du lait et les campagnes d'éradication de la tuberculose bovine, l'infection due à *M. bovis* était importante. En 1945, en Grande-Bretagne, 5% de tous les cas mortels de tuberculose et 30% des cas de maladie chez des enfants de moins de 5ans étaient dus à *M. bovis* (Collins et Grange, 1983). Cette situation reste présente dans les pays où les mesures d'éradication de la tuberculose bovine ne sont pas appliquées (Dankner et Davis, 2000).

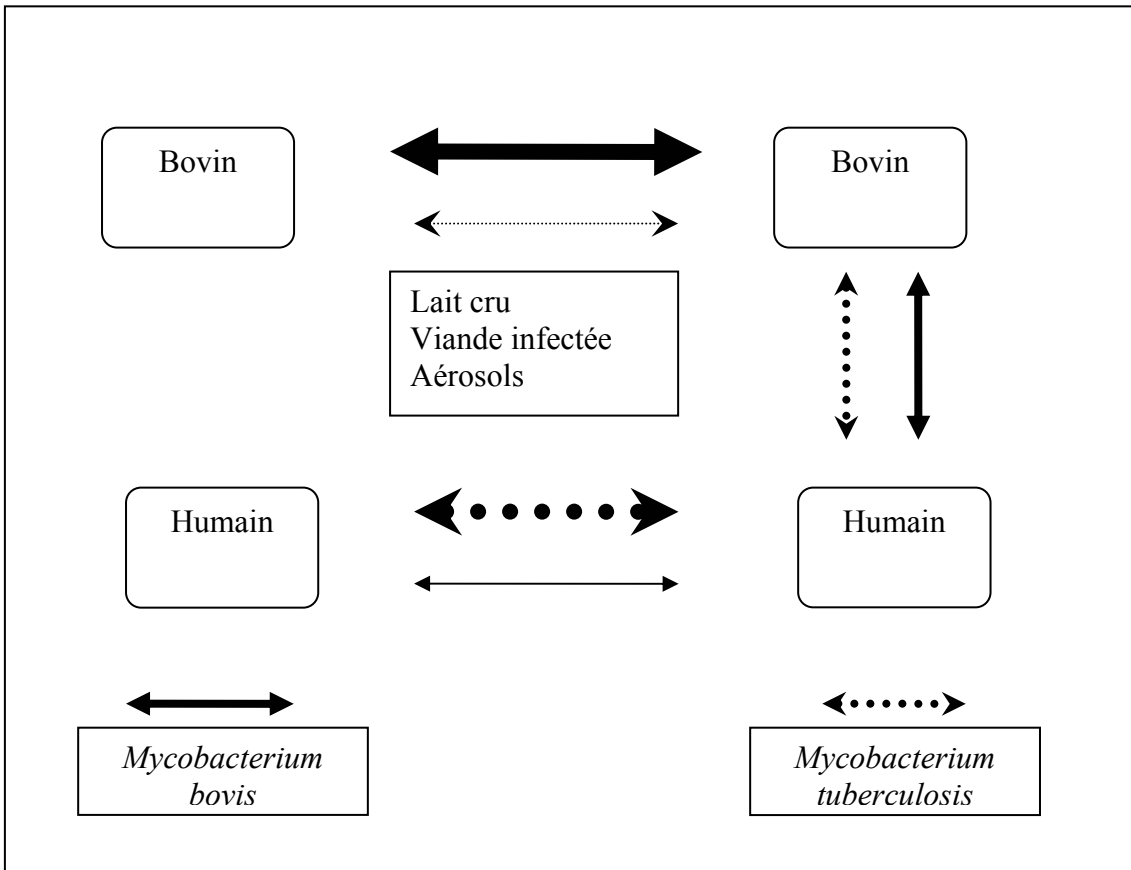


Figure 1 Schéma du mode de transmission de la tuberculose entre l'homme et le bovin.

Chapitre IV SITUATION DE LA TUBERCULOSE AU TCHAD

IV-1 Données générales sur le pays

Pays continental, situé au centre du continent africain et enclavé par 6 pays: la Libye au Nord, le Soudan l'Est, la République Centrafricaine et le Cameroun au Sud et le Niger et le Nigeria à l'Ouest. La république du Tchad a une superficie de 1 284 000 km² et est situé entre les 8^{ème} et 23^{ème} parallèle Nord. Il s'étend sur plus de 1700 Km du désert du Tibesti au Nord aux régions de savane arborées au Sud (Figure 1). La population totale est estimée à 8'123'000 d'habitants en 2003. Cette population est inégalement répartie sur le territoire de 0.18 habitants au km² dans le BET à 46 habitants au km² dans le Logone Occidental avec une moyenne de 6.33 habitants au km². Le taux d'accroissement naturel est estimé à 2.3% par an (BCR, 1994).

L'agriculture joue un rôle majeur dans le développement socio-économique du pays, elle représente 48% du PIB et occupe 80% de la population. L'élevage constitue une importante source de revenu, il procure une activité à environ 40% de la population et contribue à 12.7% du PIB national (ME, 2003).

Le cheptel est composé de bovins, ovins, caprins, équins, asins, camelins et porcins. Les bovins sont les plus nombreux avec plus de 6 millions de têtes et sont disséminés dans tous le pays hormis la zone désertique, la zone d'élevage par excellence de ces derniers est le sahel et le mode d'élevage le plus pratiqué est la transhumance (ME, 1998).

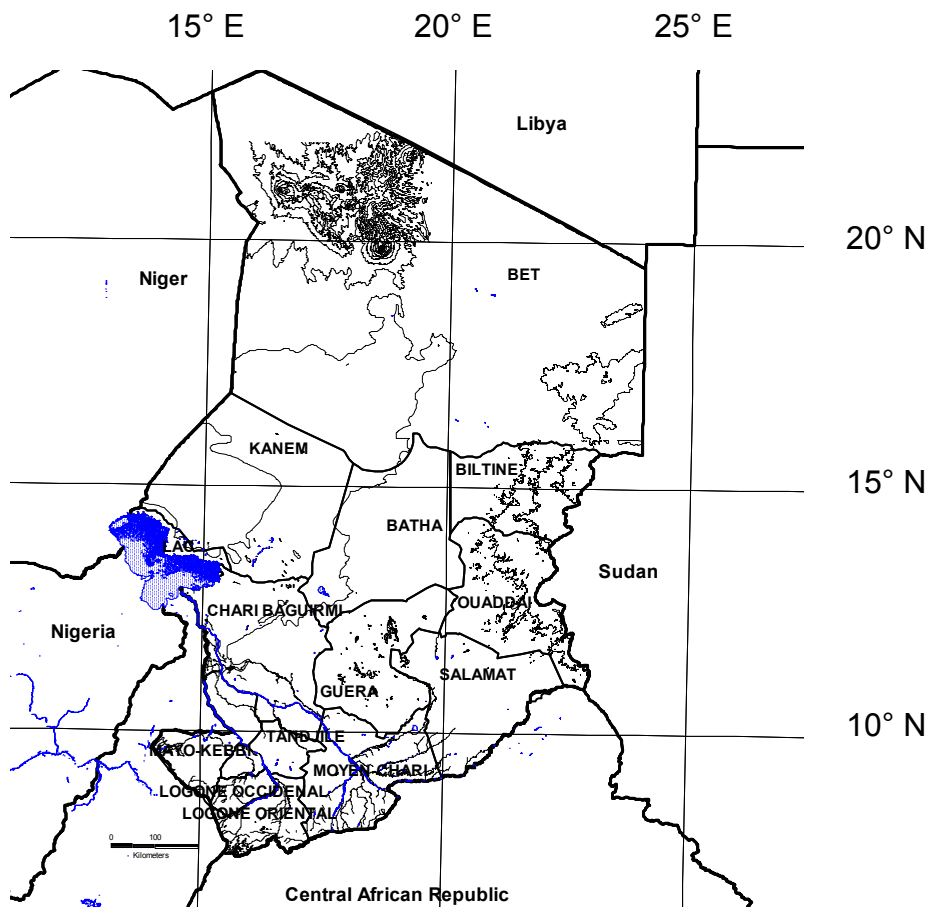


Figure 2 La carte du Tchad

IV-2 La tuberculose humaine

Le Tchad comme la plupart des pays du tiers monde est un pays à forte endémie tuberculeuse. La lutte contre la tuberculose est entièrement organisée par le ministère de la santé publique (MSP) dans le cadre du Programme National de lutte contre la Tuberculose (PNT). Le PNT a été relancé en 1990 avec la mise en place progressive de la stratégie de traitement oral sous supervision directe (DOTS) recommandé par l'Union Internationale de lutte contre la tuberculose et les maladies respiratoires (UICMR) et l'OMS. Le Programme National de Lutte contre la Tuberculose enregistrait un taux annuel de 60 à 120 nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive (TPM+) pour 100'000 habitants et 4'500 décès chaque année avec un risque d'infection annuel de 1.5 à 2% (Norval et Baptiste, 1991; Massenet et Djemadji, 1994).

En 1999, le PNT qui avait pour objectif de détecter 70% des TPM+ et en guérir plus de 85%, ne détectait seulement que 30% des TPM+ et n'en guérissait que 50- 65%

(Norval, 2000). Dans le rapport 2003 de l'OMS, le nombre de tous les nouveaux cas de tuberculose au Tchad est estimé à 18'391 dont 8'039 cas TPM+ et le taux annuel est estimé à 370 cas /100'000 habitants. Les travaux de recherches menées au service de pneumo-phtisiologie de l'hôpital Générale de référence Nationale à N'Djaména nous donne une idée sur l'ampleur de la maladie. Une enquête rétrospective (1995-2001) sur le mal de Pott a montré que cette localisation de la tuberculose représentait 1.79% de toutes les tuberculoses et 16% des tuberculoses extra pulmonaires (Telnyaret, 2003). Les résultats d'une étude prospective sur 8 mois dans le même service a permis d'identifier 262 cas de tuberculeux à microscopie négative parmi 1'449 malades hospitalisés soit 18.08% (Mbaihol, 2003).

IV-3 La tuberculose bovine

Les études ponctuelles et à petites échelles réalisées au Tchad montrent l'existence de la maladie au sein de la population bovine (Schelling et coll., 2000; Delafosse, 2002).

Concernant la tuberculose bovine, les résultats d'inspection aux abattoirs ont toujours eu à notifier des cas de tuberculose sur la base des lésions tuberculeuses. Le suivi aux abattoirs et aires d'abattage ne permet qu'une élimination infime de carcasses infectées car beaucoup d'abattages sont effectués clandestinement. Dans les élevages, les animaux ne sont pas soumis au contrôle systématique de la tuberculose et au cas où ce contrôle est entrepris, les mesures ne peuvent être appliquées par manque de ressources nécessaires pour indemniser les propriétaires. La production et la commercialisation des produits laitiers ne sont soumises à aucun contrôle sanitaire. Par ailleurs, la tuberculose ne provoque pas des cas de mortalité atroce semblable aux grandes épizooties bien présentes au Tchad comme la peste bovine, la péri pneumonie contagieuse bovine ou le charbon. Elle ne constitue donc pas une priorité. Malheureusement, cette période d'inattention favorise son implantation par une transmission active dans les troupeaux et avec un risque plus élevé de contamination humaine par les produits de l'élevage.



Photo 3 Un cas de tuberculose milliaire observé sur une carcasse de zébu Mbororo saisie à l'abattoir de Farcha en Août 2004.

DEUXIÈME PARTIE

BUT DE L'ÉTUDE

BUT DE L'ÉTUDE

Chapitre V OBJECTIF GÉNÉRAL

La tuberculose reste l'un des principaux défis de santé publique sur le plan mondial, malgré la disponibilité du traitement. Au Tchad la tuberculose est un des problèmes majeurs qui relève des systèmes de santé publique. Il est impossible d'avoir des chiffres précis sur la tuberculose tant humaine que animale. Toutefois on assiste à une aggravation de la situation car si en 1990 le taux d'incidence était de 60 à 120cas/100.000, le dernier rapport par pays de l'OMS estime à 370 cas /100 000 habitants. Les raisons de cette dégradation seraient liées à plusieurs facteurs: les mauvaises conditions socio-économiques, la pandémie du VIH/SIDA qui rend la population infectée plus vulnérable aux infections mycobactériennes, ainsi que des mesures thérapeutiques mal appliquées (non application du DOTS).

En ce qui concerne la tuberculose bovine, la situation reste encore plus confuse, néanmoins on assiste vraisemblablement à une augmentation de cas, car si en 1963, les personnes en charge de la santé animale avaient du mal à trouver des cas de tuberculose bovine, ces derniers temps cette pathologie est fréquemment rencontrée lors des abattages et des taux élevés de bovins tuberculine positives ne font que renforcer les suspicions. Au Tchad, il faut noter l'absence totale de mesure de contrôle en vue de limiter la propagation de la maladie tant dans les troupeaux que chez les humains.

Les stratégies pour réduire l'incidence de la tuberculose, demeurent en priorité sur les actions de santé publiques, mais celles-ci doivent être menées conjointement à des recherches en biologie, parmi lesquelles on peut citer: l'identification des souches responsables des infections, l'étude de la résistance aux antibiotiques, qui permet d'adapter les régimes thérapeutiques utilisés et les enquêtes épidémiologiques utilisant les méthodes moléculaires afin de mieux comprendre la dynamique de transmission.

Le diagnostic en laboratoire de la tuberculose chez les humains et les animaux ne se limite que à la microscopie. Bien que ce test ait fait ses preuves dans la détection et le suivi des patients ayant la tuberculose pulmonaire à microscopie positive (TPM+), elle montre des limites dans les cas de tuberculoses à microscopie négative, fréquents chez les patients atteints de VIH/SIDA. Par ailleurs, la microscopie ne révèle qu'un diagnostic du genre *Mycobacterium*, et par conséquent ne permet pas de faire une distinction entre les différentes espèces de mycobactéries.

Ainsi, le but principal de cette étude était d'installer au sein du Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha (LRVZ/F) une unité de culture de mycobactéries, qui conformément aux recommandations de l'unité Santé Publique et Vétérinaire (VPH) de l'OMS et au concept de la « médecine unie » serait en mesure de traiter et de caractériser aussi bien les spécimens d'origine humaine que animale.

Chapitre VI OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

Les objectifs spécifiques sont les suivants:

1. Identifier les souches responsables de la tuberculose chez l'homme et l'animal.
2. Evaluer le polymorphisme génomique des souches issues de l'homme et l'animal.
3. Déterminer les profils de la résistance aux antibiotiques des souches isolées chez les humains.

TROISIÈME PARTIE

MÉTHODOLOGIES

MÉTHODOLOGIES

Chapitre VII ZONES DE COLLECTE ET LIEU DE L'ÉTUDE

VII-1 Zone de collecte

Les prélèvements d'échantillons humains ont été collectés dans les centres de santé de N'Djaména, Dourbali, Massaguet, Mandalia et Am Dobak et ceux des animaux à l'abattoir de N'Djaména. Ces points de collecte sont situés dans deux préfectures du Tchad: le Chari- Baguirmi et le Kanem. Les deux préfectures se trouvent en zone sahélienne, zone médiane entre le Nord désertique et le Sud soudanien. La description géographique de cette zone a fait l'objet d'une étude préliminaire détaillée (Wiese, 2004) dans le cadre du projet « Santé des nomades au Tchad ».

VII-2 Lieu de l'étude

VII-2-1 Au LRVZ/F, N'Djaména- TCHAD

Les travaux liés au diagnostic de la tuberculose au Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechnique de Farcha (LRVZ/F) sont effectués dans 3 salles différentes:

- la salle pour la préparation du milieu de Löwenstein- Jensen,
- la salle pour le traitement des échantillons et leur mise en culture, cette salle est munie d'une hotte de biosécurité de classe II, d'une centrifugeuse, d'un microscope optique et d'une étuve.
- la salle chaude qui sert d'étuve pour le suivi des cultures une semaine après la mise en culture.

Afin d'éviter les contaminations entre les prélèvements d'origine humaine et animale, le traitement des échantillons d'origines animale ont été effectués de Juillet à Octobre et le reste du temps a été réservé aux prélèvements humains. Les mesures de sécurité (voir en annexe) sont observées par toutes les personnes travaillant au sein de ce laboratoire.

VII-2-2 Au CNM, Zurich- SUISSE

Dans le Centre National des Mycobactéries (CNM), la caractérisation génomique des isolats de mycobactéries obtenus au Tchad par les méthodes de biologie moléculaire a été effectué ainsi que le test de sensibilité aux antibiotiques par la méthode MGIT sur appareil BACTEC MGIT 960

VIII-1 Le recueil des prélèvements

Les spécimens humains en général (crachats et urines) proviennent des centres de santé et sont transportés dans des pots fournis par le projet. Les informations concernant les patients sont enregistrées sur une fiche individuelle. Les spécimens d'origine animale sont directement collectés à l'abattoir dans des pots stériles accompagnés d'une fiche avec les informations sur l'animal échantillonné. Tous les prélèvements sont transportés sous glace au LRVZ/F.

VIII-2 L'examen microscopique

La méthodologie utilisée est celle de Ziehl- Neelsen. Un frottis sur lame est confectionné pour tout prélèvement reçu au laboratoire, après avoir séché la lame, cette dernière est fixée par 3 passages rapides sur la flamme, ensuite le frottis est coloré et lu au microscope optique sous immersion.

VIII-3 La culture des mycobactéries

Tous les spécimens réceptionnés au niveau du laboratoire sont décontaminés par la méthode N-Acetyl-L-Cystéine (0.5%NALC)- 2%NaOH (Kent et Kubica, 1985) avant d'être ensemencés sur 3 milieux à raison d'un tube par milieu. Les milieux utilisés sont : le milieu classique de Löwenstein- Jensen avec 0.5% de glycérine, le milieu de Löwenstein- Jensen avec 0.6% de pyruvate et le milieu liquide à base de Middlebrook 7H9 additionné de l'OADC et du PANTA utilisé pour le MGIT. Les cultures sont incubées à 37°C sans apport en CO₂. Elles doivent être bien aérées et avoir un temps d'incubation suffisant (8 semaines) avant de les déclarer négatives. La lecture se fait une fois par semaine.

VIII-4 L'identification phénotypique

Cette identification a été faite sur la base des caractères cultureux et des tests biochimiques (Kent et Kubica, 1985). Dès l'apparition de colonies sur les milieux solides ou bien d'une croissance en milieu liquide, le passage a été effectué sur 3 tubes. Le suivi des tubes a permis de déterminer la vitesse de croissance, la forme et la couleur des colonies. Les cultures âgées de 2 semaines ont été testées pour leur activité

catalytique thermolabile (20mn à 68°C) et lorsque ce test était positif, la culture a été classifiée comme une mycobactérie non tuberculeuse et les deux autres tests n'ont pas été effectués pour ces dernières. Pour les cultures catalase négatives, les cultures ont été incubées 2 semaines encore, avant de les tester pour la réduction des nitrates et l'accumulation de la niacine, ces deux tests sont positifs pour *M. tuberculosis* et négatifs pour *M. bovis*. Le test de Lebek n'a pas été réalisé systématiquement.

VIII-5 Le test de sensibilité aux antibiotiques

Le test de sensibilité aux antibiotiques a été réalisé selon la méthode des proportions sur milieu gélosé avec les disques imprégnés d'antibiotique (Kent et Kubica, 1985).

VIII-6 Le «Real time PCR»

Cette méthode a été utilisée pour confirmer l'appartenance des isollements effectués au Tchad au complexe *M. tuberculosis*. La technique a été appliquée selon la procédure décrite par Kraus et coll. (2001).

VIII-7 Le «Spoligotyping»

Cette méthode repose sur la détection du polymorphisme des séquences inter- DR de la région DR (Direct Repeat). La région DR fait partie des séquences courtes répétées, elle a été identifiée et caractérisée par Hermans et collaborateurs (Hermans et coll., 1991). Le nombre total de copies répétées est de 49 chez *M. bovis* BCG. Cette région est un site unique présent exclusivement chez les bacilles de la tuberculose. Sur la base des séquences inter- DR, connues et présentes dans la région DR des souches *M. tuberculosis* H37Rv et *M. bovis* BCG P3, 43 oligonucléotides synthétiques ont été fixées en ligne sur une membrane (37 séquences inter-DR de *M. tuberculosis* et 6 séquences inter-DR de *M. bovis*) (Kamerbeek et coll., 1997). La méthode consiste à examiner la présence de ces séquences inter-DR dans une souche inconnue du complexe *M. tuberculosis*. Le locus DR entier de la souche est amplifié par PCR en utilisant des amorces complémentaires à la séquence DR orientée vers l'extérieur de la région conservée. Les produits PCR, qui sont de taille différente, sont appliqués en orientation inverse sur la membrane, portant 43 oligonucléotides synthétiques qui y sont fixés. Par le fait que une des amorces soit marqué à la biotine, l'hybridation sur les oligonucléotides synthétiques est visualisée par chimioluminescence. L'interprétation se

fait en code binaire selon que l'hybridation de chaque séquence inter-DR est positive ou négative. Le spoligotyping est plus discriminant que le RFLP IS6110 pour le typage des souches ayant moins de 5 copies IS6110. Il permet l'identification différentielle des souches à l'intérieur du complexe *M. tuberculosis* (Tableau 2). Le spoligotyping a été utilisé pour différencier les souches *M. bovis* et *M. tuberculosis*. La méthode décrite par Kamerbeek et coll., 1997) a été utilisée.

VIII-8 RFLP IS6110

Elle consiste en l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ADN après hybridation avec une sonde spécifique. L'ADN génomique est digérée par une enzyme de restriction, les fragments sont séparés par électrophorèse en gel d'agar puis transférés sur membrane. Cette membrane est alors hybridée avec une sonde constitué d'un élément répété dans le génome. On révèle par marquage chimioluminescent, les fragments d'ADN ou la sonde a hybridé. La méthode de typage de la séquence d'insertion 6110 (IS6110) par RFLP est standardisée et constitue la méthode de référence largement utilisée dans le monde (van Embden et coll., 1993). L'IS6110 est une séquence d'insertion spécifique des bacilles de la tuberculose, elle a été isolée à partir d'une banque cosmétique de *M. tuberculosis* (Thierry et coll., 1990). Elle possède 1355pb avec des répétitions inversées de 25 et 28pb à chaque extrémité. Le nombre de copies varie de 0 à 25 chez *M. tuberculosis*, de 5 à 16 chez *M. africanum*, 10 à 20 chez *M. microti* et entre 1 et 8 chez *M. bovis*, cependant il faut noter l'existence de certaine souches de *M. tuberculosis* sans IS6110 ou ayant une seule copie, qui ont été décrites en Asie (Narayanan et coll., 1997) ou encore des souches de *M. bovis* avec 20 copies, décrites en Arabie Saoudite et aux Pays-Bas. Dans notre étude, cette méthode a été utilisée pour statuer sur le nombre de bandes existant chez les souches *M. bovis* isolées du Tchad.

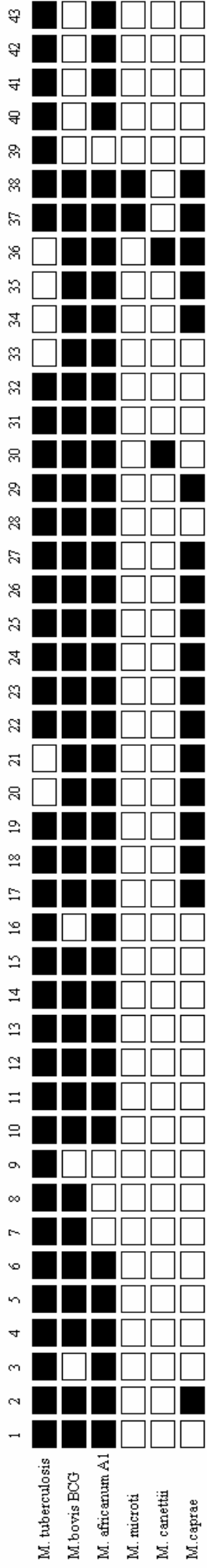


Figure 3 Profils génomiques en spoligotyping des membres du complexe *M. tuberculosis*

QUATRIÈME PARTIE

RÉSULTATS

Chapitre IX

***Mycobacterium bovis* Isolates from Tuberculous Lesions in Zebu Carcasses at the Slaughterhouse of N'Djaména, Chad**

Diguimbaye-Djaibé C.¹, Schelling E.², Hilty M.², Ngandolo R.¹, Mahamat HH.¹, Pfyffer G. E.³, Baggi F.⁴, Hewinson G.⁵, Tanner M.², Zinsstag J.²

¹ Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha, N'Djaména, Chad

² Swiss Tropical Institute, Basel, Switzerland

³ Department of Medical Microbiology, Kantonsspital Luzern, Luzern, Switzerland

⁴ National Center for Mycobacteria, University of Zurich, Switzerland

⁵ Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, United Kingdom

Draft paper to be submitted to *Journal of Clinical Microbiology*

Abstract

Bovine tuberculosis was one of the main causes for carcass condemnation at the largest slaughterhouse in N'Djaména, Chad. During a prospective study (July to August 2002) at the slaughterhouse meat inspectors have condemned 727/10'000 cattle carcasses due to tuberculosis-like lesions. A significantly higher proportion of Mbororo than Arab cattle carcasses were entirely declared unfit in comparison to partial condemnation of carcasses (33% versus 9%, $p = 0.002$). Microbiological examination of 201 lesions from 75 Mbororo zebu and 124 Arab zebu carcasses confirmed bovine tuberculosis by isolation of *Mycobacterium bovis*. *M. bovis* was more often cultured from specimens of Mbororo than of Arab cattle ($p = 0.004$). Spoligotypes of 53 out of 55 (96.4%) *M. bovis* isolates showed lack of the spacer 30 as has been described for isolates from Cameroon. Our strains were isolated from a slaughterhouse with a bovine tuberculosis prevalence of 7% and 92.7% of strains were clustered. This indicates a high recent transmission rate.

Keywords: *Mycobacterium bovis*, zebu, Arab breed, Mbororo breed, slaughterhouse, spoligotyping, Chad

Introduction

The importance of *Mycobacterium bovis* in African livestock production and its possible role in the human tuberculosis epidemic is not well known. Investigations should therefore aim at cultivating the agent for its proper characterization (1). The slaughterhouse of Farcha (Société Moderne des Abattoirs) in N'Djaména is the largest one in Chad. Among the 50'000 animals that are slaughtered annually, the main species are cattle followed by small ruminants (5). The cattle population of Chad was estimated to be 5'595'000 in 2000 and is mainly composed of the zebu breeds (*Bos indicus*) Arab, Peul, Mbororo, with the Toupouri and Kouri breeds (*Bos taurus*) less common. It is estimated that 90% of all slaughtered cattle are of the Arab breed, with 7% Mbororo and 3% Kouri (13). Several studies in slaughterhouses have demonstrated that tuberculosis is an important cause of condemnation, causing approximately 9% of all inspected carcasses to be condemned (12). A retrospective study on causes of condemnation after meat inspection at the slaughterhouse of Farcha showed that (i) most carcasses with tuberculous lesions were detected between the months of July and November, and (ii) more Mbororo cattle than animals of other breeds had tuberculosis-like lesions (42/60 versus 132/1539) (11).

Tuberculin-positive cattle have been detected in Chadian cattle herds (18, 4). At the slaughterhouse, the diagnosis of tuberculosis is mainly based on the typical macroscopic lesions of the organs rather than on Ziehl-Neelsen stained smears. Confirmation of a suspected diagnosis of bovine tuberculosis after meat inspection has so far not been confirmed by the isolation of *M. bovis* in Chad . Laboratory diagnosis of bovine tuberculosis is based on microscopy, culture and identification of the organism with biochemical and molecular methods (16). A study of specimens from N'Djaména by Perpézat in 1963 (17) suggested that farcy (caused by *Nocardia farcinogenes*, later named *Mycobacterium farcinogenes* (2)) rather than bovine tuberculosis (*M. bovis*) was important among Chadian zebus.

This study was aimed at isolating *M. bovis* from specimens of Mbororo and Arab cattle in Chad, at characterizing the strains with biochemical and molecular methods, and at comparing the isolates with *M. bovis* strains from neighboring countries.

Materials and Methods

1. Carcasses and specimens

At the Farcha slaughterhouse 727/10'000 cattle carcasses (7397 zebu Arab, 2596 zebu Mbororo and 7 Kouri cattle) were condemned due to tuberculous lesions upon meat inspection between July 1st and August 31st 2002. A sample from approx. every fourth condemned carcass was collected between July 11th and August 29th 2002. Specimens from 201 affected organs (lymph nodes, lungs, and liver) from 199 carcasses were transported on ice to the Chadian National Veterinary and Animal Husbandry Laboratory (Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha) and stored there at -20 °C prior to processing. For each specimen, the following information was collected by two trainees: breed, sex, partial or total condemnation of the carcass, date of collection, and nature of specimen (6).

2. Specimen processing and cultivation of acid-fast bacilli (AFB)

Specimens were washed three times with sterile, distilled water. Tissue samples were cut into 5 or 6 pieces and put in a sterile plastic bag containing 10 ml of sterile saline for homogenization. Samples were homogenized in a blender (type STOMACHER 80; Seward Laboratory Systems, Bristol, U.K.) for 1 min, and repeated three time. Ten milliliters of the suspension were transferred into a 50 ml conic FALCON® tube for decontamination. Homogenized suspensions were decontaminated with N-acetyl-L-cysteine sodium hydroxide (0.5% NALC- 2% NaOH) (10) and inoculated on two Löwenstein-Jensen (LJ) slants containing a) glycerol (0.75%) and b) pyruvate (0.6%), but no glycerol. In addition, Middlebrook 7H9 medium containing OADC and PANTA (polymyxin, amphotericin B, nadilixic acid, trimethoprim, azlocillin) was prepared. Inoculated media were incubated at 37°C (without CO₂) for 8 weeks. Smears were prepared with one drop of the sediment after centrifugation of the homogenized suspensions for detection of AFB by microscopy.

3. Identification of mycobacterial isolates

Growth of mycobacteria was confirmed by smear (stained by the Ziehl-Neelsen method). AFB-positive colonies were subcultured on 3 LJ slants and a Middlebrook 7H10 agar plate.

Three biochemical tests (nitrate, niacin, and 68°C catalase) (9) were used to identify mycobacteria and to distinguish between *M. tuberculosis* complex (MTC) and non-tuberculous mycobacteria (NTM).

Species identification was performed by real time PCR (10) to confirm MTC isolates.

4. Genotyping of MTC strains

Genotyping of *M. tuberculosis* complex (MTC) strains was done at the National Center for Mycobacteria (NCM) by spoligotyping (8) and IS6110-based analysis of restriction fragment length polymorphism (RFLP) (21). The latter was carried out with 50 % of spoligotypes. Spoligotyping of all strains was repeated at the Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, to confirm the results of the first spoligotyping round.

Additionally, the presence of spacers 14 and 15 for 15 strains with weak or absent signals in spoligotyping was confirmed by a PCR reaction with a primer-pair bridging the DNA region from spacer 14 (3' gtgtgatgcggatggtcggctc 5') to 22 (5' tgtctcaatcgtgccgtctcggg 3') (22). The PCR reaction mixture contained 1x *Taq* PCR buffer, deoxynucleoside triphosphates (0.2 mM each), 1 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Perkin-Elmer Applied Biosystems), a 0.5 µM concentration of the primer pair and mycobacterial DNA to a final volume of 20 µl. After 10 min at 95°C, the PCR was performed for 40 cycles of 0.5 min at 94°C, 0.5 min at 65°C and 1 min at 72°C. The reactions were terminated after an incubation of 10 min at 72°C. PCR fragments were analyzed by agarose gel electrophoresis using 2 % NuSieve agarose. The size of the amplicons was compared with a positive control of spacers 14 and 15.

5. Statistical analysis

A Chi-square test was used to analyze the co-variables (condemnation, culture growth) between breeds. A multivariate regression model with *M. bovis* isolation as the outcome was adjusted for co-variables. Cluster analysis was done with SAS (Version 8.02 Proc cluster, USA Statistical Analysis Systems Inc., Cary, NC/ USA). The relationship of clusters to geographical origin of animals, breed and type of condemnation was done by the Fisher test (SAS, proc freq).

Results

The overall prevalence of suspect lesions was 7.3%. A significantly higher ($p = 0.04$) prevalence was found among Mbororo (8.2%; 212/2596) than Arab cattle (7%; 515/7397) (6). Lesions were mainly found in the lymph nodes and lungs (Table 1). At the slaughterhouse and in the sub-sample of 199 animals, entire condemnation of the carcass in comparison to partial condemnation was observed more often among Mbororo than Arab cattle ($p \leq 0.001$ and $p = 0.002$) (Table 2). This difference between the two breeds was even more accentuated in female cattle.

Organ/ Tissue	n	Condemnation		Breed		Sex	
		Entire	Partial	Arab	Mbororo	Male	Female
Lymph nodes	116	17	99	67	49	8	108
Lungs	75	13	62	51	24	1	74
Lungs and lymph nodes	2	0	2	2	0	0	2
Liver	5	0	5	4	1	0	5
Miliary tuberculosis	1	0	1	0	1	0	1
Total	199	30	169	124	75	9	190

Table 2 Specimens collected at the main slaughterhouse of N'Djaména, Chad, and specifications of the condemned carcasses

Condemnation	Breed		Total	p
	Arab	Mbororo		
Partial	113	56	169	
Entire	11	19	30	0.002
Total	124	75	199	

Table 3 Slaughterhouse data of investigated zebu carcasses at the slaughterhouse of N'Djaména, Chad

The proportion of positive specimens smears was relatively low (21.6%), with no difference evident between the two breeds (Table 4). Most AFB-positive smears

originated from lymph nodes (18%) and lungs (26%), while liver specimens (n=5) were always AFB-negative.

AFB-smear	Breed		Total	p
	Arab	Mbororo		
Positive	26	17	43	0.734
Negative	100	58	158	
Total	126	75	201	

Table 4 Microscopy results of specimens from Chadian Mbororo and Arab cattle

Of 201 specimens which were inoculated onto three types of media, 132 (65.7%) showed growth of mycobacteria on at least one medium, whereas 55 (27.3%) remained culture negative. Fourteen (7%) cultures were contaminated (Table 5). Ninety-eight of 161 (61%) AFB smear-negative specimens became culture positive.

Cultures	Breed		Total	p
	Arab	Mbororo		
<i>M. bovis</i>	26	29	55	0.004
NTM	55	22	77	0.592
Negative	37	18	55	
Contaminated	8	6	14	
Total	126	75	201	

Table 5 *M. bovis* and NTM cultures from Chadian Mbororo and Arab cattle

Culture morphology and biochemical tests identified 58 MTC and 26 Non-Tuberculosis Mycobacteria (NTM) strains. Real-time PCR confirmed that 56 strains belonged to MTC and 28 strains were NTM. 55 MTC strains were of the *M. bovis* spoligotype, while 1 failed to give a spoligotype pattern. Overall, *M. bovis* was isolated from more than a fourth of tissues in which tuberculosis had been suspected and in 42% of all positive cultures. There were significantly more *M. bovis* strains isolated from Mbororo zebu (29/75) than from Arab zebu (26/124) ($p = 0.004$) (Table 5). The difference remained statistically significant when including the type of condemnation and type of organ in a multivariate logistic regression model.

In total, twelve different spoligotypes were found among the 55 *M. bovis* isolates, with only four spoligotypes were unique. Eight clusters of spoligotypes were identified. The number of strains per cluster varied between 22 and 2 (Figure 4). We found that 5/8 clusters were composed of strains which have been isolated from Mbororo and Arab zebus. The distribution of the two breeds (Mbororo and Arab) within cluster differ significantly ($p < 0.01$).

All strains lacked spacers 3, 9, 16, 39-43 which is a characteristic of *M. bovis*. In addition, 53/55 strains did not have spacer 30. Upon RFLP analysis, the cluster 5 identified by RFLP was distinct in its spoligotypes (SP5 & 6); however, other RFLP clusters could not be further distinguished by spoligotypes (Figure 5). For clusters RFLP1, 3b, 5 and 6a, a second band was visible, while a second band was missing for RFLP2, 3a, 4 and 6b.

All Chadian strains showed a different RFLP pattern when compared with the BCG reference strain of the NCM Zurich (clinical *M. bovis* BCG isolate after BCG vaccination at the pediatric hospital of Zurich in 1999).

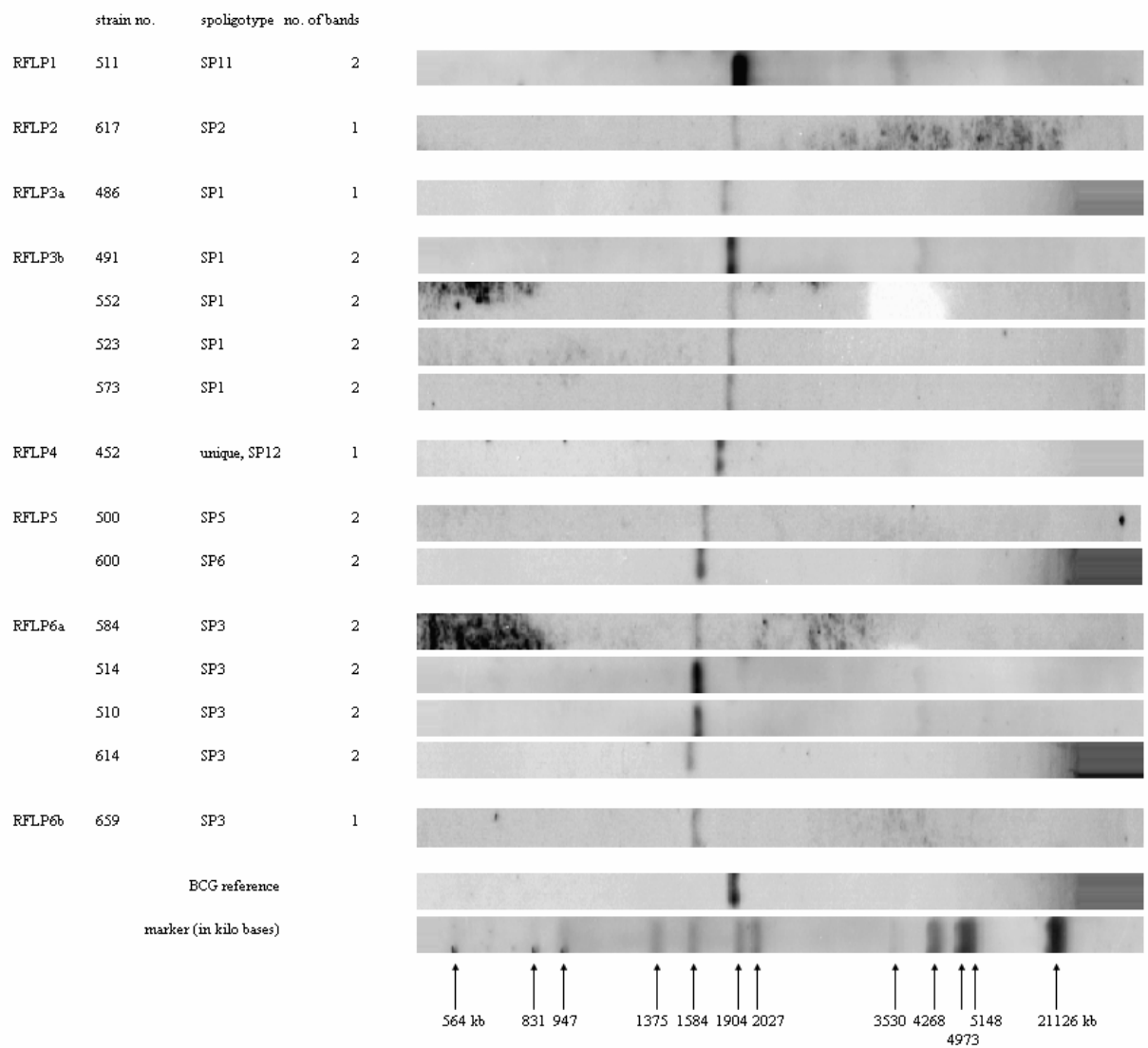


Figure 5 RFLP patterns of 15 Chadian *M. bovis* strains of which 14 were within spoligotype clusters

In total, twelve different spoligotypes were found among the 55 *M. bovis* isolates, with only four spoligotypes were unique. Eight clusters of spoligotypes were identified. The number of strains per cluster varied between 22 and 2 (Figure 4). We found that 5/8 clusters were composed of strains which have been isolated from Mbororo and Arab zebu. The distribution of the two breeds (Mbororo and Arab) within clusters differ significantly ($p < 0.01$).

All strains lacked spacers 3, 9, 16, 39-43 which is a characteristic of *M. bovis*. In addition, 53/55 strains did not have spacer 30. Upon RFLP analysis, the cluster 5 identified by RFLP was distinct in its spoligotypes (SP5 & 6); however, other RFLP clusters could not be further distinguished by spoligotypes (Figure 5). For clusters RFLP1, 3b, 5 and 6a, a second band was visible, while a second band was missing for RFLP2, 3a, 4 and 6b.

All Chadian strains showed a different RFLP pattern when compared with the BCG reference strain of the NCM Zurich (clinical *M. bovis* BCG isolate after BCG vaccination at the pediatric hospital of Zurich in 1999).

Discussion

For the first time, *M. bovis* has been isolated in specimens from Chad. The prevalence of tuberculin-positive cattle was 0.8% (95% confidence interval 0.2- 1.4%) in the East (Ouaddaï region) (4) and 16.9% (95% CI 10.4 – 23.5%) in the West of Chad (Chari- Baguirmi and Kanem regions) (18). The latter study has been continued with 476 additional cattle in 34 herds and a prevalence of 11.5% (95% CI 6.9 – 18.5%) was found when considering the herds as a random effect in the model. More tuberculin reactors were found among Mbororo than Arab zebu ($p = 0.02$).

Usually, cattle breeds are not restricted to specific geographical zones in Chad; however, a high proportion of Mbororo cattle was found in the West of the country (14). At Farcha, the most frequently slaughtered breeds were Mbororo and Arab zebu. Mbororo zebu showed generalized tuberculosis more often than Arab zebu which was reflected in the data through a higher proportion of these animals having their entire carcass condemned. Similarly, a higher susceptibility of Mbororo cattle to tuberculosis infection was also observed in Cameroon (15).

It would be interesting to understand the immunological basis of this susceptibility in greater depth since it may have a bearing on the development of an improved livestock vaccine.

Sixty-five percent of specimens with tuberculosis lesions were culture-positive; however, only one fifth (21%) were smear positive. In this study, the proportion of smear-positive specimens was low in comparison to Sudan (53%; [20]). Spoligotyping was used as a diagnostic tool, but also yielded important insight into the epidemiology of *M. bovis*. The spectrum of spoligotype clusters differed between Mbororo and Arab zebu, but not between the type of condemnation. Spoligotype clusters could not be related to geographical origin. However, most of the cattle were bought at local markets and their geographical origin was not known. The finding that 51/55 isolates (92.7%) were in 8 clusters indicates a substantial degree of recent transmission, an observation that is underlined when the prevalence of tuberculosis lesions at the slaughterhouse is considered (7%).

Similar to Cameroonian *M. bovis* strains, our isolates most often lacked spacer 30, the only exception being SP11 (Figure 4). A possible explanation for this observation is the cross border movement of Chadian cattle to Cameroon. As in the study conducted by Njanpop-Lafourcade et al. in Cameroun (15), the pre-dominant spoligotype in our study is SP1 (Figure 1) with a cluster of 22 strains (40%). SP1 corresponds to the pattern of cluster C1 in the Cameroonian study and two other clusters described in Cameroon were found in Chad (C1 and C5, similar respectively to SP2 and SP4 in this work). Certain Cameroonian clusters (C7, C8, C9 and C10; [15]) were only detected in the Adamaoua region but not in northern Cameroon or in Chad (our study). Apparently, the established measures of the Cameroonian government to prevent movement of cattle between the Adamaoua and the two regions of the North are effective. As to the other neighboring countries, we have not found any publications related to molecular typing of *M. bovis* strains.

The comparison of the patterns found in Chad with the *M. bovis* spoligotype database (www.mbovis.org) showed that SP1, 2, 4 and 10 have already been described. All other patterns have never been described (www.bovis.org). All strains lacking spacers 27 and 28 (Figure 4) were isolated from Arab cattle. No other characteristics were observed within the spoligotypes for strains isolated from Arab and Mbororo cattle. Fifteen strains (8 from Arab and 7 from Mbororo zebu) were typed with the IS6110 method, of which 11 and 4 isolates contained 2 or 1 band, respectively. Therefore, Chadian *M. bovis* strains belong to low IS6110

copy number strains. Strains lacking spacer 30 had a band at 1.9 kB, in accordance to the findings in Cameroon (15). Cousins *et al.* (3) found that 85 % of *M. bovis* strains showed one band which was mainly at 1.9 kB. No association was found between the number of bands and the cattle breed. IS6110 typing revealed 6 clusters and, thus, is of lower discriminatory power than spoligotyping. However, spoligopatterns were differentiated by RFLP due to the number of visible bands. Earlier, Zumarraga *et al.* (23) concluded that spoligotyping alone is not sensitive enough for the discrimination of *M. bovis* strains for in-depth epidemiological study. It would be interesting to see whether VNTR-typing (19) can improve strain discrimination.

The recent establishment of the first mycobacterial laboratory in Chad allowed a confirmation of the presence of bovine tuberculosis in Chadian herds. Future molecular epidemiology studies are needed to shed light on the transmission of *M. bovis* between Chadian and Cameroonian cattle. The observed higher susceptibility of Mbororo than Arab zebu to *M. bovis* disease should be followed-up by immunological investigations. The Chadian laboratory also diagnoses tuberculosis in humans. Between July 2001 and December 2002, 35 *M. tuberculosis* strains were isolated from sputum and urine specimens. In none of the cases, however, has *M. bovis* been detected. Due to the high prevalence of bovine tuberculosis in slaughterhouses, there is a risk of human exposure to zoonotic tuberculosis. In addition, an indirect transmission from cattle to humans via raw milk is possible. Further studies of populations at risk are needed to define the role of bovine tuberculosis among tuberculosis cases in humans. This will also have implications to treatment schemes since *M. bovis* is intrinsically resistant to pyrazinamide.

Acknowledgements

We thank the technicians of the National Center for Mycobacteria, the Swiss Tropical Institute, and the “Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha” who have contributed to the project. The Swiss National Science Foundation is acknowledged for financial support. This work received support from the NCCR North-South IP-4. We thank Véronique Vincent, Institut Pasteur, Paris, for complimentary analyses and Steve Gordon (VLA Weybridge) for advice and discussion.

References

1. **Ayele, W. Y., S. D. Neill, J. Zinsstag, M. G. Weiss, and I. Pavlik.** 2004. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **8**:924-937.
2. **Chamoiseau, G.** 1974. [*Mycobacterium farcinogenes*, a causative agent of bovine farcy in Africa]. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* **27**:61-65.
3. **Cousins, D., S. Williams, E. Liebana, A. Aranaz, A. Bunschoten, J. Van Embden, and T. Ellis.** 1998. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **36**:168-178.
4. **Delafosse, A., F. Goutard, and E. Thebaud.** 2002. Epidémiologie de la tuberculose et de la brucellose des bovins en zone péri-urbaine d'Abéché, Tchad. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* **55**:5-13.
5. **Direction de l'Elevage et des Ressources Animales (DERA).** 2001. Rapport annuel d'Activités 2000, p. 1-36. N'Djaména.
6. **Doutoum, A. M., and M. A. Toko.** 2002. Mycobactérioses bovines et saisies à l'abattoir de Farcha. Institut Universitaire des Sciences et Techniques d'Abéché (IUSTA).
7. **Haddad, N., A. Ostyn, C. Karoui, M. Masselot, M. F. Thorel, S. L. Hughes, J. Inwald, R. G. Hewinson, and B. Durand.** 2001. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3623-3632.
8. **Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. Van Embden.** 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* **35**:907-914.
9. **Kent P.T., and G. P. Kubica.** 1985. Public health mycobacteriology- a guide for the level III laboratory. U.S. Department of health and human Services publication, Atlanta, Ga.
10. **Kraus, G., A. Cleary, N. Miller, R. Seivright, A. K. Young, G. Spruill, and H. J. Hnatyszyn.** 2001. Rapid and specific detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using fluorogenic probes and real-time PCR. *Mol. Cell. Probes* **15**:375-383.
11. **Maho A., P. Bornarel, and P. Hendrix.** 1994. Rapport technique: Abattage et motifs de saisie (dominantes pathologiques) aux abattoirs du Tchad: cas de N'Djaména, Ati, Bol, Mongo et Oum Hadjer., p. 1-17. LRVZ/F, N'Djaména, Tchad.
12. **Maho A., R. N. Mbakasse, and N. Boulbaye,** 1999. Causes de saisies aux abattoirs du Tchad oriental. LRVZ/F. In: Actes des III^{èmes} Journées Agro-Sylvo-Pastorales, 29/11 au 03/12/1997, N'Djaména, Tchad.
13. **Ministère de l'Elevage.** 2003. Rapport national sur les ressources zoo génétiques du Tchad, p. 1-196. N'Djaména, Tchad.

14. **Nfi, A. N., and C. Ndi.** 1997. Bovine tuberculosis at the Animal Research Antenna (ARZ) Bangangte, Western province, Cameroon. *Bull. Anim. Hlth. Prod. Afri.* **45**:1-3.
15. **Njanpop-Lafourcade, B. M., J. Inwald, A. Ostyn, B. Durand, S. Hughes, M. F. Thorel, G. Hewinson, and N. Haddad .** 2001. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Cameroon. *J. Clin. Microbiol.* **39**:222-227.
16. **Office International des Epizooties (OIE).** 1996. Manuel of Standard for Diagnostic Tests and Vaccines, p. 267-270, Paris.
17. **Perpézat, A., F. Mariat, and M. Thomé.** 1963. Importance du farcin chez le Zébu du Tchad. *Bull. Soc. Path. Exot.* **56**:375-383.
18. **Schelling, E., C. Diguimbaye, S. Daoud, D. M. Daugla, K. Bidjeh, M. Tanner, and J. Zinsstag.** 2000. La tuberculose causée par *Mycobacterium bovis* : résultats préliminaires obtenus chez les pasteurs nomades Foulbés et Arabes dans le Chari-Baguirmi au Tchad. *Sempervira* 44-55.
19. **Sola, C., I. Filliol, E. Legrand, S. Lesjean, C. Loch, P. Supply, and N. Rastogi.** 2003. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infect. Genet. Evol.* **3**:125-133.
20. **Suliman, M. S. and M. E. Hamid.** 2002. Identification of acid fast bacteria from caseous lesions in cattle in Sudan. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* **49**:415-418.
21. **Van Embden, J. D., M. D. Cave, J. T. Crawford, J. W. Dale, K. D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T. M. Shinnick.** 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* **31**:406-409.
22. **van Embden, J. D., T. van Gorkom, K. Kremer, R. Jansen, B. A. Der Zeijst, and L. M. Schouls.** 2000. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J. Bacteriol.* **182**:2393-2401.
23. **Zumarraga, M. J., C. Martin, S. Samper, A. Alito, O. Latini, F. Bigi, E. Roxo, M. E. Cicuta, F. Errico, M. C. Ramos, A. Cataldi, D. van Soolingen, and M. I. Romano.** 1999. Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*-related infections in South America. *J. Clin. Microbiol.* **37**:296-303.

Chapitre X

Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Chad: Molecular Characterization and Drug Resistance

Diguimbaye C.¹, Hilty M.², Ngandolo R.¹, Schelling E.², Mahamat HH.¹, Pfyffer GE.³, Baggi F.⁴, Tanner M.², Zinsstag J.²

¹ Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha, N'Djaména, Chad

² Swiss Tropical Institute, Basel, Switzerland

³ Department of Medical Microbiology, Kantonsspital Luzern, Switzerland

⁴ National Center for Mycobacteria, University of Zurich, Switzerland

Draft paper to be submitted *Journal of Clinical Microbiology*

Abstract

We describe the isolation of the first 35 *M. tuberculosis* strains in Chad. All strains have been diagnosed as *M. tuberculosis* and were characterized by spoligotyping. A total of 25 spoligotypes were found of which 7 were clustered and 18 were unique. Ten strains (28.5%) lacked DR-spacers 23, 24 and 25 and therefore, corresponded to the “Cameroon family”. No *M. africanum* A1 spoligotype was detected. Comparison with an international spoligotype database (SpolDB3.0) revealed that ten of twenty-five spoligotypes (32%) were novel.

Thirty-three *M. tuberculosis* strains were tested for their susceptibility to five drugs: streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol and pyrazinamide. Thirteen (39%) of the strains were resistant to at least one of the drugs tested and resistance to isoniazid (27%) was the most common. However, no strain was resistant to streptomycin and rifampicin. Resistance to pyrazinamide (9%) and ethambutol (12%) were low in comparison to isoniazid. These are the first data of the laboratory study of tuberculosis in Chad. Further more strains have to be carried out to confirm these preliminary results.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, spoligotyping, drug resistance, Chad

Introduction

In Africa, tuberculosis causes 556, 000 deaths annually with a mortality rate of 83 / 100'000 (WHO, 2004). Coexistence with HIV/AIDS heavily affects the socio-economic situation in most African countries. Based on observed therapy, the WHO recommended strategy is now applied in most of the African countries. However, data on the epidemiology and characteristics, of the causal agents are largely missing. Particularly, there is no data on the level of drug resistance. This is mainly due to the lack of laboratory facilities which would allow cultivating *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC). To date, the diagnosis of tuberculosis is mainly based on the detection of acid-fast bacilli (AFB) only. In Africa, control strategy still largely rely on the detection of bacilli in sputum smear, as indication of contagious tuberculosis which is most important in disease transmission. The WHO recommended strategy aims to reduce and stop transmission of tuberculosis by chemotherapeutic cure of patients with open pulmonary tuberculosis (Goguet et al., 1997).

In Chad, the annual incidence rate of pulmonary tuberculosis was estimated at 60-120/100,000 in 1990 (Massenet and Djemadji, 1994), but increased to 370/100,000 (WHO, 2004). Chad is therefore considered as a high incidence country. Together with the HIV/AIDS epidemic, tuberculosis became a major public health problem (Tosi et al., 2002). However, *M. tuberculosis* could not be identified due to the lack of adequate laboratories so far. Direct smear microscopy of sputum was used as a single method. Since 2000, a mycobacteriology unit has been established at the National Veterinary Laboratory of Farcha (Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques).

The aim of this work is to describe the first *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Chad, to determine their susceptibility to the first-line anti-tuberculosis drugs and to compare them with strains of neighboring countries and of the international database SPOLDB3.

Materials and Methods

1. Clinical Specimens

Between March and July 2001, and February and October 2002, a total of 357 sputum and 282 urine samples were collected from tuberculosis patients at the National Reference Hospital (Hôpital Général de Référence Nationale- HGRNT) in the Chadian

capital N'Djaména as well as at four rural health centers at a distance of 50 to 300 kilometers from N'Djaména (Figure 6).

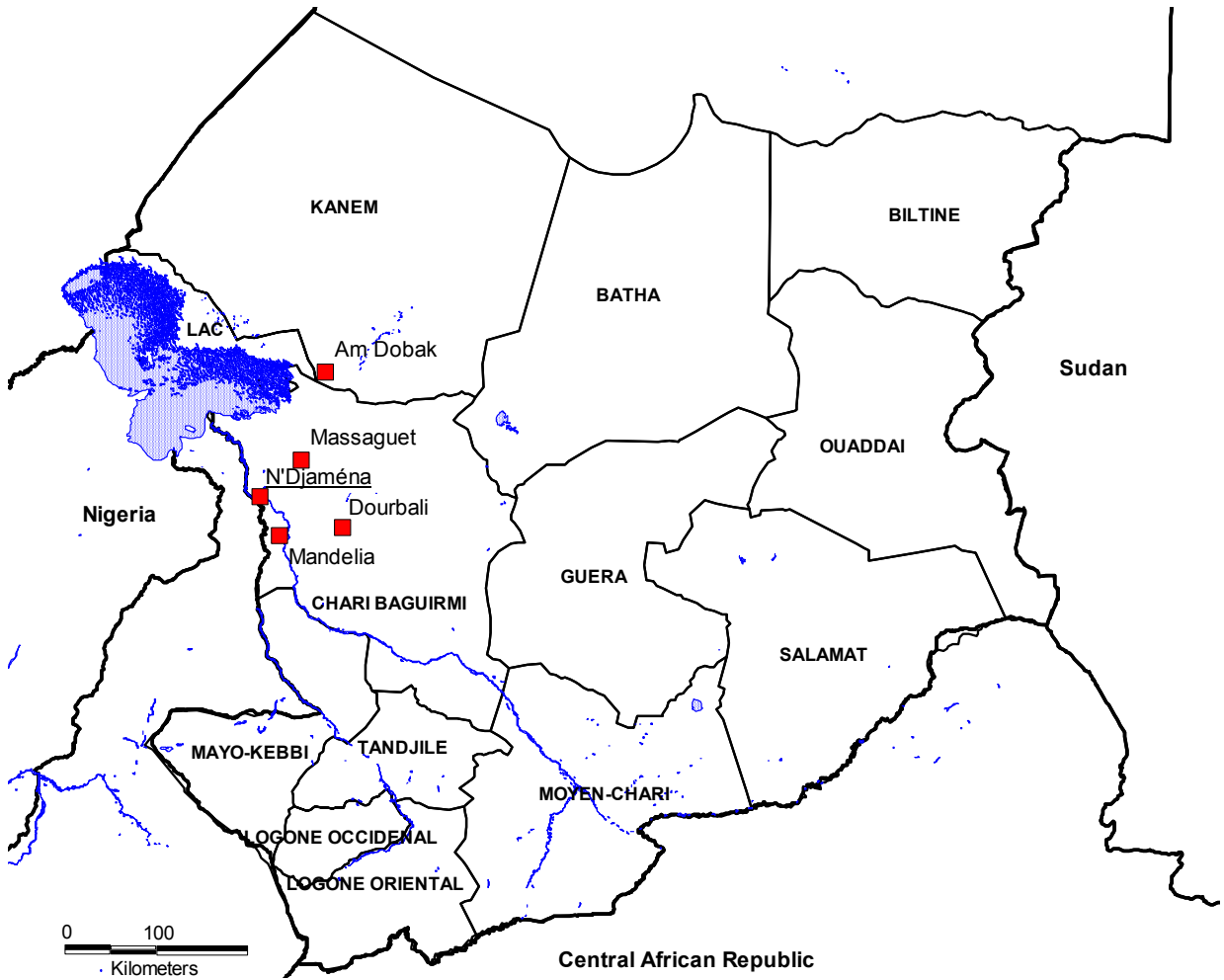


Figure 6: Map of Chad indicating location of the 5 public health centers from where samples were collected.

In N'Djaména, specimens were collected twice per week at the laboratory of the Hospital and smears were processed. At each visit to the hospital's laboratory, the first 6 specimens of sputum of new patients were collected. Urine specimens were collected with the patient's consent only. At the rural health centers, the investigator from LRVZ/F, selected patients on the basis of the questionnaire that was filled in together by the patient and the head of the health center.

2. Specimen processing and cultivation of AFB

All specimens (sputum and urines) were transferred into 50 mL FALCON® tubes and decontaminated with N-acetyl-L-cysteine sodium hydroxide (0.5% NALC in 2% NaOH) (Kent and Kubica, 1985) and inoculated on two Löwenstein –Jensen (LJ) slants, one containing 0.75% glycerol and another containing 0.6% sodium pyruvate. In addition, a tube of liquid Middlebrook 7H9 medium containing OADC and PANTA (polymyxin, amphotericin B, nadilixic acid, trimethoprim, azlocillin) was used. Inoculated media were incubated at 37°C without CO₂ for 8 weeks. Smears have been performed from the sediment and were stained by the Ziehl-Neelsen method (Kent and Kubica, 1985).

3. Identification of mycobacterial isolates

- Growth of mycobacteria has been confirmed by smear. AFB-positive colonies were subcultured on 3 LJ slants and a Middlebrook 7H10 agar plate.
- Three biochemical tests (nitrate, niacin, and 68°C catalase) (Kent and Kubica, 1985) were used to distinguish *M. tuberculosis* complex from non-tuberculous mycobacteria (NTM).
- Molecular identification was performed by real time PCR (Kraus et al., 2001).

4. Genotyping of *M. tuberculosis* complex mycobacteria

Genotyping of *M. tuberculosis* complex strains was done at the National Center for Mycobacteria by spoligotyping (Kamerbeek et al., 1997).

6. Drug susceptibility test

Drug susceptibility testing of four drugs was performed in the BACTEC MGIT 960 instrument (BD Biosciences, Sparks, Md., USA): isoniazid (INH) 0.1µg/ml, rifampin (RMP) 1µg/ml, ethambutol (EMB) 5µg/ml and pyrazinamide (PZA) 100µg/ml. Streptomycin (SM) 2µg/ml and 10µg/ml was tested by the agar proportion method using agar plate (Kent and Kubica, 1985).

7. Data analysis

Cluster analysis was done with SAS (Statistical Analysis Systems Inc., Cary, USA, Version 8.02 Proc cluster) using the UPGMA algorithm.

Results

In 2001 and 2002, a total of 357 sputum specimens and 282 urine samples have been received (Table 6). Among the sputum samples 48 (13.4 %) had a AFB-positive smear. One hundred and twenty three (34.4%) showed growth of mycobacteria on at least one medium. For urine specimens the rate of recovery was very low: 9/282 (3.2%) were AFB positive and 46/282 (16%) were culture positive. 31/123 (25.2%) strains from sputum and 4/46 (8.7%) from urine were identified as *M. tuberculosis* complex. Four out of 35 isolates originated from women. The mean age of the patients having a positive culture was 35.7 years (sd \pm 14.5) and the range was between 8 and 70 years.

Identification of *M. tuberculosis* complex was based on colony morphology, biochemical tests and real-time PCR. Of 169 AFB-positive cultures, 35 (20.7%) were *M. tuberculosis* complex isolates. Among these 35 strains, 22 showed the typical biochemical pattern of *M. tuberculosis* (catalase negative, nitrate positive, and niacin positive).

Spoligotyping of the 35 strains revealed 25 different spoligotypes. Seventeen (48.6%) strains with 7 spoligotypes were clustered (each with 4 and 3 strains and the remaining five clusters with 2 strains); 18 spoligotypes were unique (Figure 7). Thirty-three of 35 strains lacked DR 33 - 36, typical for *M. tuberculosis* while the remaining two strains had hybridisation of at least 2 spacers in this region. The *M. tuberculosis* H37Rv spoligopattern was found in single strain. Ten strains showed the Cameroon family spoligotype characterised by the lack of DR 23 - 25 (Ngo Niobe-Eyangoh et al., 2003). When our strains were compared with those deposited in the international database spolDB3.0 comprising 813 different spoligotypes (Filliol et al., 2003), 10 were already described in the database spolDB3.0 (25, 42, 46, 50, 52, 61, 244, 307, 316, 483), and 6 (type 836, 838, 848 and 3 unique types) have been described in a Cameroonian study (Niobe-Eyangoh et al., 2003). The other 8 types did not match any existing pattern in the database.

Site and year of collection	Nature of clinical specimen	Number of specimens	Number. of AFB-positive smear (%)	Number. of positive culture (%)
2001				
N'Djaména	Sputum	87	17 (19.5)	26 (29.8)
	Urine	51	3 (5.8)	5 (9.8)
Am Doback	Sputum	73	7 (9.5)	26 (35.6)
	Urine	78	0	22 (28.2)
Dourbali	Sputum	23	2 (8.7)	9 (39.1)
	Urine	23	0	1 (4.3)
2002				
N'Djaména	Sputum	91	20 (21.9)	49 (53.8)
	Urine	45	4 (8.8)	9 (20.0)
Massaguet	Sputum	44	0	4 (9.1)
	Urine	47	0	5 (10.6)
Mandalia	Sputum	39	2 (5.1)	9 (23.1)
	Urine	38	2 (5.2)	4 (10.5)
Total	Sputum	357	48 (13.4)	123 (34.4)
	Urine	282	9 (3.2)	46 (16.3)

Table 6 Specimens collected in 2001 and 2002, proportion of AFB positive smears and positive cultures on at least one medium

The result of susceptibility testing of 33 *M. tuberculosis* strains is shown in Table 7. Of the 33 strains tested, 20 (60.6%) were susceptible to all drugs, while 13 (39.4%) were resistant to at least one drug. Resistance to one drug was most common and observed in 10 patients (30.3%); three for 2 drugs (9.1%). In this study, resistance to isoniazid was most frequently observed (6 patients [18.2%]; associated with resistance to ethambutol in 3 patients [9.1]). Resistance to ethambutol was observed in four patients (12.1%) and to pyrazinamide in three patients (9.1%). We did not find any resistant strain to rifampin and streptomycin. More strains isolated from patients originate from saharo- sahelian zone were resistant to isoniazid compared to the patients from sudanian zone, (6/18 versus 2/13), but the difference was not significant by the Fisher's exact test.

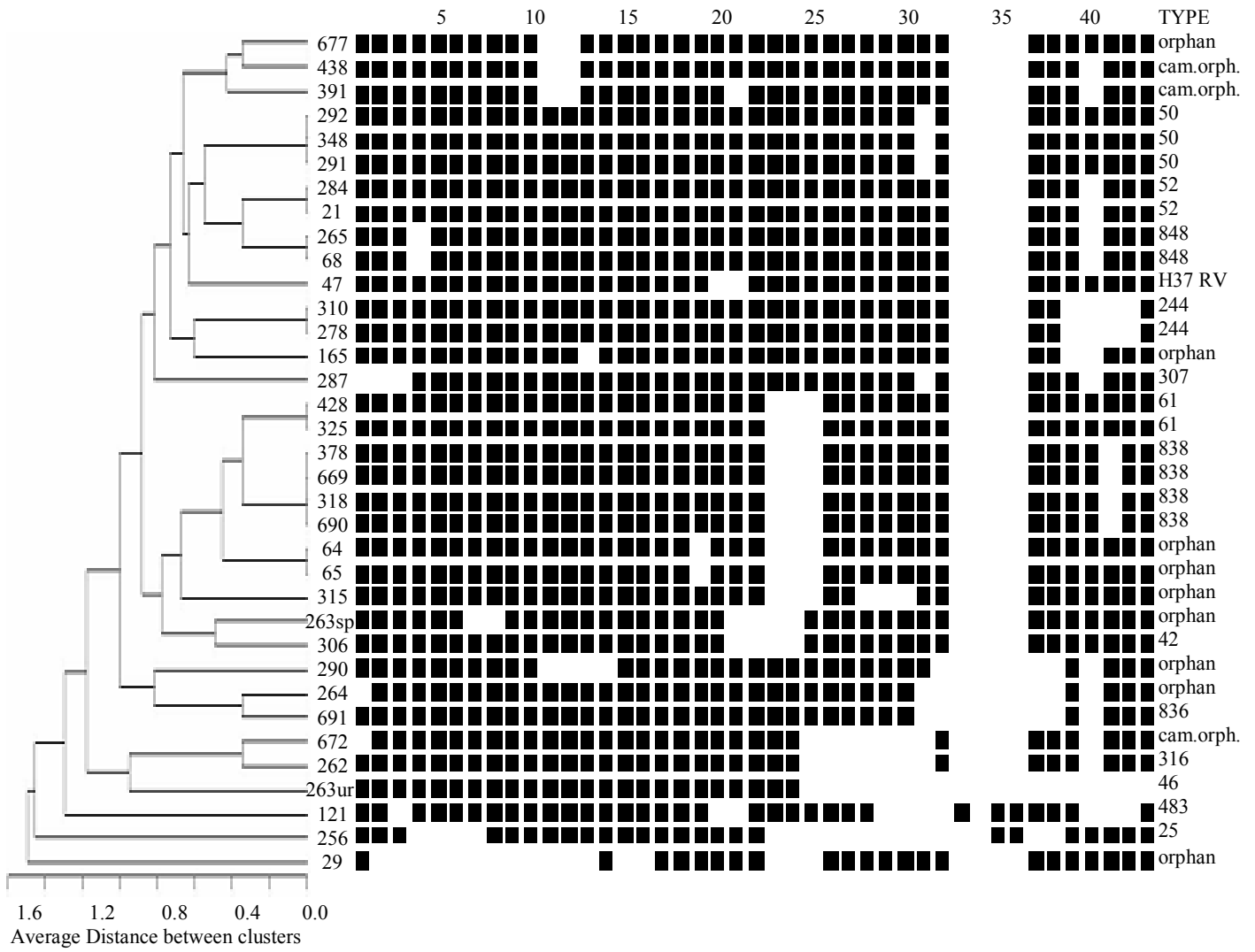


Figure 7 Spoligo-patterns of 35 *M. tuberculosis* isolates of Chad

Patient	Sex	Age	Origin	Nature of specimen	Spoligo-type.	Susceptibility testing				
						INH	RMP	EMB	PZA	SM
21	M	25	Sahel	SP	52	S	S	S	R	S
47	M	38	Desert	SP	H37Rv	R	S	R	S	S
64	M	20	Sahel	SP	T ₁	S	S	S	S	S
65	M	45	N.I.	SP	T ₁	S	S	S	S	S
68	M	23	N.I.	SP	848	R	S	S	S	S
121	F	50	Sahel	SP	483	R	S	R	S	S
165	M	N.I.	N.I.	SP	T ₂	S	S	S	R	S
256	M	18	Sahel	SP	25	S	S	S	S	S
262	M	30	Sahel	UR	316	S	S	S	S	S
263	M	42	Sudan	SP	T ₃	S	S	S	S	S
263	-“-	-“-	-“-	UR	46	S	S	R	S	S
264	M	21	Sudan	SP	T ₄	S	S	S	S	S
265	M	60	Sahel	SP	848	S	S	S	S	S
278	M	8	Sahel	SP	244	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
284	M	25	N.I.	SP	52	S	S	S	R	S
287	M	36	Sahel	SP	307	R	S	R	S	S
290	M	40	Sahel	SP	T ₅	R	S	S	S	S
291	M	66	Sahel	SP	50	R	S	S	S	S
292	M	60	Sudan	SP	50	R	S	S	S	S
304	M	22	Sudan	SP	T ₆	S	S	S	S	S
306	M	36	Sudan	SP	42	S	S	S	N.I.	S
310	M	30	Sudan	SP	244	S	S	S	S	S
315	F	40	Sudan	SP	T ₇	R	S	S	S	S
318	M	23	Sahel	SP	838	S	S	S	S	S
325	F	28	Sahel	SP	61	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
348	M	38	Desert	SP	50	R	S	S	S	S
378	M	24	Sudan	SP	838	S	S	S	S	S
391	M	32	Sahel	SP	Cam.orph	S	S	S	S	S
428	M	28	Sahel	SP	61	S	S	S	S	S
438	M	31	Sudan	UR	Cam.orph	S	S	S	S	S
669	M	35	Sahel	SP	838	S	S	S	S	S
672	M	70	Sahel	SP	Cam.orph	S	S	S	S	S
677	F	N.I.	Sudan	SP	T ₈	S	S	S	S	S
690	M	38	Sudan	UR	838	S	S	S	S	S
691	M	55	Sudan	SP	836	S	S	S	S	S

M, male; F, female; N.I., not identified; SP, sputum; UR, urine; T₁₋₈, novel spoligotype described in this study; Cam.orph, unique spoligotype first described in Cameroon; S, susceptible; R, resistant

Table 7 Characteristics and results of drug resistance testing of 35 isolates

Discussion and Conclusions

The present study analyzed 35 *M. tuberculosis* complex isolates from sputum and urine of Chadian patients suspected of tuberculosis in a newly set-up facility. During the first year only solid media (Löwenstein) were used and the isolation rate was low (7 isolates of *M. tuberculosis* out of 233 cultured specimens). Consequently, a liquid media with antibiotic supplements (PANTA) was introduced. After that, the recovery rate of increased significantly. However, we could obtain only a few *M. tuberculosis* strains in comparison to non-tuberculosis mycobacteria (NTM) strains (4 versus 70) from samples collected in rural health centers. This may be explained by inadequate sample collection on the field, the long duration of transport from the field to the laboratory (up to 5 days on ice), the contamination of the sputum, and the faster growth of NTM compared to of *M. tuberculosis* strains.

The three biochemical tests used have given 4 different biochemical patterns, however, the predominant was (catalase negative, nitrate positive and niacine positive), this one is characteristic for *M. tuberculosis*. We did not perform the sensitivity TCH test and the presence of pyraminidase, because these tests are not available in our laboratory yet. Thus, we could not distinguish *M. africanum* and *M. tuberculosis*. Nevertheless, we observed a high phenotypical heterogeneity (Table 7) among our strains, were comparable to the results obtained in Guinée –Bissau (Hoffner et al., 1993).

Eight out of our 25 different spoligotypes (32%) were not yet entered into the database SpolDB3.0. Types 244 and 316 have never been described for African countries, but for the American and European continent (Filliol et al., 2003). We have found the “Cameroon family” spoligotype (Niobe-Eyangoh et al., 2003) in 10/ 35 strains. This spoligotype seems to be also important for Chad which is not surprising when considering the frequent traffic between the two countries. However, the absence of *M. africanum* sub-type I cannot be explained easily. It may be due to the limited number of strains analyzed. We obtained 6 spoligotypes lacking DR 33-36 and 40 which corresponds to *M. africanum* sub-type II, the type mainly found in East Africa (Niemann et al., 2002). In contrast to the strains from Uganda, our strains were all aerophilic on Lebeek media. However, phenotypic characteristics are considered less stable than genetic features (Kallenius et al., 1999), we suggest that these strains would

be *M. africanum* sub-type II. In the other side, recent study (Mostowy et al., 2004) on genomic analysis has not been able to differentiate *M. africanum* sub-type II from modern *M. tuberculosis*.

Chad, which is located at the crossroads between East, and West Africa may easily receive mycobacterial strains from Western (“Cameroon family”) and Eastern (*M. africanum* sub-type II) strains.

Only 4 / 35 isolates originated from women. This sex difference observed in our sample must be considered with caution as the overall number of cultures is small, however, women may present themselves more rarely for clinical examination than men.

The level of resistance to INH is alarming (9/ 33; 27.3%) if we consider it initial resistance because primary resistance to IHN in other African countries is usually lower: 8.3% in Ethiopia (Bruchfeld et al., 2002), 12.5% in Equatorial Guinea (Tudo et al., 2004), 12.1% in Western province of Cameroon (Kuaban et al., 2000), and 6.6% in Northern Nigeria (Fawcett and Watkins, 1976). However, we did not find any strains resistant to streptomycin and to rifampin. Usually, resistance to these drugs is very frequent in Africa, except in Guinea Bissau (resistance to INH only [Dias et al., 1993]) and in Congo [no RMP-resistant strains [M’Boussa et al., 1998]]. The rate of resistance of the other drugs was low compared to INH. We have observed trend of high level resistance against INH among patients originating from the Saharo- Sahelian zone which should be further analyzed with larger numbers of strains.

Our study showed that *M. tuberculosis* strains of the same spoligotype cluster had different susceptibility patterns which are in agreement with results from other studies (Niang et al., 1999; Singh et al., 2004). We found that a liquid media for culture should be used in the case of a laboratory with limited infrastructure. In view of low proportion of positive MTC isolation from specimens of rural health centers, transport time from the centers to the laboratory will be reduced to less than 24 hours and to improve the phenotypical identification by adding test with TCH and Pyraminidase.

In conclusion, the establishment of a Mycobacteriology laboratory allowed to identify the main mycobacterial species causing tuberculosis in Chad and to perform drug

susceptibility. This new laboratory will provide crucial information to improve clinical care for TB patients and a basis for planning a National Tuberculosis Program in Chad.

Acknowledgement

We thank the technicians of the Swiss National Center for Mycobacteria, the Swiss Tropical Institute, and the “Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha” who have contributed to the project. The Swiss National Science Foundation is acknowledged for financial support.

References

1. **Bruchfeld, J., G. Aderaye, I. B. Palme, B. Bjorvatn, S. Ghebremichael, S. Hoffner, and L. Lindquist.** 2002. Molecular epidemiology and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ethiopian pulmonary tuberculosis patients with and without human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Microbiol.* **40**:1636-1643.
2. **Dias, F., S. G. Michael, S. E. Hoffner, L. Martins, R. Norberg, and G. Kallenius.** 1993. Drug susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* of a sample of patients in Guinea-Bissau. *Tuberc. Lung Dis.* **74**:129-130.
3. **Fawcett, I. W. and B. J. Watkins.** 1976. Initial resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Northern Nigeria. *Tubercle* **57**:71-73.
4. **Filliol, I., J. R. Driscoll, D. van Soolingen, B. N. Kreiswirth, K. Kremer, G. Valetudie, D. A. Dang, R. Barlow, D. Banerjee, P. J. Bifani, K. Brudey, A. Cataldi, R. C. Cooksey, D. V. Cousins, J. W. Dale, O. A. Dellagostin, F. Drobniewski, G. Engelmann, S. Ferdinand, D. Gascoyne-Binzi, M. Gordon, M. C. Gutierrez, W. H. Haas, H. Heersma, E. Kassa-Kelembho, M. L. Ho, A. Makristathis, C. Mammina, G. Martin, P. Mostrom, I. Mokrousov, V. Narbonne, O. Narvskaya, A. Nastasi, S. N. Niobe-Eyangoh, J. W. Pape, V. Rasolofo-Razanamparany, M. Ridell, M. L. Rossetti, F. Stauffer, P. N. Suffys, H. Takiff, J. Texier-Maugein, V. Vincent, J. H. de Waard, C. Sola, and N. Rastogi.** 2003. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1963-1970.
5. **Goguet de la Salmoniere YO, H. M. Li, G. Torrea, A. Bunschoten, J. Van Embden, and B. Gicquel.** 1997. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2210-2214.
6. **Hoffner, S. E., S. B. Svenson, R. Norberg, F. Dias, S. Ghebremichael, and G. Kallenius.** 1993. Biochemical heterogeneity of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Guinea-Bissau. *J. Clin. Microbiol.* **31**:2215-2217.

7. **Kallenius, G., T. Koivula, S. Ghebremichael, S. E. Hoffner, R. Norberg, E. Svensson, F. Dias, B. I. Marklund, and S. B. Svenson.** 1999. Evolution and clonal traits of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Guinea-Bissau. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3872-3878.
8. **Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. Van Embden.** 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* **35**:907-914.
9. **Kent P.T., and G. P. Kubica.** 1985. Public health mycobacteriology- a guide for the level III laboratory. U.S. Department of health and human Services publication, Atlanta, Ga.
10. **Kraus, G., A. Cleary, N. Miller, R. Seivright, A. K. Young, G. Spruill, and H. J. Hnatyszyn.** 2001. Rapid and specific detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using fluorogenic probes and real-time PCR. *Mol. Cell. Probes* **15**:375-383.
11. **Kuaban, C., R. Bercion, J. Noeske, P. Cunin, P. Nkamsse, and N. S. Ngo.** 2000. Anti-tuberculosis drug resistance in the West Province of Cameroon. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **4**:356-360.
12. **M'Boussa, J., M. Bendo, F. Yala, R. Kounkou, E. Kaoudi, and F. Portaels.** 1998. Etude préliminaire sur la sensibilité des mycobactéries au Centre Hospitalier Universitaire de Brazzaville. *Bulletin OCEAC* **31** (3).
13. **Massenet, D. and O. N. Djemadji.** 1994. [Chad: bibliographic review of reported cases]. *Med. Trop.* **54**:179-188.
14. **Mostowy, S., A. Onipede, S. Gagneux, S. Niemann, K. Kremer, E. P. Desmond, M. Kato-Maeda, and M. Behr.** 2004. Genomic analysis distinguishes *Mycobacterium africanum*. *J. Clin. Microbiol.* **42**:3594-3599.
15. **Niang, M. N., Y. G. de la Salmoniere, A. Samb, A. A. Hane, M. F. Cisse, B. Gicquel, and R. Perraut.** 1999. Characterization of *M. tuberculosis* strains from West African patients by spoligotyping. *Microbes. Infect.* **1**:1189-1192.
16. **Niemann, S., S. Rusch-Gerdes, M. L. Joloba, C. C. Whalen, D. Guwatudde, J. J. Ellner, K. Eisenach, N. Fumokong, J. L. Johnson, T. Aisu, R. D. Mugerwa, A. Okwera, and S. K. Schwander.** 2002. *Mycobacterium africanum* subtype II is associated with two distinct genotypes and is a major cause of human tuberculosis in Kampala, Uganda. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3398-3405.
17. **Niobe-Eyangoh, S. N., C. Kuaban, P. Sorlin, P. Cunin, J. Thonnon, C. Sola, N. Rastogi, V. Vincent, and M. C. Gutierrez.** 2003. Genetic biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from patients with pulmonary tuberculosis in Cameroon. *J. Clin. Microbiol.* **41**:2547-2553.
19. **Singh, U. B., N. Suresh, N. V. Bhanu, J. Arora, H. Pant, S. Sinha, R. C. Aggarwal, S. Singh, J. N. Pande, C. Sola, and P. Seth.** 2004. Predominant tuberculosis spoligotypes, Delhi, India. *Emerg. Infect. Dis.* **10**:1138-1142.

20. **Tosi, C. H., M. N. Ngangro, N. Djimadoum, and V. Richard.** 2002. [Study of HIV seroprevalence in patients with pulmonary tuberculosis in 1999 in Chad]. *Med. Trop.* **62**:627-633.
21. **Tudo, G., J. Gonzalez, R. Obama, J. M. Rodriguez, J. R. Franco, M. Espasa, P. R. Simarro, G. Escaramis, C. Ascaso, A. Garcia, and M. T. Jimenez de Anta.** 2004. Study of resistance to anti-tuberculosis drugs in five districts of Equatorial Guinea: rates, risk factors, genotyping of gene mutations and molecular epidemiology. *Int. J. Tuberc .Lung Dis.* **8**:15-22.
22. **World Health Tuberculosis Organisation (WHO).**2004.. Fact Sheet N° 104.

Chaptire XI

Comparaison des méthodes de disques et MGIT® pour tester la résistance de *M. tuberculosis* aux anti-tuberculeux essentiels au Tchad

C. Diguimbaye-Djaibé, M. Hilty, F. Baggi, R. Ngandolo, E. Schelling, G.E. Pfyffer, M. Tanner, J. Zinsstag

Colette Diguimbaye-Djaibé, Dr.

Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha,
N'Djaména, Tchad.

Markus Hilty, biochimiste

Institut Tropical Suisse, Département de la santé publique et d'épidémiologie,
4002 Bâle, Suisse

Esther Schelling, Dr. méd. vét., PhD

Institut Tropical Suisse, Département de la santé publique et d'épidémiologie,
4002 Bâle, Suisse

Franca Baggi, Dr.

Centre National des Mycobactéries, Institut de Microbiologie Médicale,
Gloriastr. 30, 8000 Zürich

Gaby Pfyffer, Prof. Dr.

Département de Microbiologie Médicale Hôpital cantonale, Lucerne, Suisse.

Richard Ngandolo, biologiste

Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha, B.P. 433
N'Djaména, Tchad

Jakob Zinsstag, Dr. méd. vét., PhD

Institut Tropical Suisse, Département de la santé publique et d'épidémiologie,
4002 Bâle, Suisse

Article à soumettre à la Revue de *Médecine Tropicale*

Résumé

L'objectif de cette étude est de comparer les résultats des tests de sensibilité des souches *Mycobacterium tuberculosis* effectués par la méthode MGIT® en Suisse (Centre National des Mycobactéries) avec ceux obtenus par la méthode des disques (MD) au Tchad (Laboratoire de Farcha). L'évaluation était basée sur l'analyse de 33 souches *M. tuberculosis* isolées au LRVZ/F et caractérisées par méthode moléculaire au CNM. Les résultats de la rifampicine concordent parfaitement entre MGIT® et MD, pour l'isoniazide, 92% d'accord a été obtenu entre les 2 méthodes utilisées alors que avec l'éthambutol, la divergence entre les 2 tests était plus significative ($\kappa = 0.36$). On a eu à noter que toutes les souches de faible résistance à l'éthambutol par la méthode des disques étaient sensibles par MGIT® et que les souches identifiées comme résistantes par les 2 méthodes l'étaient aussi à l'isoniazide. Concernant la streptomycine, la méthode des disques a été utilisée dans les deux centres et les résultats obtenus ont été concordants à 100%. En définitif les résultats obtenus montrent que la méthode des disques pourrait être recommandée pour commencer à identifier les profils de la résistance aux antibiotiques des souches tuberculeuse au Tchad.

Mots clés: Tchad - *Mycobacterium tuberculosis* - Résistance - Antituberculeux

ABSTRACT

Comparison of the agar proportion method and MGIT® to test anti-tuberculosis drug resistance in Chad

The objective of this study was to compare the results of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance obtained by the MGIT® method in Switzerland (National Centre of Mycobacteria) and the agar proportion method in Chad (Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha, LRVZ/F). The evaluation was based on 33 *M. tuberculosis* strains isolated at the LRVZ/F and molecular typed at the NCM. There was perfect agreement between the two tests with regard to rifampicine. As to isoniazid, an agreement of 92% was found but the agreement between the two tests was much lower for ethambutol ($\kappa=0.36$). It is notable that all strains with a low sensitivity to ethambutol by the agar proportion method were sensitive by the MGIT® method and that those strains resistant to ethambutol by both methods were also resistant to isoniazid. The agar proportion method was used in both laboratories to identify resistance to streptomycin and there was perfect agreement between the outcomes. In conclusion, the obtained results suggest that the agar proportion method should be recommended to start anti-tuberculosis resistance typing of mycobacterial strains in Chad.

Introduction

La tuberculose reste un problème mondial de santé publique. Le contrôle de la maladie passe par une identification rapide des patients ayant une tuberculose pulmonaire active et une prompt application de la pharmacothérapie antituberculeuse (1).

Le test de sensibilité aux anti-tuberculeux est un maillon non négligeable dans le processus de contrôle de la tuberculose dans le contexte d'une propagation mondiale de la tuberculose à bacilles résistants (2). Les objectifs du test de sensibilité pour *Mycobacterium tuberculosis* sont la surveillance du taux de résistance aux antituberculeux essentiels et la détection de la résistance dans les cas d'échec thérapeutiques chez les patients suite au traitement. En Afrique, les tests sur la résistance aux antituberculeux se font rarement. Néanmoins des informations concernant la résistance dans certains pays ont été obtenues dans le cadre des enquêtes successives conduites par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et par l'Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires (UICMR), en vue de collecter les informations sur la résistance de *M. tuberculosis* aux antibiotiques à l'échelle mondiale. Les résultats de la première étude, ont révélé les taux de résistance les plus faibles en Afrique (8 pays) par rapport aux autres régions OMS du monde. En Afrique, la résistance primaire moyenne globale était de 8.6% et la multi résistance primaire de 0.9%. A la seconde étape, 5 autres pays ont été associés, mais la tendance observée précédemment était maintenue. Toutefois cette prévalence observée est largement sous-estimée étant donné que les pays à forte incidence de tuberculose comme la République Démocratique du Congo (RDC), le Nigeria et l'Ethiopie n'étaient pas inclus dans l'étude (3). Les travaux menés localement dans certains pays ont donné des taux plus élevés de résistance primaire globale: 15.6% en Ethiopie (4); 37% à l'isoniazide (INH) seul au Ghana (5). Concernant la multi résistance (INH + rifampicine [RMP]), un taux de 27.6% a été obtenu à Yaoundé au Cameroun (6). Au Tchad, nous ne disposons d'aucune information sur la sensibilité des souches tuberculeuses aux antibiotiques essentiels utilisés pour le traitement. Les médecins sont confrontés à des malades qui ne répondent pas aux traitements administrés. Une étude rétrospective sur l'évaluation du DOTS dans un district sanitaire a révélé un taux moyen d'échec de

traitement de 3% (7). L'échec de traitement qui traduit la résistance des bacilles aux antituberculeux (8) n'a jamais été confirmé par des tests appropriés.

Dans le cadre de la collaboration scientifique entre le Laboratoire de Farcha (LRVZ/F) au Tchad et le Centre National de Mycobactéries (CNM) de l'Université de Zurich en Suisse à travers l'Institut Tropical Suisse (ITS-Bâle), les premiers isolats de mycobactéries tuberculeuses identifiées au Tchad, ont été testés vis-à-vis des quatre antibiotiques essentiels en Suisse et au Tchad. L'objet de ce travail est de comparer les résultats des tests de sensibilité obtenus dans chaque laboratoire.

Matériels et Méthodes

1. Les souches mycobactériennes

Trente trois isolats de *M. tuberculosis* et la souche de référence H37Rv ont été testées. Les isolats étaient issus de produits biologiques (crachats et urines), identifiés par les tests biochimiques classiques (9, 10) et caractérisés par les méthodes moléculaires (11, 12).

2. Les médicaments antituberculeux

La résistance à l'isoniazide (INH), la rifampicine (RMP), l'éthambutol (EMB) et la pyrazinamide (PZA) ont été testés par la méthode MGIT® et à la streptomycine (SM) par la méthode des proportions avec disques (MD) au CNM de Zurich. Au LRVZ/F de N'Djaména, la MD a été utilisée pour les quatre drogues antituberculeuses (INH, RMP, EMB et SM)

- Au CNM, les antituberculeux ont été utilisées aux concentrations suivantes: INH : 0.1µg/ml; RMP: 1.0µg/ml; EMB: 5.0µg/ml; SM: 2 et 10.0µg/ml.

- Au LRVZ, les mêmes concentrations ont été utilisée, sauf pour l'INH: 0.2µg/ml au lieu de 0.1µg/ml.

3. La méthode MGIT

Cette technique utilise le système automatisé BACTEC MGIT 960® (Becton Dickinson, Sparks, Md, USA). La méthode est standardisée pour les cinq médicaments antituberculeux essentiels (13, 14) et est utilisée dans le diagnostic de routine au CNM.

Les antibiotiques sont pesés, dilués et conservés à -70°C selon le protocole standard du CNM. Toutes les cultures sont repiquées dans les tubes MGIT® et les inoculums pour les tests de sensibilité sont préparées à partir de ces dernières.

4. Méthode des proportions avec disques (MD)

Le test a été effectué selon la méthode décrite par Kent & Kubica, (1985, [10]).

a) Les boîtes de Petri compartimentées en 4 avec le milieu Middlebrook 7H10 contenant les disques ont été préparées au LRVZ/F. Les boîtes, contrôlées pour la stérilité étaient apprêtées 48 heures avant l'ensemencement. Chaque boîte de Petri avait 3 quadrants avec un antibiotique (INH, RIF, EMB) et un quadrant témoin sans antibiotique. Nous avons pris pour la SM une boîte sur laquelle 2 quadrants ont été utilisés pour des disques avec deux concentrations différentes ($2\mu\text{g/ml}$ et $10\mu\text{g/ml}$).

b) Préparation de l'inoculum et ensemencement des boîtes:

Une subculture de chaque souche à tester a été obtenue en culture liquide Tween-albumine 7H9, après une semaine d'incubation à 37°C , la culture a été diluée avec de l'eau distillée stérile afin d'obtenir une turbidité de 1 sur l'échelle de MacFarland, cette suspension constitue la solution mère.

- $100\mu\text{l}$ de la suspension mère a été placée dans un tube avec bouchon à vis stérile contenant 10 billes et 0.9ml d'eau distillée stérile a été ajoutée afin d'obtenir une dilution au $1/10$. La suspension a été agitée sur vortex 2mn, pour bien dissocier les amas de bactéries.
- A partir de la dilution 10^{-1} , on a préparé avec de l'eau distillée stérile une dilution à 10^{-3} suivie d'une à 10^{-5} . Ces 2 dernières dilutions ont été utilisées comme inoculum, ainsi 2 boîtes ont été prévues pour chaque souche étudiée.

L'inoculation des boîtes s'est faite à l'aide de pipettes Pasteur stériles à raison de 3 gouttes de la suspension par quadrant. Les boîtes inoculées ont été scellées avec du Parafilm et incubées une semaine dans une jarre en atmosphère enrichie de CO_2 dans une étuve à 37°C , et les 2 semaines suivantes, elles ont été incubées dans une étuve sèche à la même température. Les boîtes ont été observées chaque semaine et la lecture finale a été effectuée à la fin de la 3^{ème} semaine.

c). Interprétation des résultats

- Une souche est dite résistante (R), lorsque les bacilles résistants qu'elle contient atteignent ou dépassent 1% des bacilles ayant poussés sur le quadrant témoin sans antibiotique.

- La sensibilité (S) d'une souche vis-à-vis d'un antibiotique était caractérisé par l'absence totale de croissance ou moins de 1% de bacilles par rapport au quadrant témoin.

- Le taux de résistance a été obtenu comme suit:

$$\frac{A}{B} \times 100 = \% \text{ résistance}$$

A : Nombre de colonies sur le quadrant avec antibiotique

B : Nombre de colonies sur le quadrant témoin

5. Analyse des résultats

Le test Kappa a été utilisé pour calculer le pourcentage d'agrément entre les deux tests de sensibilité aux antibiotiques.

Résultats et Discussion

Les résultats obtenus au niveau des deux laboratoires (Tableau 1) concordaient pour toutes les souches avec la RMP et SM (33 sensibles). Pour l'INH, les résultats des 32 souches ont été les mêmes (24 sensibles /8 résistantes), mais une souche qui était sensible par la méthode des proportions a été détectée comme résistante par le MGIT. Pour l'EMB, les résultats concordaient pour 28 souches (26S/2R), concernant les 5 autres souches dont les résultats divergeaient, 2 ont été sensibles par la méthode des proportions et résistantes par MGIT, alors que 3 ont donné des résultats inversés. Les 2 souches résistantes avec les deux méthodes étaient aussi résistantes à l'INH ce qui confirment les observations de Madison et coll. (15). Le test Kappa qui mesure le taux d'agrément entre les tests n'est que de 0.36 pour l'EMB, alors qu'il est de 0.92 pour l'INH et de 1 pour la RMP et la SM. La divergence entre les résultats des tests avec l'EMB a été mentionnée dans des précédentes études (16, 17).

Antibiotiques	Résultats MD versus MGIT®				Total	k
	S vs. S	R vs. R	S vs. R	R vs. S		
Isoniazide	24	8	1	0	33	0.921
Rifampicine	33	0	0	0	33	1
Ethambutol	26	2	2	3	33	0.358
Streptomycine*	33	0	0	0	33	1

* La Streptomycine a été testé par la même méthode dans les deux laboratoires.

Tableau 8 Résultats comparatifs obtenus par MD au LRVZ/F et par MGIT® au CNM

En conclusion, la MD réalisée au LRVZ/F donne des résultats comparables à ceux obtenus par MGIT® au CNM avec les mêmes souches. Malgré les inconvénients, liés à la durée du test, la MD constitue la méthode la mieux adaptée dans nos conditions actuelles de travail et elle est toujours la méthode de référence. Le test de la pyrazinamide pourrait être établi en utilisant un milieu avec un pH de 6.0 au lieu de 6.8. Ce nouveau milieu plus acide est favorable à l'activité de la pyrazinamide (18).

Avec la prolifération des souches résistante et multi résistante dans le monde par le biais de la migration (19), la surveillance de la résistance devient une nécessité d'une part pour détecter les nouveaux cas de patients, porteurs initialement de souches résistantes et d'autre part pour suivre le devenir des patients sous traitement. Vu la disponibilité du premier laboratoire de mycobactériologie au Tchad, des études représentatives sur le taux de résistances aux antibiotiques devraient être proposés pour l'ensemble du pays.

Remerciements

Cette étude a bénéficié d'un financement du Fonds National Suisse de Recherches Scientifiques et du pôle national de recherches « nord-sud », Projet individuel 4 (NCCR North-South, IP-4).

Références

1- CAMBAU E, TRUFFOT-PERNOT C, BOULAHBAL, F *et Coll* - Mycobacterial growth indicator tube versus the proportion method on Lowenstein-Jensen medium for

antibiotic susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; **19**: 938-942.

2- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE - Propagation mondiale de la tuberculose à Bacilles résistants.1997, Communiqué OMS/74.

3- MWINGA A - Drug-resistant tuberculosis in Africa. *Ann N Y Acad Sci* 2001; **953**: 106-112.

4- DEMISSIE M, GEBEYEHU M, BERHANE Y - Primary resistance to anti-tuberculosis drugs in Addis Ababa, Ethiopia. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; **1**: 64-67.

5- VAN DER WERF TS, GROOTHUIS DG, VAN KLINGEREN B - High initial drug resistance in pulmonary tuberculosis in Ghana. *Tubercle* 1989; **70**: 249-255.

6- KUABAN C, BERCION R, JIFON G *et Coll*- Acquired anti-tuberculosis drug resistance in Yaounde, Cameroon. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; **4**: 427-432.

7- DJEKAIKOULAYOM DH - Evaluation de La chimiothérapie antituberculeuse de courte durée (8mois) à l'hôpital de district de Pala. Thèse de Doctorat en Médecine, Université de N'Djaména, 2003.

8- AUREGAN G - [Epidemiologic indicators of tuberculosis]. *Santé* 1997; **7**: 97-102.

9- KENT PT, KUBICA GP- Public Health Mycobacteriology- a Guide for the Level III Laboratory. U.S. Departement of health and human Services publication, Atlanta, Ga 1985.

- 10- KRAUS G, CLEARY A, MILLER N *et Coll* - Rapid and specific detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using fluorogenic probes and real-time PCR. *Mol Cell Probes* 2001; **15**: 375-383.
- 11- KAMERBEEK J, SCHOOLS L, KOLK A *et Coll* - Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 907-914.
- 12- RUSCH-GERDES S, DOMEHL C, NARDI G - Multicenter evaluation of the mycobacteria growth indicator tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs. *J Clin Microbiol*. 1999; **37**: 45-48.
- 13- PFYFFER GE, PALICOVA F, RUSCH-GERDES S - Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide with the nonradiometric BACTEC MGIT 960 system. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 1670-1674.
- 14- MADISON B, ROBINSON-DUNN B, GEORGE I *et Coll* - Multicenter evaluation of ethambutol susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by agar proportion and radiometric methods. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 3976-3979.
- 15- BEMER P, PALICOVA F, RUSCH-GERDES S *et Coll* - Multicenter evaluation of fully automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 150-154.
- 16- ADJERS-KOSKELA K, KATILA ML - Susceptibility testing with the manual mycobacteria growth indicator tube (MGIT) and the MGIT 960 system provides rapid and reliable verification of multidrug-resistant tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 1235-1239.

17- HEIFETS L, SANCHEZ T - New agar medium for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 1498-1501.

18- KENYON TA, VALWAY SE, IHLE WW *et Coll* - Transmission of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis during a long airplane flight. *N Engl J Med* 1996; **334**: 933-938.

Chapitre XII

Species identification of non-tuberculous mycobacteria from humans and cattle of Chad

Diguimbaye-Djaibé C.¹, Vincent V.², Schelling E.³, Hilty M.³, Ngandolo R.¹, Mahamat HH.¹, Pfyffer G.⁴, Baggi F.⁵, Tanner M.³, Zinsstag J.³

¹Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha, N'Djaména, Chad

²Centre de Référence de Mycobactéries, Institut Pasteur, Paris, France

³Swiss Tropical Institute, Basel, Switzerland

⁴Department of Medical Microbiology, Kantonsspital Luzern, Luzern, Switzerland

⁵National Center for Mycobacteria, University of Zurich, Switzerland

Abstract

In Chad, during a study on tuberculosis in humans and animals, 52 non-tuberculous mycobacteria (NTM) strains were isolated. By means of INNO-LiPA, PRA-*hsp65* amplification and sequencing of 16S rDNA, NTM species of 25/52 isolates were identified. *M. fortuitum* (8/25) was the most frequent species, followed by *M. nonchromogenicum* (4) and *M. avium* complex (3). PRA method could identify *M. fortuitum* 3rd variant among isolates derived from cattle specimens. This finding confirms the existence of farcy in the Chadian cattle population as *M. fortuitum* 3rd variant and *M. farcinogenes* are closely related by their 16S rDNA sequences. Half of the NTM isolates could not be specified with the used methods and we considered these NTM strains as contaminants from the environment.

Introduction

With the increase in human tuberculosis cases and the advent of HIV/AIDS, there has been resurgence in interest in diseases caused by non-tuberculous mycobacteria (NTM). NTM are subdivided into rapid and slow growers. Their ecologic niche is the environment, as they have been found in soil, plants, house dust and water. In contrast, animals are not considered as an important reservoir for NTM (Saiman, 2004). However, they can cause infections in humans and animals (Phillips and von Reyn, 2001; Hamid et al., 1991; Alander-Damsten et al., 2003; Valheim et al., 2001). Mycobacteria cause a variety of illnesses, which have profound individual and public health implications. The clinical symptomatology of these diseases is not different from classical tuberculosis (Dvorska et al., 2001), but their therapy is problematic due to the high resistance to antituberculous drugs seen for most ubiquitous mycobacteria (Schutt-Gerowitt, 1995).

Reports on NTM infections in humans and animals in Africa are scarce. Most published studies are from South Africa, and specifically on investigations in the South African gold mines where *Mycobacterium kansasii* and *M. scrofulaceum* were the main causes of mycobacterial diseases (Churchyard et al., 1999; Corbett et al., 1999) and the first case of infection with *M. marinum* since 1987 was reported (Mousdicas and Saxe, 1987). For the others part of Africa, information can be found in studies on AIDS patients. In Burkina Faso, Ledru et al. (1996) found that 6.5% of mycobacterial isolations from AIDS patients were NTM without further specification, and in Nigeria, Idigbe et al. (1994) identified 20% *M. avium* and 10% *M. kansasii* among their isolates. In livestock, the serological investigation detected antibodies to *M. paratuberculosis* in camels and goats in Kenya (Paling et al., 1988). *M. farcinogenes* was described as main causal agent of bovine farcy in some African countries including Chad (Hamid et al., 2002).

In Chad, during a study of two years on tuberculosis in humans and animals, numerous *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) and NTM isolates were obtained. The purpose of the present article is to report the different NTM species found among mycobacterial strains from Chad.

Materials and Methods

Isolates and study sites

1) Specimens collected in 5 Chadian health centres (sputum and urine) and in one slaughterhouse (tubercles from lymph nodes, lung, spleen, liver and pleural cavity of condemned cattle's carcass) in N'Djaména, were subjected to decontamination and cultivation. Obtained mycobacterial isolates were identified by biochemical testing (Kent and Kubica, 1985). On the basis of biochemical tests results, the isolates were categorised in *M. tuberculosis* complex (MTC) and non-tuberculous mycobacteria (NTM). These preliminary studies were performed at the "Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha (LRVZ/F)" in Chad.

2) Fifty three isolates categorised as NTM had been sent to the Institut Pasteur (IP) in Paris for identification NTM species by molecular method.

3) One hundred and twenty three strains categorised as MTC were characterized at the National Centre of Mycobacteria (NCM) Zurich.

Molecular methods

1) The INNO-LiPA assay was carried out according to manufacturer's instructions and using the reagents provided with the LiPA kit (Versant® INNO-LiPA HCV II). The protocol consisted of PCR amplification, hybridization of the PCR products to the strips, detection and interpretation of the results (Suffys et al., 2001)

2) PRA amplification was performed according to the procedure described by Telenti et al. (1993). This method amplified a 439-bp fragment of the *hsp65* gene.

3) Real-time PCR

DNA extraction and subsequently amplification and identification were carried out according to the procedure described by Kraus et al. (2001). This method allowed the classification of NTM and MTC strains which were all previously categorised as MTC by biochemistry.

4) Sequencing of the 16S gene

The obtained PCR products were used to perform the sequencing of the 16S gene. The sequence processing was done with computer software from ABI PRISM™ 310 (Applied Biosystems). Alignments of mycobacterial 16S rDNA sequences were done with the Model 310 (version 3.4.1.) alignment tool. All probe sequences were subsequently matched with sequences in the GenBank by using BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) to detect sequence similarity. The search was performed at the National Centre of Mycobacteria in Zurich.

Results

Fifty three NTM isolates were tested with molecular methods at the IP (Table 9). After INNO LiPA testing, 17 strains were classified as MTC. Among the 36 isolates analyzed by two different methods (INNO-LiPA and PRA-*hsp65*), NTM species could be assigned to fifteen (41.7%) strains with at least one method and the remaining 21 (58.3%) could not be identified. The species identified by both methods were *M. fortuitum* (6) followed by *M. avium* complex (3) and *M. intracellulare* (1). Four isolates were identified as, *M. nonchromogenicum subsp.* and *M. szulgai / triviale/ brumae* only with the PRA method (Table 10). Two isolates derived from human specimens were identified: *M. fortuitum subsp. perigrinum* from a sputum sample and *M. intracellulare* from a urine sample. Among 13 isolates from cattle specimens, the identification resulted in five *M. fortuitum subsp. perigrinum* and of those three were identified as *M. fortuitum* 3rd variant by PRA-method.

At the NCM, 16 isolates (Table 9) were tested by sequencing of 16S (rDNA) and the results are shown in Table 11. The sequences of 15 out of 16 isolates could be matched in the GenBank. The overall nucleotide sequences identities ranged from 93 to 100%. As a similarity of 98 to 99% suggests that the obtained sequence likely derives from this species (Turenne et al., 2001). Thus, we obtained an identification of $\geq 98\%$ for 10/16 (62.5%) isolates. For the 6 isolates derived from human specimens, the identification was: *M. celatum* (98%), *M. simiae* (100%), *M. chelonae* (99%); *Mycobacterium sp.* N 120 (98%) and two *M. moriokaense* (98% and 99%). Among the four isolates from cattle specimens, two *M. fortuitum* (99%), *M. simiae* (99%) and *Mycobacterium* IWGMT. 90093 (99%) were identified.

Laboratory	Total isolates	MTC-isolates	NTM-isolates
IP	53	17	36
NCM	120	104	16

Table 9 Classification of mycobacterial isolates by laboratory

Identification of isolates	Origin of specimen	Results of INNO-LiPA	Results of PRA- <i>hsp65</i>
407CR/G	human	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i> / <i>M. porcinum</i>
626UR	human	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracell</i> /MAI/ <i>scrofulaceum</i>
219GG	cattle	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>peregrinum</i>	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>peregrinum</i>
441PM	cattle	NI	<i>M. nonchromogenicum</i> subsp. <i>mucogenicum</i>
444GG	cattle	<i>M. avium</i> complex	-
446GG	cattle	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>peregrinum</i>	<i>M. fortuitum</i>
464FOIE	cattle	NI	<i>M. nonchromogenicum</i> type I
454GG	cattle	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>peregrinum</i>	<i>M. fortuitum</i> 3 rd variant
455GG	cattle	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>peregrinum</i>	<i>M. fortuitum</i> 3 rd variant
502GG	cattle	<i>M. avium</i> complex	<i>M. intracellulare</i>
522PM	cattle	NI	<i>M. nonchromogenicum</i> type I
548PM	cattle	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>peregrinum</i>	<i>M. fortuitum</i> 3 rd variant
559PM	cattle	NI	<i>Szulgai/trivialé/brumae</i>
582PM	cattle	NI	<i>M. nonchromogenicum</i> subsp. <i>mucogenicum</i>
663PM	cattle	<i>M. avium</i> complex	<i>M. intracellulare</i> / MAI/ <i>scrofulaceum</i>

NI: not identified

Table 10 Results of NTM species identification with the two methods INNO-LiPA and PRA-*hsp65* at the IP

Identification of isolates	Results of 16S rDNA identification	% identity	Mis matches
269CR/P	<i>M. celatum</i> L08170	98	7
277CR/G	<i>M. simiae</i> RM1999.11.29.0189	100	0
280CR/P	<i>M. moriokaense</i> AJ429044	99	2
381UR/P	<i>M. moriokaense</i> RM1999.11.03.0236	98	7
430CR/G	<i>M. chelonae</i> RM1999.11.29.0168	99	1
685CR/P	<i>Mycobacterium</i> sp.N120 AY215322.1	98	4
483PM/P	<i>M. fortuitum</i> RM1999.11.29.0173	99	2
490GG/P	<i>M. fortuitum</i> RM1999.11.29.0173	99	3
637GG/G	<i>Mycobacterium</i> IWGMT.90093 X08910.1	99	1
661GG/G	<i>M. simiae</i> RM1999.11.29.0187	99	1

Table 11 NTM species identification by 16S (rRNA) sequencing at the NCM

Discussion and conclusion

Isolation of NTM from clinical specimens may represent infection, co-infection or colonization. Unfortunately, we have not enough clinical data from patients and thus we cannot draw any conclusions on the importance of the isolates to the ill-health of patients. In this study, most isolates were identified by PRA in comparison to INNO-LiPA. All species identification obtained with INNO-LiPA were confirmed with PRA. Many isolates which were not identified by these two methods are considered as contaminants from the environment.

M. fortuitum was the most frequent NTM species (8/25) in this study and among these, 3 isolates from cattle were identified as the 3rd variant by PRA. Two studies have demonstrated the high identity of 16S rDNA of *M. senegalense*, *M. farcinogenes* and *M.*

fortuitum 3rd variant (Kirschner et al., 1992; Turenne et al., 2001). This finding is interesting because it confirms the existence of bovine farcy in the Chadian cattle population which has not been done since 1963 (Perpézat et al., 1963). Only 3 isolates were identified as *M. avium* complex and none was *M. kansasii*, while usually these two mycobacteria are the most common NTM in clinical specimens and biopsies (Shih et al., 1997; Marras and Daley, 2002; Thorel, 1980; Pate et al., 2004). Concerning the remaining mycobacteria found in our study, they are rarely isolated but most of them are described as potential pathogens. *Mycobacterium simiae* is commonly found in the environment and was rarely associated with human disease. However, some cases of disease caused by *M. simiae* in AIDS and non-AIDS patients were described (Vandercam et al., 1996; Huminer et al., 1993; Bell et al., 1983; Lavy and Yoshpe-Purer, 1982). *M. celatum* was described as cause of fatal pulmonary infection in an old woman (Bux-Gewehr et al., 1998) and of disseminated infection in domestic ferret (Valheim et al., 2001). *M. chelonae* was frequently isolated from patients with cystic fibrosis (Hjelt et al., 1994; Tomashefski et al., 1996; Fauroux et al., 1997). *M. terrae* complex is composed of *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, and *M. triviale*. They are uncommon colonizers of human epithelia and generally regarded as non-pathogenic (Lee et al., 2004). However, *M. nonchromogenicum* may occasionally cause human disease such as pulmonary infection and tenosynovitis (Peters and Morice, 1991).

We obtained all NTM usually found in the environment by sequencing because this method is not focused on pathogen NTM strains. However, we have not confirmed our sequencing results by another molecular method as suggested by Hafner et al. (2004). In general, NTM isolates should be further characterised because NTM infections can cause disease and first line antituberculosis drug treatment may be not efficacious.

Acknowledgements

We thank the technicians of the “Centre de Reference des Mycobactéries” of Institut Pasteur, the National Center for Mycobacteria, the Swiss Tropical Institute, and the “Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha” who have contributed to the project. The Swiss National Science Foundation is acknowledged for financial support.

References

- Alander-Damsten, Y. K., E. E. Brander, and L. G. Paulin.** 2003. Panniculitis, due to *Mycobacterium smegmatis*, in two Finnish cats. *J.Feline.Med.Surg.* **5**:19-26.
- Bell, R. C., J. H. Higuchi, W. N. Donovan, I. Krasnow, and W. G. Johanson, Jr.** 1983. *Mycobacterium simiae*. Clinical features and follow-up of twenty-four patients. *Am.Rev.Respir.Dis.* **127**:35-38.
- Bux-Gewehr, I., H. P. Hagen, S. Rusch-Gerdes, and G. E. Feurle.** 1998. Fatal pulmonary infection with *Mycobacterium celatum* in an apparently immunocompetent patient. *J.Clin.Microbiol.* **36**:587-588.
- Churchyard, G. J., I. Kleinschmidt, E. L. Corbett, D. Mulder, and K. M. De Cock.** 1999. Mycobacterial disease in South African gold miners in the era of HIV infection. *Int.J.Tuberc.Lung Dis.* **3**:791-798.
- Corbett, E. L., L. Blumberg, G. J. Churchyard, N. Moloi, K. Mallory, T. Clayton, B. G. Williams, R. E. Chaisson, R. J. Hayes, and K. M. De Cock.** 1999. Nontuberculous mycobacteria: defining disease in a prospective cohort of South African miners. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **160**:15-21.
- Dvorska, L., M. Bartos, C. Martin, W. Erler, and I. Pavlik.** 2001. Strategies for differentiation, identification and typing of medically important species of Mycobacteria by molecular methods. *Vet.Med.-Czech* **46**:309-328.
- Fauroux, B., B. Delaisi, A. Clement, C. Saizou, D. Moissenet, C. Truffot-Pernot, G. Tournier, and T. H. Vu.** 1997. Mycobacterial lung disease in cystic fibrosis: a prospective study. *Pediatr.Infect.Dis.J.* **16**:354-358.
- Hafner, B., H. Haag, H. K. Geiss, and O. Nolte.** 2004. Different molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous mycobacteria and description of new hsp65 restriction fragment length polymorphism patterns. *Mol.Cell Probes* **18**:59-65.
- Hamid, M. E., G. E. Mohamed, M. T. Abu-Samra, S. M. el Sanousi, and M. E. Barri.** 1991. Bovine farcy: a clinico-pathological study of the disease and its aetiological agent. *J.Comp Pathol.* **105**:287-301.
- Hamid, M. E., A. Roth, O. Landt, R. M. Kroppenstedt, M. Goodfellow, and H. Mauch.** 2002. Differentiation between *Mycobacterium farcinogenes* and *Mycobacterium senegalense* strains based on 16S-23S ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *J.Clin.Microbiol.* **40**:707-711.
- Hjelt, K., N. Højlyng, P. Howitz, N. Illum, E. Munk, N. H. Valerius, K. Fursted, K. N. Hansen, I. Heltberg, and C. Koch.** 1994. The role of Mycobacteria Other Than Tuberculosis (MOTT) in patients with cystic fibrosis. *Scand.J.Infect.Dis.* **26**:569-576.
- Hummer, D., S. Dux, Z. Samra, L. Kaufman, A. Lavy, C. S. Block, and S. D. Pitlik.** 1993. *Mycobacterium simiae* infection in Israeli patients with AIDS. *Clin.Infect.Dis.* **17**:508-509.
- Idigbe, E. O., A. Nasidi, C. E. Anyiwo, C. Onubogu, S. Alabi, R. Okoye, O. Ugwu, and E. K. John.** 1994. Prevalence of human immunodeficiency virus (HIV) antibodies in tuberculosis patients in Lagos, Nigeria. *J.Trop.Med.Hyg.* **97**:91-97.
- Kent P.T., and G. P. Kubica.** 1985. Public health mycobacteriology- a guide for the level III laboratory. U.S. Department of health and human Services publication, **Atlanta, Ga.**
- Kirschner, P., M. Kiekenbeck, D. Meissner, J. Wolters, and E. C. Bottger.** 1992. Genetic heterogeneity within *Mycobacterium fortuitum* complex species: genotypic criteria for identification. *J.Clin.Microbiol.* **30**:2772-2775.

- Kraus, G., A. Cleary, N. Miller, R. Seivright, A. K. Young, G. Spruill, and H. J. Hnatyszyn.** 2001. Rapid and specific detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using fluorogenic probes and real-time PCR. *Mol.Cell.Probes* **15**:375-383.
- Lavy, A. and Y. Yoshpe-Purer.** 1982. Isolation of *Mycobacterium simiae* from clinical specimens in Israel. *Tubercle.* **63**:279-285.
- Ledru, S., B. Cauchoix, M. Yameogo, A. Zoubga, J. Lamande-Chiron, F. Portaels, and J. P. Chiron.** 1996. Impact of short-course therapy on tuberculosis drug resistance in South-West Burkina Faso. *Tuber.Lung Dis.* **77**:429-436.
- Lee, C. K., H. M. Gi, Y. Cho, Y. K. Kim, K. N. Lee, K. J. Song, J. W. Song, K. S. Park, E. M. Park, H. Lee, and G. H. Bai.** 2004. The genomic heterogeneity among *Mycobacterium terrae* complex displayed by sequencing of 16S rRNA and hsp 65 genes. *Microbiol.Immunol.* **48**:83-90.
- Marras, T. K. and C. L. Daley.** 2002. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Clin.Chest Med.* **23**:553-567.
- Mousdicas, N. and N. Saxe.** 1987. Fish-tank granuloma. The first reported case in South Africa. *S.Afr.Med.J.* **71**:321-322.
- Paling, R. W., S. Waghela, K. J. Macowan, and B. R. Heath.** 1988. The occurrence of infectious diseases in mixed farming of domesticated wild herbivores and livestock in Kenya. II. Bacterial diseases. *J.Wildl.Dis.* **24**:308-316.
- Pate, M., I. Zdovc, T. Pirs, B. Krt, and M. Ocepek.** 2004. Isolation and characterisation of *Mycobacterium avium* and *Rhodococcus equi* from granulomatous lesions of swine lymph nodes in Slovenia. *Acta Vet.Hung.* **52**:143-150.
- Perpézat, A., F. Mariat and M. Thomé.** 1963. Importance du farcin chez le Zébu du Tchad. *Bull.Soc.Path.Exot.* **56**:375-383.
- Peters, E. J. and R. Morice.** 1991. Miliary pulmonary infection caused by *Mycobacterium terrae* in an autologous bone marrow transplant patient. *Chest* **100**:1449-1450.
- Phillips, M. S. and C. F. von Reyn.** 2001. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. *Clin.Infect.Dis.* **33**:1363-1374.
- Saiman, L.** 2004. The mycobacteriology of non-tuberculous mycobacteria. *Paediatr.Respir.Rev.* **5 Suppl A**:S221-S223.
- Schutt-Gerowitt, H.** 1995. On the development of mycobacterial infections. I. A review concerning the common situation. *Zentralbl.Bakteriol.* **283**:5-13.
- Shih, J. Y., P. R. Hsueh, L. N. Lee, H. C. Wang, P. C. Yang, S. H. Kuo, and K. T. Luh.** 1997. Nontuberculous mycobacteria isolates: clinical significance and disease spectrum. *J.Formos.Med.Assoc.* **96**:621-627.
- Suffys, P. N., R. A. da Silva, M. de Oliveira, C. E. Campos, A. M. Barreto, F. Portaels, L. Rigouts, G. Wouters, G. Jannes, G. van Reybroeck, W. Mijs, and B. Vanderborght.** 2001. Rapid identification of *Mycobacteria* to the species level using INNO-LiPA *Mycobacteria*, a reverse hybridization assay. *J.Clin.Microbiol.* **39**:4477-4482.
- Telenti, A., F. Marchesi, M. Balz, F. Bally, E. C. Bottger, and T. Bodmer.** 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J.Clin.Microbiol.* **31**:175-178.
- Thorel, M. F.** 1980. [*Mycobacteria* identified in a centre for veterinary research between 1973 and 1979 (author's transl)]. *Ann.Microbiol.(Paris)* **131**:61-69.

Tomashefski, J. F., Jr., R. C. Stern, C. A. Demko, and C. F. Doershuk. 1996. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. An autopsy study. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **154**:523-528.

Turenne, C. Y., L. Tschetter, J. Wolfe, and A. Kabani. 2001. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. *J.Clin.Microbiol.* **39**:3637-3648.

Valheim, M., B. Djonne, R. Heiene, and D. A. Caugant. 2001. Disseminated *Mycobacterium celatum* (type 3) infection in a domestic ferret (*Mustela putorius furo*). *Vet.Pathol.* **38**:460-463.

Vandercam, B., J. Gala, B. Vandeweghe, J. Degraux, G. Wauters, L. Larsson, A. Bourlond, and F. Portaels. 1996. *Mycobacterium simiae* disseminated infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Infection* **24**:49-51.

CINQUIÈME PARTIE

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Chapitre XIII DISCUSSION

Les informations sur l'épidémiologie moléculaire de la tuberculose humaine et animale au Tchad étaient inexistantes jusqu'à lors. Grâce à la mise en place du projet interdisciplinaire, basé sur la « médecine unie » et initiée par l'Institut Tropical Suisse, quelques aspects de l'épidémiologie de la tuberculose à *M. tuberculosis* et *M. bovis* a fait l'objet d'une étude. Les données recueillies suite à cette étude donne qu'un aperçu qualitatif de la tuberculose chez l'homme et l'animal, par la caractérisation de l'agent causal. Cette thèse apporte les caractéristiques phénotypiques et génétiques des souches tuberculeuses isolées pour la première fois au Tchad.

Les échantillons humains ont été collectés durant deux années et le taux de recouvrement des mycobactéries tuberculeuses a augmenté significativement d'une année à l'autre ce qui correspondait à une amélioration de la méthodologie utilisée pour l'isolement (adjonction du milieu liquide contenant des antibiotiques). Mais ce changement a été notifié que pour les échantillons collectés au niveau du centre de santé le plus proche du laboratoire où ont été traités les échantillons. Pour les échantillons collectés dans les centres éloignés et qui ont nécessité un temps de transport assez important même sous réfrigération, le taux de recouvrements a été faible. Chez les bovins, les isollements de mycobactéries ont été plus effectives que chez les humains, ceci serait lié à la nature des prélèvements analysés, dans le cas des tissus avec les lésions tuberculeuses, la présence de mycobactéries est beaucoup plus évidente que dans les crachats ou les urines des personnes suspectées. Le crachat est souvent mal produit par les patients ce qui amenuise les chances d'isolement (Fishman, 1994).

L'examen direct des frottis a révélé très peu de BAAR positifs comparé à la culture aussi bien chez les humains (57 versus 169) que chez les bovins (23 versus 132). Malgré la faible sensibilité connue à cette méthode de diagnostic, nos résultats ont été très faibles comparés à ceux obtenus dans d'autres études effectuées sur les prélèvements d'abattoirs (Suliman et Hamid, 2002). Toutefois, il a été démontré dans nos travaux que la culture constitue une méthode de détection des mycobactéries plus sensible que la bacilloscopie.

L'identification des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* a été réalisée en utilisant 3 tests biochimiques (activité catalase à 68°C, réduction des nitrates et accumulation de la niacine). Vingt trois échantillons ont donné des résultats typiques

pour *M. tuberculosis* et 45 pour *M. bovis*, les 23 autres souches, 11 issues d'échantillons humains et 12 de bovins ont donné des réactions atypiques cependant, toutes avaient une activité de la catalase négative. Ainsi le test de la catalase pourrait être retenu comme test préliminaire ce qui permettrait de procéder à un tri avant l'application des 2 autres tests pour la détection des complexes *M. tuberculosis*. En ce qui concerne les caractères culturels, les caractéristiques décrites dans la littérature ont été observées (croissance lente et colonies non pigmentées). L'utilisation du real-time PCR (Kraus et coll., 2001) a permis de détecter 16/120 (13.3%) souches non tuberculeuses parmi les isolats identifiés par la biochimie comme étant du complexe *M. tuberculosis*. Cette divergence relativement faible entre les deux méthodes d'identification, montre que les 3 tests utilisés permettent une bonne discrimination des mycobactéries tuberculeuses.

Le spoligotyping (Kamerbeek et coll., 1997) a été utilisé pour typer les souches du complexe *M. tuberculosis*. Tous les isolats issus de spécimens humains ont été typés comme *M. tuberculosis* et ceux issus des bovins comme *M. bovis*. *M. africanum* type I n'a pas été identifié parmi les isolats. Le taux de 48.6% de souches en grappe généralement composé de 2 souches chez les humains reflète la forte diversité génétique des souches. Le type de la «famille Cameroun» qui a pour spécificité, l'absence des séquences inter- DR 23, 24 et 25 récemment décrit au Cameroun (Niobe-Eyangoh et coll., 2003) et 10 souches de cette famille ont été aussi identifiées dans notre étude. Mis à part ces deux pays, ce type a été isolé aussi en Afrique de l'Ouest (Benin, Côte d'Ivoire et Sénégal). La rareté des données sur le profil génétique des souches tuberculeuses en Afrique ne permet pas momentanément d'apprécier la répartition de ce type au niveau du continent. La résistance aux antituberculeux de première ligne a été évaluée pour 33 souches de *M. tuberculosis*. Le taux de résistance à l'isoniazide a été le plus important. Il n'a pas été détecté de souche résistante ni à la rifampicine ni à la streptomycine. En général, l'absence de résistance à la rifampicine est liée soit à la non utilisation du composé ou à son introduction récente dans le traitement de la tuberculose, par ailleurs la résistance à l'isoniazide peut compromettre l'application du traitement de courte durée (Dye et coll., 2002), car ce composé, intervient dans les deux phases du traitement.

Par rapport aux souches issues de bovins, 12 spoligotypes ont été obtenus dont 8 en grappe et 4 uniques. Chez la plupart des souches, il a été noté l'absence de la séquence inter- DR 30 ce qui les apparente aux souches décrites au Cameroun (Njanpop-Lafourcade et coll., 2001). Aucun lien n'a pu être établi entre la race bovine et les

spoligotypes décrit, cependant la maladie a été plus fréquemment détectée chez les zébus de race Mbororo que de race Arabes ($p = 0.004$) ce qui confirme les observations faites auparavant (Maho et coll., 1999). *M. farcinogenes* a pu être caractérisé parmi les mycobactéries non- tuberculeuses. Les premières études microbiologiques sur les prélèvements d'abattoir comportant des lésions tuberculeuses avaient notifiés son importance par rapport à *M. bovis*. La croissance rapide de cette souche pourrait être une des raisons de son fréquent isolement. L'amélioration des méthodes utilisées dans l'étude de la tuberculose en laboratoire a sans doute contribué à augmenter le taux de détection des souches tuberculeuses à l'abattoir.

Chapitre XIV CONCLUSIONS, PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS

L'établissement de ce laboratoire a été d'un grand intérêt tant pour la santé humaine que animale.

- En santé humaine au moyen de cet outil nous avons pu isoler les premières souches responsables de la tuberculose humaine au Tchad et ainsi avons pu tester leur résistance au anti-tuberculeux.
- En santé animale, la mise en évidence des premières souches *M. bovis* du Tchad sont une confirmation des suspicions faites jusqu'alors concernant la tuberculose bovine au Tchad et cette étude a montré son importance dans les cas de saisie au niveau de l'abattoir.

Au terme des travaux présentés dans le cadre de cette thèse, la capacité du laboratoire des mycobactéries du LRVZ à isoler et identifier les mycobactéries tuberculeuses a été prouvée. Nous avons pu établir la première base de données de spoligotypes des bacilles de la tuberculose isolées chez l'homme et l'animal au Tchad ce qui a permis de les comparer à ceux rencontrés dans le monde.

De nombreuses perspectives s'ouvrent au terme de ce travail.

Au Tchad, les études sur différents aspects de la tuberculose, nécessitant l'implication du laboratoire comme outil de travail (le suivi des patients sous traitement, l'établissement des prévalence, et la surveillance de la résistance des souches).

Sur le plan régional et international le développement des collaborations entre laboratoires contribuerait une meilleure compréhension de l'épidémiologie des souches tuberculeuses circulant dans le monde.

Dans le but de limiter la propagation de la tuberculose humaine et animale, nous proposons quelques recommandations:

Tuberculose bovine

- Mener une étude épidémiologique et d'impact économique, destiné à mieux chiffrer l'importance de la maladie et les pertes qu'elle entraîne.

- Renforcer la surveillance systématique au niveau des abattoirs et localiser l'origine des porteurs de lésions afin d'identifier les zones et les élevages infectés.
- Sensibiliser les éleveurs et propriétaires d'animaux sur la tuberculose bovine en développant ses différents aspects de transmission.
- Envisager une stratégie de lutte basée sur une prophylaxie médicale ou une chimiothérapie utilisant les antituberculeux disponibles, hormis la pyrazinamide.

Tuberculose humaine

- Faire une étude épidémiologique par district sanitaire pour avoir une estimation plus précise de la tuberculose humaine.
- Instaurer la culture comme méthode de diagnostic systématique de la tuberculose humaine au même rang que la microscopie.
- Tester toutes les souches du complexe *M. tuberculosis* isolées aux anti-tuberculeux utilisés dans le but de surveiller l'apparition des souches multi-résistantes.

RÉFÉRENCES

- Adams, L. G.** 2001. In vivo and in vitro diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. *Rev.Sci.Tech.* **20**:304-324.
- Acha P. N. et Szyfres B.** 1989. Tuberculose zoonosique. In: OIE (Ed), *ZOONOSES et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux*, 2^e éd. Paris, France, OIE.
- Ait-Khaled, N. et D. ENARSON.** 1999. Tuberculose. Manuel pour les Etudiants en Médecine. WHO/CDS/TB/99.272.
- Ameni, G., Amenu, K., et Tibbo, M.** 2003. Bovine tuberculosis prevalence and risk factor assessment in cattle and cattle owners in Wuchale- Jida District, Central Ethiopia. *Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* **1**: 17-26.
- American Thoracic Society (ATS).** 2000. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **161**:1376-1395.
- Aranaz, A., E. Liebana, E. Gomez-Mampaso, J. C. Galan, D. Cousins, A. Ortega, J. Blazquez, F. Baquero, A. Mateos, G. Suarez, et L. Dominguez.** 1999. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **49**:1263-1273.
- Ayele, W. Y., S. D. Neill, J. Zinsstag, M. G. Weiss, et I. Pavlik.** 2004. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *Int.J.Tuberc.Lung Dis.* **8**:924-937.
- Baril, L., E. Caumes, C. Truffot-Pernot, F. Bricaire, J. Grosset, et M. Gentilini.** 1995. Tuberculosis caused by *Mycobacterium africanum* associated with involvement of the upper and lower respiratory tract, skin, and mucosa. *Clin.Infect.Dis.* **21** :653-655.
- BCR (1994):** Recensement général de la population et de l'habitat. 1993. Ministère du Plan et de la Coopération et Ministère de l'Intérieur et de la Sécurité, N'Djaména, 68p.
- Benkirane, A.** 1998. Bovine tuberculosis in Africa. *World Anim. Rev.* **90**: 54- 56.
- Berney, S., M. Goldstein, et F. Bishko.** 1972. Clinical and diagnostic features of tuberculous arthritis. *Am. J. Med.* **53**: 36-42.
- Billo, N. E.** 1996. [Epidemiologic trends in tuberculosis]. *Rev.Prat.* **46**:1332-1335.
- Bloch, A. B., G. M. Cauthen, I. M. Onorato, K. G. Dansbury, G. D. Kelly, C. R. Driver, et D. E. Snider, Jr.** 1994. Nationwide survey of drug-resistant tuberculosis in the United States. *JAMA* **271**:665-671.
- Bonsu, O. A., E. Laing, et B. D. Akanmori.** 2000. Prevalence of tuberculosis in cattle in the Dangme-West district of Ghana, public health implications. *Acta Trop.* **76**:9-14.

Bradley, S. G. 1973. Relationships among mycobacteria and nocardiae based upon deoxyribonucleic acid reassociation. *J.Bacteriol.* **113**:645-651.

Buddle, B. M., J. M. Pollock, M. A. Skinner, et D. N. Wedlock. 2003. Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. *Int.J.Parasitol.* **33**:555-566.

Butler, W. R. et L. S. Guthertz. 2001. Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. *Clin.Microbiol.Rev.* **14**:704-26

Calmette, A. 1927. La vaccination préventive contre la tuberculose. Masson et Cie, Paris.

Calmette, A. (1936). L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et chez les animaux. 4^{ème} Edit. A. Bocquet et L. Nègre, Eds., Masson, Paris, pp1024.

Carbonnelle, B. et E. Carpentier. 1995. [Bacteriological diagnosis of tuberculosis: current hieratic classification of methods]. *Rev.Med.Interne* **16**:518-523.

Castets, M., H. Boisvert, F. Grumbach, M. Brunel, et N. Rist. 1968. [Tuberculosis bacilli of the African type: preliminary note]. *Rev.Tuberc.Pneumol.(Paris)* **32**:179-184.

Cavanagh, R., M. Begon, M. Bennett, T. Ergon, I. M. Graham, P. E. de Haas, C. A. Hart, M. Koedam, K. Kremer, X. Lambin, P. Roholl, et D. D. Soolingen. 2002. *Mycobacterium microti* infection (vole tuberculosis) in wild rodent populations. *J.Clin.Microbiol.* **40**:3281-3285.

Collins, C. H. et J. M. Granges. 1983. The bovine tubercule bacillus. *J.Appl.Bacteriol.* **55**: 13-29.

Cosivi, O., F. X. Meslin, C. J. Daborn, et J. M. Grange. 1995. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans, with particular reference to Africa. *Rev.Sci.Tech.* **14**:733-746.

Cosivi, O., J. M. Grange, C. J. Daborn, M. C. Raviglione, T. Fujikura, D. Cousins, R. A. Robinson, H. F. Huchzermeyer, et F. X. Meslin. 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg.Infect.Dis.* **4**:59-70.

Crubézy, É., B. Ludes, J.-D. Poveda, J. Clayton, B. Crouau-Roy, et D. Montagnon. 1998. Identification of *Mycobacterium* DNA in an Egyptian Pott's disease of 5400 years old. *CR. Acad. Sci. Paris* **321**:941-951.

Dankner, W. M. et C. E. Davis. 2000. *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States-Mexico border in the Baja California region. *Pediatrics* **105**:E79.

Daoud, S., A. Yam, D. M. Daugla, E. Schelling, C. Diguimbaye, K. Bidjeh, P. Diallo, M. Tanner et J. Zinsstag. 2000. Couverture vaccinale et prévalence des

affections courantes chez les nomades du Chari-Baguirmi et du Kanem au Tchad. *Sempervira* **8**: 37-43.

Daoud, S. 2001. Etat de santé des pasteurs nomades du Chari-Baguirmi et du Kanem au Tchad. ITS, OMS, LRVZ, N'Djaména.

Delafosse, A., A. Traore, et B. Kone. 1995. [Isolation of pathogenic Mycobacterium strains in cattle slaughtered in the abattoir of Bobo-Dioulasso, Burkina Faso]. *Rev.Elev.Med.Vet.Pays Trop.* **48**:301-306.

Delafosse, A., F. Goutard, et E. Thebaud. 2002. Epidémiologie de la tuberculose et de la brucellose des bovins en zone péri-urbaine d'Abéché, Tchad. *Rev.Elev.Med.Vet.Pays Trop.* **55**:5-13.

Diguimbaye, C., E. Schelling, S. Daoud, M. D. Daugla, K. Bidjeh, et J. Zinsstag. 2000. Les zoonoses en milieu nomade au Tchad et l'interface entre la santé humaine et animale. In: «Actes des IIIe Journées Agro-Sylvo-Pastorales». 29 Novembre – 3 Décembre 1999, LRVZ, N'Djaména, pp.275-8.

Direction de l'élevage et des ressources animales (DERA). 2001. Rapport annuel d'activités 2000. N'Djaména, Tchad.

Diop, S., D. de Medeiros, G. de Medeiros, R. Baylet, et M. Sankale. 1976. [Incidence and geographic distribution of Mycobacterium africanum in Senegal]. *Bull.Soc.Med.Afr.Noire.Lang Fr.* **21**:50-56.

Dolin, P. J., M. C. Raviglione, et A. Kochi. 1994. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull.World Health Organ* **72**:213-220.

Doutoum A. M. et M. A. Toko. 2002. Mycobactérioses bovines et saisies à l'abattoir de Farcha. Mémoire de fin d'étude. Institut Universitaire des Sciences et Techniques d'Abéché (IUSTA), N'Djaména, 34p.

Dye, C., B. G. Williams, M. A. Espinal, et M. C. Raviglione. 2002. Erasing the world's slow stain: strategies to beat multidrug-resistant tuberculosis. *Science* **295**:2042-2046.

Enarson, D. A., H. L. Rieder, T. Arnadottir, et A. Trébucq. 2000. Prise en charge de la tuberculose. Guide pour les pays à faibles revenus. UICTMR. Paris.

Farer, L. S., A. M. Lowell, et M. P. Meador. 1979. Extrapulmonary tuberculosis in the United States. *Am.J.Epidemiol.* **109**:205-217.

Fishman, J. A., R. S. Roth, E. Zanzot, E. J. Enos, et M. J. Ferraro. 1994. Use of induced sputum specimens for microbiologic diagnosis of infections due to organisms other than *Pneumocystis carinii*. *J.Clin.Microbiol.* **32**:131-134.

Frieden, T. R., T. Sterling, A. Pablos-Mendez, J. O. Kilburn, G. M. Cauthen, et S. W. Dooley. 1993. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N.Engl.J.Med.* **328**:521-526.

Gallagher, J. et P. A. Jenkins. 1998. Mycobacterial Diseases. In: "ZOONOSES. Biology, Clinical practice, and Public Health Control" (Palmer S. R., Lord Soulsby, and Simpson D.I.H, Eds). OXFORD UNIVERSITY PRESS.

Garg, S. K., R. P. Tiwari, D. Tiwari, R. Singh, D. Malhotra, V. K. Ramnani, G. B. Prasad, R. Chandra, M. Fraziano, V. Colizzi, et P. S. Bisen. 2003. Diagnosis of tuberculosis: available technologies, limitations, and possibilities. *J.Clin.Lab Anal.* **17**:155-163.

Good, R. C., et T. M. Shinnick. 1998. Mycobacterium. In: "Topley's and Wilson's microbiology and microbial infections, systematic bacteriology" A. B. L. Collier, and M. Sussman (ed), 9th ed, Edward Arnold, London, p.5496-576.

Grosset, J. 1993. Fréquence et gravité actuelles de la résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux antibiotiques. *Ann. Inst. Pasteur (Actualités).* **4**: 196-202.

Hermans, P. W., D. van Soolingen, E. M. Bik, P. E. de Haas, J. W. Dale, et J. D. Van Embden. 1991. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect.Immun.* **59**:2695-2705.

Heyderman, R. S., M. Goyal, P. Roberts, S. Ushewokunze, S. Zizhou, B. G. Marshall, R. Makombe, J. D. Van Embden, P. R. Mason, et R. J. Shaw. 1998. Pulmonary tuberculosis in Harare, Zimbabwe: analysis by spoligotyping. *Thorax* **53**:346-350.

Hoffner, S. E., S. B. Svenson, R. Norberg, F. Dias, S. Ghebremichael, et G. Kallenius. 1993. Biochemical heterogeneity of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Guinea-Bissau. *J.Clin.Microbiol.* **31**:2215-2217.

Honore, N. (2002). The *Mycobacterium leprae* genome: from sequence analysis to therapeutic implications. *Med Trop.* **62**(5): 473-9.

Horstkotte, M. A., I. Sobottka, C. K. Schewe, P. Schafer, R. Laufs, S. Rusch-Gerdes, et S. Niemann. 2001. *Mycobacterium microti* llama-type infection presenting as pulmonary tuberculosis in a human immunodeficiency virus-positive patient. *J.Clin.Microbiol.* **39**:406-407.

Huet, M., N. Rist, G. Boube, et D. Potier. 1971. [Bacteriological study of tuberculosis in Cameroon]. *Rev.Tuberc.Pneumol.(Paris)* **35**:413-426.

Idigbe, E. O., C. E. Anyiwo, et D. I. Onwujekwe. 1986. Human pulmonary infections with bovine and atypical mycobacteria in Lagos, Nigeria. *J.Trop.Med.Hyg.* **89**:143-148.

Igbokwe, I. O., I. Y. Madaki, S. Danburam, J. A. Ameh, M. M. Aliyu, et C. O. Mwosu. 2001. Prevalence of pulmonary tuberculous lesions in cattle slaughtered in abattoirs in Northeastern Nigeria. *Rev.Elev.Med.Trop.,* **54**:191-195.

Jawetz, E., J. L. Melnick, et E. A. Adelberg. 1968. Review of medical microbiology. Blackwell Scientific. Publication. Oxford and Edinburgh. Lange medical Publication.

Jiwa, S. F. H., R. R. Kazwala, A. A. Aboud, et W. J. Kalaye. 1997. Bovine tuberculosis in the Lake Victoria zone of Tanzania and its possible consequences for human health in the HIV/AIDS era. *Vet.Res.Commun.* **21**:533-539.

Kallenius, G., T. Koivula, S. Ghebremichael, S. E. Hoffner, R. Norberg, E. Svensson, F. Dias, B. I. Marklund, et S. B. Svenson. 1999. Evolution and clonal traits of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Guinea-Bissau. *J.Clin.Microbiol.* **37**:3872-3878.

Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, et J. Van Embden. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J.Clin.Microbiol.* **35**:907-914.

Kazwala, R. R. 1996. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in Tanzania, (PhD thesis, University of Edinburgh).

Kazwala, R. R., C. J. Daborn, L. J. Kusiluka, S. F. H. Jiwa, J. M. Sharp, et D. M. Kambarage. 1998. Isolation of *Mycobacterium* species from raw milk of pastoral cattle of the Southern Highlands of Tanzania. *Trop.Anim Health Prod* **30**:233-239.

Kazwala, R. R., C. J. Daborn, J. M. Sharp, D. M. Kambarage, S. F. H. Jiwa, et N. A. Mbembati. 2001a. Isolation of *Mycobacterium bovis* from human cases of cervical adenitis in Tanzania: a cause for concern? *Int.J.Tuberc.Lung Dis.* **5**:87-91.

Kazwala, R. R., D. M. Kambarage, C. J. Daborn, J. Nyange, S. F. H. Jiwa, et J. M. Sharp. 2001b. Risk factors associated with the occurrence of bovine tuberculosis in cattle in the Southern Highlands of Tanzania. *Vet.Res.Commun.* **25**:609-614.

Kent, P. T. et G. P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology- a guide for the level III laboratory. U.S. Departement of health and human Services publication. Centers for Disease Control, Atlanta, Ga.

Kirschner, P., B. Springer, U. Vogel, A. Meier, A. Wrede, M. Kiekenbeck, F. C. Bange, et E. C. Bottger. 1993. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *J.Clin.Microbiol.* **31**:2882-2889.

Kleeberg, H.H. 1984. Human tuberculosis of bovine origin in relation to public health. *Rev.sci.tech.Off.int. Epiz.,* **3**:11-32.

Koeck, J. L., J. J. Bernatas, P. Gerome, M. Fabre, A. Houmed, V. Herve, et R. Teyssou. 2002. [Epidemiology of resistance to antituberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated from adenopathies in Djibouti. Prospective study carried out in 1999]. *Med.Trop.(Mars.)* **62**:70-72.

Kraus, G., A. Cleary, N. Miller, R. Seivright, A. K. Young, G. Spruill, et H. J. Hnatyszyn. 2001. Rapid and specific detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using fluorogenic probes and real-time PCR. *Mol.Cell.Probes* **15**:375-383.

Krönke, F. 2001. Perception of ill-health in a FulBe pastoralist community and its implications on health interventions in Chad. (PhD thesis, University Basel).

Lefèvre, M., J. Sirol, Y. Maurice, et J-C. Monteil 1970. Contribution à l'étude de la brucellose humaine et animale au Tchad. Isolement de 10 souches humaines sur 12 cas cliniques. Etude d'un foyer de brucellose caprine. *Med.Trop.***30**:477-488.

Le Guillou, M., J.-L. Pariente, et S.-M. Gueye. 1993. Tuberculose urogénitale. *Encycl. Méd. Chir. (Ed.) Technique*, 11p.

Levy-Frebault, V. V. et F. Portaels. 1992. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **42**:315-323

Lockman, S., J. D. Sheppard, C. R. Braden, M. J. Mwasekaga, C. L. Woodley, T. A. Kenyon, N. J. Binkin, M. Steinman, F. Montsho, M. Kesupile-Reed, C. Hirschfeldt, M. Notha, T. Moeti, et J. W. Tappero. 2001. Molecular and conventional epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Botswana: a population-based prospective study of 301 pulmonary tuberculosis patients. *J.Clin.Microbiol.* **39**:1042-1047.

Maho A., Mbakasse, R. N., et Boulbaye, N. 1999. Causes de saisies aux abattoirs du Tchad oriental. LRVZ/F. Novembre, 1999. N'Djaména, Tchad, Actes des III^{èmes} Journées Agro-Sylvo-Pastorales.

Massenet, D., O. Djime, et R. Karifene. 1993. [Seroepidemiological survey of brucellosis in abattoir personnel in N'Djamena (Tchad)]. *Med.Trop.(Mars.)* **53**:253-255.

Massenet, D. et O. N. Djemadji. 1994. [Chad: bibliographic review of reported cases]. *Med.Trop.(Mars.)* **54**:179-188.

Mbaihol, T. 2003. Etat de lieu de la tuberculose pulmonaire à microscopie négative au service de Pneumo-phtisiologie de l'Hôpital Général de référence Nationale de N'Djaména. A propos de 262 cas. (Thèse de doctorat en médecine, Université de N'Djaména).

Michalak, K., C. Austin, S. Diesel, M. J. Bacon, P. Zimmerman, et J. N. Maslow. 1998. *Mycobacterium tuberculosis* infection as a zoonotic disease: transmission between humans and elephants. *Emerg.Infect.Dis.* **4**:283-287.

Milstein, J. 1993. The immunological basis of immunisation. Module 5: Tuberculosis. WHO/EPI/GEN/93-15, Geneva.

Miltgen, J., M. Morillon, J. L. Koeck, A. Varnerot, J. F. Briant, G. Nguyen, D. Verrot, D. Bonnet, et V. Vincent. 2002. Two cases of pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* subsp *canetti*. *Emerg.Infect.Dis.* **8**:1350-1352.

Ministère de l'Élevage. 1998. Réflexion prospective sur l'élevage au Tchad. Ministère de l'Élevage, Tchad.

Ministère de l'Élevage. 2003. Rapport national sur les ressources zoo génétiques du Tchad. N'Djaména.

Moda, G., C. J. Daborn, J. M. Grange, et O. Cosivi. 1996. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tuber.Lung Dis.* **77**:103-108.

Mposhy, M., C. Binemo-Madi, et B. Mudakikwa. 1983. [Incidence of bovine tuberculosis and its relation to the health of the population of North Kivu (Zaire)]. *Rev.Elev.Med.Vet.Pays Trop.* **36**:15-18.

Murray, J. F. 1996. [Current clinical manifestations of tuberculosis]. *Rev.Prat.* **46**:1344-1349.

Narayanan, S., R. Sahadevan, P. R. Narayanan, P. V. Krishnamurthy, C. N. Paramasivan, et R. Prabhakar. 1997. Restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* strains from various regions of India, using direct repeat probe. *Indian J.Med.Res.* **106**:447-54.

Neill, S. D., J. Cassidy, J. Hanna, D. P. Mackie, J. M. Pollock, A. Clements, E. Walton, et D. G. Bryson. 1994. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Vet.Rec.* **135**:134-135.

New Jersey Medical School National Tuberculosis Center. 1996. Brief history of tuberculosis. (www.umdnj.edu/~ntbcweb/history.htm).

Niemann, S., E. Richter, et S. Rusch-Gerdes. 2002a. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **52**:433-436.

Niemann, S., S. Rusch-Gerdes, M. L. Joloba, C. C. Whalen, D. Guwatudde, J. J. Ellner, K. Eisenach, N. Fumokong, J. L. Johnson, T. Aisu, R. D. Mugerwa, A. Okwera, et S. K. Schwander. 2002b. *Mycobacterium africanum* subtype II is associated with two distinct genotypes and is a major cause of human tuberculosis in Kampala, Uganda. *J.Clin.Microbiol.* **40**:3398-3405.

Niobe-Eyangoh, S. N., C. Kuaban, P. Sorlin, P. Cunin, J. Thonnon, C. Sola, N. Rastogi, V. Vincent, et M. C. Gutierrez. 2003. Genetic biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from patients with pulmonary tuberculosis in Cameroon. *J.Clin.Microbiol.* **41**:2547-2553.

Njanpop-Lafourcade, B. M., J. Inwald, A. Ostry, B. Durand, S. Hughes, M. F. Thorel, G. Hewinson, et N. Haddad. 2001. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Cameroon. *J.Clin.Microbiol.* **39**:222-227.

- Norval, P. Y.** 2000. Révision du Programme National Tuberculose du Tchad. p12-18.
- Norval, P. Y., et J-P. Baptiste.** 1991. Lutte contre la tuberculose au Tchad. Bulletin de liaison et de documentation de l'O.C.E.A.C. **96**:21-23.
- Office International des Epizooties (OIE).** 1996. Manuel of Standard for Diagnostic Tests and Vaccines, Paris, p.267-270
- Okolo, M. I. O.** 1992. Tuberculosis in apparently healthy milk cows. *Microbios* **69**:105-111.
- Pfyffer, G. E., R. Auckenthaler, J. D. Van Embden, et D. van Soolingen.** 1998. *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. *Emerg.Infect.Dis.* **4**:631-634.
- Pfyffer, G. E., B. A. Brown-Elliott, et W.R. Jacobs.** 2002. *Mycobacterium*: General characteristics, isolation and staining procedures. In: "Manual of Clinical Microbiology" P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (eds). ASM press, Washington, D.C. vol.1 p.532-559.
- Phillips, M. S. et C. F. von Reyn.** 2001. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. *Clin.Infect.Dis.* **33**:1363-1374.
- Pritchard, D. G.** 1988. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. *J.Comp Pathol.* **99**:357-399.
- Runyon, E. H.** 1959. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med.Clin.North Am.* **43**:273-290.
- Schelling, E., C. Diguimbaye, S. Daoud, D. M. Daugla, K. Bidjeh, M. Tanner, et J. Zinsstag.** 2000. La tuberculose causée par *Mycobacterium bovis* : résultats préliminaires obtenus chez les pasteurs nomades Foulbés et Arabes dans le Chari-Baguirmi au Tchad. *Sempervira* **8**:44-55.
- Schelling, E.** 2002. Human and animal health in three nomadic communities: Zoonosis, morbidity, and health systems. (PhD thesis, University Basel).
- Schwabe C.** 1984. Veterinary medicine and human health. Williams and Wilkins, Baltimore/London.
- Simon, F., M. Fabre, A. Jouvion, A. Barreh, X. Nicolas, et J. J. De Pina.** 2003. Septicémies à *Mycobacterium tuberculosis* au cours du SIDA. A propos de 7 cas observés en République de Djibouti. Communications affichées (CA41). *Med.Trop.***63**:332.
- Small, P. M., G. F. Schecter, P. C. Goodman, M. A. Sande, R. E. Chaisson, et P. C. Hopewell.** 1991. Treatment of tuberculosis in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N.Engl.J.Med.* **324**:289-294.

Suliaman, M. S. et M. E. Hamid . 2002. Identification of acid fast bacteria from caseous lesions in cattle in Sudan. *J. Vet. Med.* **49** (9): 415-418.

Telnyaret, A. M. 2003. Etat de lieu du mal de Pott au service de Pneumo-phtisiologie de l'Hôpital Général de référence Nationale de 1995-2001. Thèse de doctorat en médecine, Université de N'Djaména

Thierry, D., A. Brisson-Noel, V. Vincent-Levy-Frebault, S. Nguyen, J. L. Guesdon, et B. Gicquel. 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J.Clin.Microbiol.* **28**:2668-2673.

Thoen, C. O. 1994. Tuberculosis in Wild and Domestic Mammals. In: "Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control." (Ed). By Barry R. Bloom. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Thoen, C. O., et B. R. Bloom. 1995. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*. In: "Mycobacterium bovis infection in animals and humans" Thoen, C. O. & Steele, J. H. (Eds) AMES, Iowa, p.3-14.

Van Embden, J. D., M. D. Cave, J. T. Crawford, J. W. Dale, K. D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, et T. M. Shinnick. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J.Clin.Microbiol.* **31**:406-409.

van Soolingen, D., T. Hoogenboezem, P. E. de Haas, P. W. Hermans, M. A. Koedam, K. S. Teppema, P. J. Brennan, G. S. Besra, F. Portaels, J. Top, L. M. Schouls, et J. D. Van Embden. 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **47**:1236-1245.

van Soolingen, D., A. G. van der Zanden, P. E. de Haas, G. T. Noordhoek, A. Kiers, N. A. Foudraïne, F. Portaels, A. H. Kolk, K. Kremer, et J. D. Van Embden. 1998. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J.Clin.Microbiol.* **36**:1840-1845.

Vekemans, M., M. Cartoux, S. Diagbouga, M. Dembele, B. Kone, A. Delafosse, A. Dera, et P. Van de Perre. 1999. Potential source of human exposure to *Mycobacterium bovis* in Burkina Faso, in the context of the HIV epidemic. *Clin.Microbiol.Infect.* **5**:617-621.

Veterinary Public Health Unit. 1994. Report of the WHO working group on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*): Memorandum from WHO meeting (with the participation of FAO) *Bull WHO*, **72**:851-857.

Viana-Niero, C., C. Gutierrez, C. Sola, I. Filliol, F. Boulahbal, V. Vincent, et N. Rastogi. 2001. Genetic diversity of *Mycobacterium africanum* clinical isolates based on IS6110-restriction fragment length polymorphism analysis, spoligotyping, and variable number of tandem DNA repeats. *J.Clin.Microbiol.* **39**:57-65.

Wayne, L. G., et G. P. Kubica. 1986. The mycobacteria. In: "Bergey's manual of systematic bacteriology" I.P.H.A.S. (ed) The Williams and Wilkins Co, Baltimore, Md. p.1435-1457.

Wells, A. Q. et D.M. Oxon. 1937. Tuberculosis in wild voles. *Lancet* **1**:1221.

Wiese, M. 1997. Preliminary study on the health of nomads in the prefecture of Chari-Baguirmi, Tchad. Swiss Tropical Institute, Basel.

Wiese, M. 2004. Health-vulnerability in a complex crisis situation. Implications for providing health care to nomadic people in Chad. (PhD thesis, University Freiburg).

Wood, P. R., L. A. Corner, et P. Plackett. 1990. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Res.Vet.Sci.* **49**:46-49.

World Health Organisation (WHO). 2004. Tuberculosis. Fact Sheet N° 104 Ref Type: Electronic Citation

Zink, A. R., C. Sola, U. Reischl, W. Grabner, N. Rastogi, H. Wolf, et A. G. Nerlich. 2003. Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J.Clin.Microbiol.* **41**:359-367.

Zinsstag, J., K. Bidjeh, et Idriss, A. O. 1998. L'interface entre la santé humaine et animale en Afrique: « vers une médecine unie ». In: Wiese M. & Wyss L. (Eds.) APT-Reports 9. University of Freiburg.

ANNEXES

Annexe 1 MÉSURES DE SÉCURITE AU LABORATOIRE

Prévention de l'infection dans les laboratoires de mycobactériologie

La plupart des cas d'infection acquise au laboratoire proviennent de l'aspiration d'aérosols contenant des micro-organismes viables. Ces aérosols sont produits lors de la manipulation de produits pathologiques ou de cultures: ouverture de tubes, préparation de frottis, transfert de frottis avec pipettes ou anses, centrifugation ou agitation des tubes ou fioles, accident de manipulation où les tubes sont brisés. Même avec les meilleures techniques, il n'est pas possible d'empêcher toute formation d'aérosol. Le personnel de laboratoire est donc susceptible d'être infecté si des précautions adéquates ne sont pas adoptées.

Dans la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé établie en 1983, les bacilles de la tuberculose appartiennent au groupe à risque III. Les organismes du groupe à risque III et le matériel nécessaire doivent être manipulés dans un laboratoire de sécurité biologique pour lequel sont imposées des normes standard d'aménagement et de fonctionnement, qui sont essentiellement :

1. agencement de l'équipement et du petit matériel dans l'aire de travail;
2. équipement et méthodes évitant tout danger
3. surveillance médicale du personnel

Aire de travail

Une pièce séparée ou un laboratoire de sécurité biologique doit être utilisé pour la manipulation de tout le matériel qui contient ou qui est susceptible de contenir des bacilles de la tuberculose.

Chaque laboratoire de sécurité doit être équipée d'au moins une hotte biologique de sécurité (HBS).

Hotte biologique de sécurité

Deux hottes biologiques de sécurité conviennent pour travailler avec les bacilles de la tuberculose dans les laboratoires de sécurité biologique : les hottes de classe I à aspiration et les hottes de classe II à flux laminaire.

Maintenance et utilisation de la hotte biologique de sécurité

1. L'utilisateur doit avoir présent à l'esprit que la hotte ne protège que des aérosols et non des liquides renversés accidentellement.
2. Le travail doit s'effectuer au milieu ou à l'arrière de la hotte et non dans la zone située à 15 cm du bord frontal.
3. Il faut éviter l'utilisation du gaz en remplaçant les anses métalliques qui nécessitent un passage à la flamme par des anses en plastique jetables ou en utilisant un incinérateur de paille.
4. Aucun matériel superflu ne doit être conservé sous la hotte de manière à réduire les perturbations du flux d'air.
5. Tout matériel nécessaire doit être placé dans la hotte avant de commencer une manipulation. Les mains seront retirées le moins possible pour éviter de faire sortir des aérosols.
6. Après une journée de travail, le plan de travail doit être nettoyé avec un désinfectant approprié tel que 5% d'hypochlorite dans 70% d'éthanol du glutaraldéhyde.
7. La hotte et l'ensemble des filtres doivent être décontaminés à intervalles réguliers avec du formaldéhyde (gaz), en suivant les instructions du fabricant.
8. Si les hottes sont équipées de lampe UV germicides, il faut allumer les lampes après avoir nettoyé le plan de travail et les laisser jusqu'au lendemain matin. Ces lampes doivent être vérifiées régulièrement d'une part avec un UV mètre pour s'assurer que la radiation est bien à 253 nm et d'autre part en enregistrant leur temps de fonctionnement. Il faut les éliminer quand la radiation ne représente que 30% de l'émission initiale.

Dangers non infectieux liés aux HBS

Le feu est le risque le plus probable si des becs Bunsen sont utilisés sous la hotte. Les bouchons de coton et autres matériels inflammables peuvent prendre feu. Le fort courant d'air peut éteindre les veilleuses et le gaz envahir la hotte. Si le flux d'air est alors coupé, cela peut provoquer une explosion. En l'absence de flamme visible, le manipulateur doit s'assurer que le gaz est effectivement fermé. Après la mise en route du ventilateur et une fois que le courant d'air s'est établi, il faut attendre plusieurs minutes avant d'allumer le bec Bunsen.

Matériels et techniques adaptés à la sécurité

1. Il faut bannir le pipetage à la bouche et utiliser des micro pipettes.
2. Du matériel en plastique jetable doit être utilisé chaque fois que cela est possible (anses en plastique évitent l'utilisation du gaz et les pipettes Pasteur en plastique).
3. L'emploi des seringues et aiguilles doit être évité.
4. Les centrifugeuses doivent être équipées de pots ou de godets de sécurité qui peuvent se fermer hermétiquement (de manière à éviter la formation d'aérosols).
5. Les pipettes usagées et tout le matériel utilisé doivent être placés dans un désinfectant convenable, puis auto clavés après une nuit de mise en contact.
6. Les échantillons et les cultures à jeter seront placés dans des boîtes en métal ou en polypropylène (dépourvues de fuite) et auto clavés.
7. Il faut fournir au personnel des blouses protectrices convenables. Ces blouses seront enlevées avant chaque départ du laboratoire.
8. Il faut se laver les mains à l'eau chaude et au savon après chaque interruption du travail. Il faut utiliser les serviettes en papier pour se sécher les mains.
9. Au laboratoire, il est interdit de manger, boire, fumer et coller des étiquettes.

Surveillance médicale

Toutes les personnes travaillant dans un service de tuberculose doivent :

- a. Présenter un test de Mantoux positif ou faire la preuve d'une vaccination par BCG. Les personnes à test négatif doivent être exclues jusqu'à ce qu'elles aient été vaccinées par le BCG. (La vaccination ne doit pas être effectuée au laboratoire).
- b. Passer une radiographie pulmonaire par an avec de préférence un examen médical.

Procédure de décontamination de matériels souillés accidentellement dans un laboratoire

Dans le cas d'une exposition de matériels pathogènes due à une mauvaise manipulation d'échantillons ou de cultures (tubes cassés ou contenu d'un pot renversé), les dispositions suivantes doivent être prises :

1. Couper la respiration quelques secondes le temps de se protéger la face avec un masque. Les masques doivent être localisés en un lieu fixe connu et accessible à tout le personnel impliqué dans les travaux du laboratoire.
2. Demander aux autres personnes présentes dans la salle de sortir. Fermer la porte.
3. Pulvériser la surface souillée ainsi que les matériels avec 5% de phénol.

4. Attendre dans la salle 15 minutes le temps que le désinfectant agisse.
5. Nettoyer le désinfectant et les débris.
6. Stériliser les matériels et les vêtements contaminés. Désinfecter les autres matériels chimiquement.

Désinfectants

Les désinfectants utilisés au laboratoire sont l'eau de Javel diluée et 5% de Phénol. L'eau de Javel sert à désinfecter la peau et le phénol est utilisé pour désinfecter le matériel et la salle. Éviter les vapeurs du phénol.

Annexe 2 MILIEUX DE CULTURES

1. Milieu de Löwenstein- Jensen

Matériels

- Ballon de 2 litres + entonnoir muni de gaze contenant un agitateur le tout stérile
- 2 bêcher de 1 litre stériles
- une batteuse électrique dont les accessoires sont maintenus dans l'alcool à 70%
- Un répartiteur stérile
- Paniers de tubes stériles
- Bouchons de tubes stériles
- Bec Bunzen
- Bain- marie avec accessoire pour coagulation du milieu
- Un bouchon en coton pour le ballon de 2 litres

Ingrédients

- Milieu de base Löwenstein- Jensen
- Œufs frais
- Glycérine ou Pyruvate de sodium
- Ethanol à 70%

Préparation du milieu

- Jour zéro (0)

Stérilisation des matériels

- Jour un (1)

a) Préparation du milieu de base dans un bêcher

Milieu de base Löwenstein- Jensen	18.6g
Glycérine ou Pyruvate de Sodium	6ml ou 4.8g
Eau distillée	300ml

Mettre le bêcher contenant le milieu dans un bain- marie bouillant mélanger constamment à l'aide d'une baguette, lorsque le mélange à la consistance d'une bouillie le sortir du bain bouillant. Fermer avec du papier aluminium et donner à stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15mn.

b) Préparation des œufs

Les œufs frais sont trempés dans de l'eau tiède contenant un détergent afin de les débarrasser des impuretés, puis ils sont rincés à l'eau courante, séchés et trempés dans l'éthanol à 70 % pendant 30mn. Après désinfection, ils sont placés sur un plateau propre

muni de papier absorbant puis déposé dans la salle de préparation. La salle est mise sous UV deux heures avant son utilisation.

c) Mélange des composantes

Dans la salle aseptisée, toutes les composantes sont regroupées. Dans un bêcher stérile, placé aux abords de la flamme, les œufs sont cassés jusqu'à l'indication 500ml. Ils sont homogénéisés à l'aide de la batteuse électrique pendant 2 à 3mn. Ensuite le mélange est rajouté au milieu de base stérile puis mélangés avec la même batteuse. Après homogénéisation, le mélange est filtré à travers la gaze stérile, puis mis sous agitation lente pendant au moins 2 heures.

d) Le milieu est réparti à raison de 8ml par tubes, puis déposé à +4°C jusqu'au lendemain.

- Jour deux (2)

Après chauffage du bain- marie à 90°C, les tubes sont disposés dans un bac métallique en position couchée et sont incubés pendant 50mn, après coagulation, les tubes refroidis à la température de la salle avant d'être transférés à +4°C jusqu'au jour suivant.

- Jour trois (3)

Les tubes contenant les milieux coagulés, sont disposés dans un four chauffé à 80°C pendant 45mn. Après refroidissement à la température de la salle, les tubes sont disposés à l'étuve à 37°C pendant 48 heures pour tester la stérilité puis ils sont conservés à +4°C jusqu'à utilisation.

2. Milieu liquide pour culture primaire

Matériels

- Ballon de 1 litre + un agitateur le tout stérile
- Un répartiteur stérile
- Paniers de tubes stériles
- Bouchons à vis pour tubes stériles
- Bec Bunzen

Préparation du milieu

Middlebrook 7H9 Broth	5.9g
Trypto-caséine soja broth	1.25g
Glycérine ou Pyruvate de Sodium	3.1ml ou 6g
Eau distillée	1000ml

- Dans le ballon de 1L mélanger les réactifs ci-dessus à l'aide d'un barreau magnétique.
- Répartir dans les tubes en verre à raison de 4ml par tube
- Vérifier le pH à 7.3 +/- 0.2
- Stériliser à l'autoclave, 121°C 15mn.
- Pour le contrôle de stérilité, incuber 48H à 37°C.

Au moment de l'utilisation, ajouter au milieu liquide, de l'OADC (Albumine bovine, Dextrose, Catalase, Acide oléique) et du PANTA (Polymyxin, Amphotericin B, Nadilixic acid, Trimethoprim, Azlocillin). L'addition se fait comme suit: prendre une ampoule de PANTA et un flacon d'OADC, transférer le contenu de flacon OADC dans l'ampoule contenant l'antibiotique, bien agiter pour faire dissoudre le PANTA et au moment de l'ensemencement du milieu liquide, rajouter 0.4ml du mélange OADC-PANTA aux 4ml de milieu liquide prêt à l'emploi à l'aide d'une seringue à usage unique de 1ml. Le reste du mélange doit être maintenu à +4°C et à l'abri de la lumière.

3. Milieu de Middlebrook 7H-10 enrichi à l'OADC

Matériels

- Ballon de 2 litres + un agitateur le tout stérile
- Un répartiteur stérile de 10 ou 20ml
- Boîtes de Petri à usage unique ou en verre stérile
- Bec Bunzen

Préparation du milieu

Gélose de base Middlebrook 7H-10	19.5g
Glycérine	5ml
Eau distillée	900ml

- Dans le ballon de 1L mélanger les réactifs ci-dessus à l'aide d'un barreau magnétique, chauffer le mélange dans un bain marie jusqu'à homogénéisation de la gélose.
- Stériliser le milieu à l'autoclave 15 minutes à 121°C.
- Ramener la température du milieu à 56°C et ajouter stérilement 100ml d' OADC (Albumine bovine, Dextrose, Catalase, Acide oléique), bien mélanger sur agitateur magnétique.
- Répartition se fait sous la hotte aux abords de la flamme. Le milieu est réparti à raison de 20ml par boîte de Petri.

- Après solidification du gel sous la hotte, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 48 heures pour le contrôle de la stérilité.

4. Milieu de Lebek modifié

Matériels

- Ballon de 2 litres + un agitateur le tout stérile
- Un répartiteur stérile
- Paniers de tubes stériles
- Bouchons à vis pour tubes stériles
- Bec Bunzen
-

Préparation

- a) Solution de bleu de Bromothymol à 0.2%

Bleu de Bromothymol	2g
NaOH (1/10N)	50ml
Eau distillée	1000ml

NaOH 1/10N

NaOH 4%= 1N	5ml
Eau distillée	45ml

- b) Milieu de Lebek

L-Aspargin-Monohydrat	4g
Tri- Sodium citrate	3.4g
Sulfate de Magnésium	0.5g
Citrate d'Ammonium ferreux	0.05g
Potassium di- hydrogeno- phosphate	0.25g
di-Sodium- hydrogeno-phosphat-Dihydrat	2.4g
Glycérine	50ml
Agar granulé	2g
Solution de bleu de Bromothymol 0.2%	20ml
Eau distillée	750ml

- Dans le ballon de 1L muni d'un barreau magnétique, mélanger les réactifs ci-dessus.
- Vérifier le pH, 7.2-7.4
- Stériliser à l'autoclave 118°C 30 min
- Ramener la température à 50°C dans un bain marie
- Rajouter stérilement 90ml de sérum de veau
- Répartir stérilement dans des tubes en verre avec bouchon à vis, à raison de 7ml/
tube.
- Tester la stérilité à 37°C pendant 48 heures
- Conserver à +4°C.

Annexe 3 LA COLORATION DE ZIEHL-NEESEN

Matériels

- Lames
- Anse bactériologique
- portoirs pour lame
- Container avec désinfectant
- Papier filtre
- Eprouvette graduée
- Pipettes 1 et 10 ml
- Gants et masques
- Bec Bunsen
- Microscope (objectif 10X et 100X)

Réactifs

- Fuchsine ordinaire
- Ethanol 90- 95%
- Phénol (cristaux)
- Acide chlorhydrique concentré
- Bleue de méthylène
- Eau distillée
- Huile à immersion

Préparation des colorants et solution de décoloration

- Solution de coloration de Carbo- fuschine

a) Solution 1

Dissoudre 3g de fuschine dans 100ml d'éthanol à 95%

b) Solution 2

Dissoudre 5g de phénol en cristaux dans 100 ml d'eau distillée. Chauffer si nécessaire.

c) Solution de travail

Mélanger 10 ml de la solution 1 avec 90 ml de la solution 2. Etiqueter le flacon et mentionner la date de préparation et celle d'expiration, sachant que le réactif peut être conservé 3 mois à la température de la salle.

- Solution de décoloration

Ajouter lentement 3 ml d'acide chlorhydrique concentré dans 97 ml d'éthanol à 95%.

Etiqueter le flacon en mentionnant la date de préparation et d'expiration du réactif.

Conserver 3 mois à la température de la salle.

- Solution de contre coloration

Dissoudre 0.3g de bleue de méthylène dans 100 ml d'eau distillée. Etiqueter et

conserver 3 mois à la température de la salle

Procédé de la coloration

La méthode directe

- Couvrir la lame avec la solution de fuchsine préalablement filtrée
- A l'aide du bec bunsen, chauffer doucement le dessous de la lame jusqu'à l'apparition de vapeur.
- Dès l'apparition des vapeurs, éloigner la flamme et laisser 5mn.
- Laver rapidement la lame à l'eau distillée.
- Couvrir la lame avec la solution acide – alcool à 3% et laisser agir 2mn.
- Rincer la lame à l'eau distillée pour évacuer la solution de décoloration.
- Couvrir la lame avec le bleu de méthylène et laisser agir 2mn.
- Laver à l'eau et laisser sécher à l'air libre sur le portoir
- Examiner le frottis avec l'objectif 100X.

Lecture des lames

A. Méthode de lecture

- Examiner la lame sous l'objectif 100X avec l'huile à immersion
- Les objectifs 20X ou 40X seront utilisés pour repérer les points colorés de la lame et l'objectif 100X permettra de confirmer les caractéristiques morphologiques de ces matériels colorés.
- Examiner soigneusement chaque lame afin de déceler la présence de bacilles acido-alcool- résistants (BAAR). Il est recommandé de parcourir au moins 100 champs avant de conclure que la lame est négative.
- Il faudrait adopter une procédure qui permettrait de parcourir toute la lame. Trois passages de la lame en longueur ou neuf passage en largeur.

B. Caractéristique morphologique

- Les Bacilles AAR ont une longueur qui varient entre 1 et 10 μm et apparaissent sous forme de bâtonnets fins au bout arrondis mais ils peuvent être aussi incurvés.
- Les bactéries individuelles peuvent se trouver dans des zones fortement colorées.

Annexe 4 DÉCONTAMINATION ET MISE EN CULTURE

Préparation des réactifs

- Solution pour la décontamination

a) Les solutions- mère de NaOH- Citrate de Sodium

Solution.1: Citrate de Sodium

Citrate de sodium dihydrate 29g

ou citrate de Sodium anhydre 26g

Eau distillée 1000ml

Solution.2: 4% NaOH (1N)

Pastille de NaOH 40g

Eau distillée 1000ml

Mélanger à volume égal les solutions 1 et 2, stériliser le mélange à l'autoclave 121°C pendant 15 minutes dans tubes avec bouchons à vis.

b) Solution de travail pour la décontamination

Volume total (ml)	NaOH- citrate de soude (ml)	NALC (g)
50	50	0.25
100	100	0.50
250	250	1.25
500	500	2.50
1000	1000	5.00

Le jour de la décontamination, mélanger le NALC avec la solution de travail NaOH-citrate de sodium selon les indications du tableau ci- dessus. La solution complète doit être utilisée dans les 24 heures. Après 24 heures, le réactif doit être éliminé.

- Tampon phosphate (PBS) pH 6.8

a) Les solutions- mère

Solution.1: tampon basique

Na₂ HPO₄ (anhydre) 9.47g

Eau distillée 1000ml

Solution.2: Tampon acide

KH₂ PO₄ 9.07g

Eau distillée 1000ml

b) Tampon phosphate (pH 6.8)- solution de travail

Mélanger les solutions 1 et 2., vérifier le pH, si après mélange des 2 solutions le pH 6.8 n'est pas obtenu, faudrait le réajuster soit avec de la solution basique pour le relever soit ajouter la solution acide pour diminuer. Ensuite, répartir le mélange dans des flacons avec bouchons à vis, les faire stériliser à l'autoclave, 121°C, 15 minutes et conserver à +4°C.

Procédure de décontamination

a) La décontamination des spécimens.

Crachat

- Effectuer le frottis (1) directement à partir du prélèvement réceptionné.
- A l'aide d'une pipette stérile (5 ou 10ml), transférer le crachat du pot de prélèvement dans le pot de décontamination (tube FALCON® de 50ml), maximum 10ml à transférer, si le volume est moins de 10ml, alors transférer le tout et ramener le volume à 10ml avec de l'eau distillée stérile.
- Ajouter au contenu du tube, 10ml de la solution de travail Citrate- NaOH- NALC, agiter 20sec sur vortex et laisser reposer 15mn en position verticale sous la hotte.
- Après incubation rajouter 30ml de PBS pH 6.8, agiter délicatement en agitant le tube dans le sens dessus- dessous 10 fois.
- Centrifuger 15mn à 3500T/min
- Eliminer le surnageant, et rajouter au culot 2ml d'eau distillée stérile.
- Agiter la suspension sur vortex et inoculer : 1 tube de milieu liquide avec 0.5ml de la suspension et 2 tubes LJ (G et P) chacun avec 0.25ml de la même suspension.
- Placer une goutte sur la lame pour le second frottis (2).

Urines

- Transférer les urines réceptionnées dans un tube de 50ml et centrifuger 10mn à 3000T/min.
- Préparer un frottis à partir du culot → frottis (1).
- Ramener le volume du culot à 10ml avec de l'eau distillée stérile et rajouter 10ml de décontaminant.
- Agiter 20sec sur vortex et laisser reposer 15mn en position stationnaire sous la hotte.
- Procéder ensuite comme pour le crachat.

Ponctions de liquides et Biopsies d'organes

Pour ces prélèvements considérés comme étant «propres», la décontamination n'est pas systématique, mais ils sont ensemencés simultanément sur une gélose chocolat et sur les milieux utilisés pour les autres spécimens afin de s'assurer de l'absence de germes de contamination.

Biopsies des abattoirs

Les tissus sont préalablement lavés dans une solution d'eau de Javel, puis rincés l'eau distillée. Les tissus sont broyés avec une solution physiologique (0.85% NaCl) et la suspension obtenue est décontaminée selon le même procédé que pour le crachat.

- b) Re- décontamination des échantillons ou des cultures contaminées.
- 0.5 ml de matériel décontaminé précédemment et conservé à +4°C ou de la suspension d'une culture contaminée est transféré dans un nouveau tube FALCON®
- Ajouter 5 ml de NALC-NaOH de travail et agiter sur vortex, puis placer sous agitation continue durant 5 minutes.
- Ajouter 20 ml de PBS. pH 6.8 et agiter à la main par un mouvement de va et vient 10 fois
- Centrifuger à 3000 Tours/ minute à la température de la salle
- Vider le surnageant, nettoyer le rebord avec le tampon de papier imbibé d'alcool
- Ajouter au culot 1 ml d'eau distillée stérile et agiter sur vortex.
- Ensemencer: 500µl sur 7H9 sélectif, 200µl sur chaque L J et 100µl sur 7H10.

Annexe 5 CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DES SOUCHES DU COMPLEXE *M. tuberculosis*

Pour la caractérisation biochimique, trois tests sont utilisés dans la routine. Toutes les manipulations sont faites sous la Hotte de Biosécurité.

	H37- <i>M. tbc</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. fortuitum</i>	NTM	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i> BCG
Niacine	+	-		-/+	-	-
Nitrate	+	-		-/+	-	(+)/-
Catalase 68°C	-		+	+	-	-

Tableau 1 Les critères de classification par caractérisation biochimique

1. Catalase thermostable

Préparation du tampon phosphate pH 7.0

Utiliser les solutions mères de Na₂HPO₄ et KH₂PO₄

Mélanger :

Solution mère Na₂HPO₄61.1 ml

Solution mère KH₂PO₄.....38.9 ml

Vérifier le pH et stériliser à l'autoclave 121°C, 20mn

Préparation de la solution de Tween 80 à 10%

Tween 80.....10 ml

Eau distillée.....90 ml

Mélanger les ingrédients et stériliser à l'autoclave 10 mn à 121°C, aussitôt après la stérilisation, agiter le contenu du flacon pour ré-solubiliser le tween80 avant le refroidissement, ensuite laisser refroidir à la température ambiante puis conserver à +5°C

Matériels

Cultures purifiées sur milieu solide (LJ) à tester, âgées au moins de 4 semaines

Culture contrôle positif (*M. fortuitum*)

Culture contrôle négatif (*M. tuberculosis*)

Contrôle blanc (tube avec diluant)

Eau oxygénée (H₂O₂) 30%V/V

Tubes secs avec bouchon à vis stérile (petits)

Bain-marie à 68°C

Procédure

Mettre le bain-marie en marche à 68°C

- 1) Disposer sur un portoir le nombre de tubes secs stériles correspondant au nombre de cultures à tester ainsi que pour les contrôles et les identifier.
- 2) Dans tous les tubes répartir 0.5 ml de PBS pH 7.0
- 3) A l'aide d'une anse bactériologique, prendre une masse de culture et la suspendre dans le tube contenant le PBS pH 7.0
- 4) Mettre au bain-marie à 68°C, 20 mn
- 5) Sortir du bain-marie et laisser refroidir à la température ambiante.

Préparer le mélange Tween 80 à 10% avec l'eau oxygénée (H₂O₂) 30%V/V, le mélange se fait volume à volume (par exemple 5ml de chaque solution)

- 6) Après refroidissement des tubes, ajouter dans chaque tube 0.5 ml du mélange Tween 80/ H₂O₂ et observer la réaction.

Résultats

- Formation d'une mousse blanche à la surface du liquide : la réaction est positive
- Pas de mousse : la réaction est négative
- Une faible formation de bulle est considérée comme une réaction positive

N.B. maintenir les tubes 30 min avant de les éliminer.

2. Réduction des nitrates

Préparation de la solution de nitrate de sodium

0,01M de NaNO₃ dans 0,022M de PBS, pH 7.0

Nitrate de sodium (NaNO₃), Fluka 717581.7g

Potassium dihydrogène- phosphate (KH₂PO₄), Merck 1.04873.....2.34g

di- Sodium hydrogène- phosphate- Dihydrate (Na₂HPO₄.2H₂O) Merck 1.06580...9.7g

Eau

distillée.....2000ml

Mélanger les ingrédients et stériliser à l'autoclave, 15mn, 121°C

Conserver à +5°C, à l'abri de la lumière.

Préparation des Réactifs I, II et III

Réactif I:

Eau distillée stérile50ml
HCl 32%.....50ml
Ajouter toujours l'acide lentement dans l'eau et conserver à +4°C. à l'abri de la lumière.

Réactif II:

Sulfanilamide Merck 8035.....200mg
Eau distillée., stérile100ml
Dans un flacon préalablement stérilisé, mettre l'eau distillée stérile et rajouter le sulfanilamide, mélanger et conserver la solution à +4°C. à l'abri de la lumière

Réactif III:

N-(Naphthyl-(1))-éthylendiammoniumdichlorid, Merck 1.06237.....100mg
Eau distillée stérile.....100ml
Mélanger les ingrédients dans un flacon stérile et conserver à +4°C, à l'abri de la lumière

Matériels

Cultures purifiées sur milieu solide (LJ) à tester, âgées au moins de 4 semaines

Culture contrôle positif (M. tuberculosis)

Culture contrôle négatif (MAC)

Contrôle blanc (tube avec diluant)

Eau distillée stérile

Zinc en poudre

Tubes avec bouchon à vis stérile (petits)

Bain-marie à 37°C

Procédure

Mettre le bain-marie en marche, réglé à 37°C

- 1) Disposer sur un portoir le nombre de tubes secs stériles correspondant au nombre de cultures à tester ainsi que pour les contrôles et les identifier.
- 2) Dans tous les tubes répartir 0.2 ml d'eau distillée stérile
- 3) A l'aide d'une anse bactériologique, prendre une masse de culture et la suspendre dans le tube contenant l'eau distillée.
- 4) Ajouter 2 ml du substrat NaNO₃ dans chaque tube, agiter les tubes à la main et mettre au bain-marie à 37°C, 2 heures
- 5) Sortir du bain-marie, laisse à la température ambiante au moins 5 minutes
- 6) Ajouter les réactifs selon l'ordre cité : Une (1) goutte du réactif 1,

Deux (2) gouttes du réactif 2,

Deux (2) gouttes du réactif 3.

7) Après l'adjonction du dernier réactif, on peut remarquer un changement de couleur de la solution dans les tubes.

Résultats

- S'il y a une coloration rose pâle à rouge foncé, qui comparé au standard donnent les résultats entre 3+ et 5+ sont considérés comme positif : résultat positif.
- S'il n'y a pas de coloration, soit le test est négatif, soit la réduction s'est fait jusqu'aux nitrites, dans ce cas, ajouter une petite quantité de poudre de zinc dans tous les tubes non colorés:
 - a) Si le nitrate est présent, il sera réduit de manière catalytique par le zinc et la couleur rouge apparaîtra même momentanément, ce qui confirmera la réaction négative.
 - b) Si aucune couleur ne se développe suite à l'adjonction du zinc, alors le test est positif, car le nitrate a été réduit jusqu'au nitrite. Dans ce cas, refaire le test pour confirmer le résultat.

3. Détection de la Niacine

Matériels

Cultures purifiées sur milieu solide (LJ) à tester, âgées au moins de 4 semaines

Culture contrôle positif (M. tuberculosis)

Culture contrôle négatif (MAC)

Contrôle blanc (tube avec diluant)

Tubes secs avec bouchon à vis stérile (petits)

Eau distillée stérile

Bandelette INH

Procédure

1) Extraction de la niacine

Prendre 1 ml d'eau distillée stérile, rajouter dans les tubes de culture sur LJ et laisser les tubes sur le portoir en position inclinée au moins deux (2) heures pour que l'eau soit en contact avec les mycobactéries.

- 2) Ensuite prendre un (1) ml de la phase liquide et transférer dans un tube sec et introduire une bandelette INH puis reboucher le tube. Agiter le tube et le placer en position verticale sur le portoir,
- 3) Après 15 mn et jusqu'à 30 mn, observer la couleur du liquide au fond du tube et comparer avec le contrôle blanc (eau distillée).

Résultats

- Coloration jaune de l'extrait : test positif
- Pas de coloration dans l'extrait: test négatif.

Avant d'éliminer le contenu des tubes, neutraliser avec une solution de NaOH à 10%.

Annexe 6 TEST INDIRECT DE SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES: MÉTHODE DES DISQUES

1. Préparation de l'inoculum à partir de la culture solide

- a) Prendre (2 à 5mg) de culture sur milieu sans antibiotique (ATB), prendre des portions de différentes colonies.
- b) Transférer dans un tube avec bouchon à vis contenant 6 à 8 billes de verre et 3ml de milieu liquide Tween- albumine.
- c) Homogénéiser sur vortex 5 à 10min.
- d) Laisser se sédimenter les grosses particules, prélever le surnageant et ajuster la densité avec de l'eau distillée stérile ou du sérum physiologique stérile pour obtenir une densité semblable à celle de MacFarland n°1.
- e) Diluer la suspension ajustée à 10⁻² et 10⁻⁴ avec de l'eau distillée stérile ou bien du sérum physiologique stérile.
- f) A l'aide d'une pipette Pasteur, placer 3 gouttes d'inoculum dans chaque quadrant. Inoculer 1 boîte avec la dilution la plus forte (10⁻⁴) et l'autre avec la dilution faible (10⁻²).
- g) Inclure pour chaque test une boîte témoin avec la souche *M. tuberculosis* (H37Rv)- contrôle de qualité.
- h) Fermer les boîtes avec du para- film et les placer à l'étuve côté milieu en bas. Incuber à 35°- 37°C.
- i) La lecture et le report des résultats du test de sensibilité se fait qu'après 3 semaines. **Si la culture est à maturation et seulement si on observe une résistance aux antibiotiques alors la lecture pourra se faire avant 3 semaines.** Bien que les colonies soient à maturation sur le milieu sans antibiotique en moins de 3 semaines, les résultats du test ne doivent être relevés qu'à la fin de la 3ème semaine. Les colonies qui apparaissent après la troisième semaine sur les milieux avec antibiotiques ne représentent pas nécessairement des bacilles résistants. Certains médicaments ne sont que bactériostatiques et une incubation prolongée peut les inactiver et ainsi permettre une bonne croissance des colonies après 3 semaines. Ces colonies sont habituellement plus petites que celle du quartier témoin.

- j) Ne pas éliminer la plaque avec le quartier test avec ATB négatif jusqu'à la 5^e ou 6^e semaine. Les colonies sur le quartier contrôle peuvent- être réutilisé.
- k) Examiner tous les quartiers vierges à l'aide d'une loupe ou bien d'un microscope (30X ou 60X) car les mycobactéries résistantes ou celles à croissance lente peuvent être invisibles à l'œil nu.
- l) Noter les caractères des colonies sur le quartier témoin c'est à dire sans ATB. Reporter les résultats obtenus avec les deux dilutions d'inoculum et calculer le pourcentage de résistance. Une manière pratique de noter la croissance est la suivante : - confluent (500 colonies et plus) = 4+ ; - assez confluent (200- 500 colonies) = 3+ ; - (100- 200 colonies) = 2+ ; - (50- 100 colonies) = 1+ ; - moins de 50 colonies = rares. Pour que le test soit valide le quartier contrôle doit avoir une bonne croissance au moins (50- 100 colonies). Dans un test de sensibilité aux ATB correctement effectué un des contrôles au moins doit avoir des colonies assez dispersées pour pouvoir les décompter aisément et calculer avec précision le pourcentage des organismes résistants. La seule fois où le quartier témoin avec croissance confluent est acceptée comme un test valide c'est lorsque la culture est totalement résistante à chaque ATB testé.

2. Préparation de l'inoculum à partir du milieu liquide Tween- Albumine

- a) Transférer une portion de chaque colonie à partir d'un milieu solide sans antibiotique dans un milieu liquide Tween- albumine comme Middlebrook 7H9.
- b) Incuber à 37°C, au plus une semaine, lorsque la turbidité est comparable au standard n°1 sur l'échelle de Mac Farland.
- c) Diluer à 10^{-3} et 10^{-5} avec de l'eau distillée stérile ou du sérum physiologique stérile.
- d) Inoculer les deux dilutions, incuber et pour la suite procéder comme décrit ci-dessus.

3. Préparation du milieu avec disques pour antibiogramme

médicaments	µg de médicament par disque	Concentration µg/ml dans le milieu
Isoniazide	1	0.2
Streptomycine	5 50	1.0 10.0
Rifampin	5	1.0
Ethambutol	25	5.0

Tableau 1 Les disques d'antibiotiques utilisés pour le test de sensibilité au LRVZ

Les disques appropriés sont disposés aseptiquement au centre de chaque quadrant d'une boîte de Petri stérile. Cet acte doit être fait pendant la stérilisation du milieu à l'autoclave ou au moment de son refroidissement à 56°C, mais avant adjonction de l'OADC.

Exactement 5ml de milieu stérile, tempéré à 52°C, complet de 7H10 avec OADC est coulé sur le disque. **Le disque doit être au fond de la boîte et non flotter à la surface du milieu.** Laisser le milieu se solidifier.

Incuber les boîtes une nuit à la température du laboratoire, pour permettre une diffusion uniforme de l'antibiotique.

Les disques avec l'Ethambutol, perdent rapidement leur activité si on les laisse diffuser à la température de la salle, pour éviter cette désactivation, après solidification du milieu, les boîtes sont placées à +4°C, pour laisser diffuser l'antibiotique.

Conservation des milieux avec disque

Les milieux avec les disques sont préparés trois jours avant l'utilisation pour éviter les problèmes liés à la conservation, comme la perte d'activité des antibiotiques ou la déshydratation de la gélose.

Le rapport des résultats du test

Il doit contenir:

- le type de test direct ou indirect
- le nombre de colonies sur le quadrant témoin
- le nombre de colonies sur chaque quadrant avec antibiotique
- la concentration de chaque antibiotique par milieu
- Calcul du pourcentage de bacilles résistants

Nombre de colonies sur le quadrant avec antibiotique

----- x 100 = % de résistance

Nombre de colonies sur le quadrant témoin

Brucellosis and Q-fever seroprevalences of nomadic pastoralists and their livestock in Chad

E. Schelling^{a,*}, C. Diguimbaye^b, S. Daoud^c, J. Nicolet^d,
P. Boerlin^d, M. Tanner^a, J. Zinsstag^a

^a Swiss Tropical Institute, Socinstrasse 57, P.O. Box, CH-4002 Basel, Switzerland

^b Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha, B.P. 433, N'Djaména, Chad

^c Direction de la Planification de la Formation, Programme Elargi de Vaccination,
B.P. 440, N'Djaména, Chad

^d Institute of Veterinary Bacteriology, Länggass-Strasse 122, CH-3012 Bern, Switzerland

Received 4 September 2002; accepted 2 August 2003

Abstract

As a part of a research-and-action partnership between public health and veterinary medicine, the relationships between the seroprevalences of brucellosis and Q-fever in humans and livestock were evaluated in three nomadic communities of Chad (Fulani cattle breeders, and Arab camel and cattle breeders). Nomad camps were visited between April 1999 and April 2000. A total of 860 human and 1637 animal sera were tested for antibodies against *Brucella* spp., and 368 human and 613 animal sera for *Coxiella burnetii*. The same indirect ELISA was used for livestock and human sera, and the test characteristics for its use on human sera were evaluated. Twenty-eight people were seropositive for brucellosis (seroprevalence 3.8%). *Brucella* seroprevalence was higher in cattle (7%) than other livestock, and brucellosis seropositivity was a significant factor for abortion in cattle (OR = 2.8). No correlation was found between human brucellosis serostatus and camp proportions of seropositive animals.

Q-fever-seropositive blood samples were taken from 11 Arab camel and 4 Arab cattle breeders (seroprevalence 1%). Being a camel breeder was associated with Q-fever seropositivity in humans (OR = 9). Camels had the highest Q-fever seroprevalence (80%) among livestock species.

Although there was high-risk human behaviour for the acquisition of brucellosis and Q-fever from livestock through raw-milk consumption (98%) and contact with placentas of livestock (62%), we concluded that seroprevalences in humans were relatively low (likely due to limited active foci in livestock).

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Zoonoses; Pastoralism; Chad; Brucellosis; Q-fever

* Corresponding author. Tel.: +41-61-284-81-11; fax: +41-61-271-79-51.
E-mail address: esther.schelling@unibas.ch (E. Schelling).

1. Introduction

In the Sahelian zone, an estimated 16% of the 35 millions population are mobile pastoralists who depend on their livestock for subsistence (Bonfiglioli and Watson, 1992). About 10% of the total population of Chad are nomads, but studies on morbidity and mortality of nomadic pastoralists are few and out-dated. The highest density of nomadic pastoralists is found in the dry Sahel zone, south of the Sahara. The zoonoses brucellosis and Q-fever might play an important role in the disease burden of these populations, because pastoralists live in close contact with their animals.

“Classical” zoonoses such as bovine tuberculosis, brucellosis, anthrax, and rabies are still widespread in Africa, with mostly unknown human and animal welfare costs (Meslin et al., 2000). Brucellosis is considered by the Food and Agriculture Organization (FAO), the World Health Organization (WHO) and the “Office International des Epizooties” (OIE) as one of the most-widespread zoonoses in the world. Brucellosis in humans (due to *Brucella melitensis* or *B. abortus*) causes an acute febrile disease with undulant fever, which can progress to a more-chronic form; there also can be serious complications affecting the musculo-skeletal, cardiovascular and central nervous systems. Animals are the almost-exclusive source of infection for people. *B. melitensis* shows a host preference for goats and sheep, and *B. abortus* for cattle (Blood and Radotstits, 1989). In sub-Saharan Africa, the highest incidences of brucellosis are found in pastoral production systems. McDermott and Arimi (2002) stated that in sub-Saharan Africa, the epidemiology of brucellosis in humans and livestock (as well as cost-effective prevention measures) are not well understood and available data are limited.

One-fourth of nomadic pastoralists of the Malian Gourma had antibodies against the bacterial agent of brucellosis; of the five pastoralist communities tested, the seroprevalence was lower than 25% only in the group which had lost all its livestock in previous years (Chabasse et al., 1983). Another study compared these results with sedentary cultivators in three other settings in Mali. Seroprevalences ranged from 0 to 4% among cultivators (Tasei et al., 1982). These two studies did not attempt to associate the seroprevalences in animals to these in humans. Gidel et al. (1974) sampled sera from livestock and people in the same villages of different zones and ethnic groups (livestock breeders and crop farmers) in Côte d’Ivoire, Burkina Faso and Niger. However, those authors found no relationship in seropositivity between people and livestock. Antibodies against *Brucella* spp. were found repeatedly in sera of cattle and small ruminants in Chad—with large differences between different regions, authors and time periods as generally seen in sub-Saharan Africa (McDermott and Arimi, 2002). Seroprevalences for cattle ranged from 3 to 30% (Domenech et al., 1982; ME, 2000). For the human population, seroprevalence was 14% for slaughterhouse workers—but 0% in a group of urban blood donors (Massenet et al., 1993). Lefèvre et al. (1970) isolated *Brucella* strains (mainly *B. melitensis*, but also *B. abortus*) from 12 patients suspected of brucellosis in Chad.

The rickettsial disease Q-fever (caused by *Coxiella burnetii*) can be transmitted by ticks to domestic animals. Yet, the transmission pathways from livestock to humans are very similar to those of brucellosis, including the consumption of non-pasteurised dairy products, the contact with diseased animals and carcasses, or with products of livestock births and abortions (infection is acquired most often by the respiratory and conjunctival route through

aerosols or contaminated dust). Antibodies to Q-fever were found in 3.5% of sera collected in N'Djaména, Chad (Maurice and Gidel, 1968). Those authors concluded that coxiellosis may be responsible for a number of undefined cases of fever. During the same study in Chad, positive microagglutination reactions were observed for cattle, sheep, goats and camels. Distinctively higher seroprevalences (35–75%) were found in humans in a study conducted by Giroud et al. (1951) in southern Chad, but the study population had close contact with livestock (breeders, butchers and meat sellers).

We established an intersectoral collaboration between public health and livestock production to evaluate the relationship between the seroprevalences of brucellosis and Q-fever in humans and animals of same nomadic camps, and to identify possible sources of exposure of pastoralists to these two zoonoses.

2. Materials and methods

A research team consisting of veterinarians and physicians collaborated with the Ministry of Health in Chad and the National Veterinary Laboratory of Chad (Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha). Furthermore, in the context of a broader research programme on the health of nomadic people in Chad by the Swiss Tropical Institute, the group collaborated with an anthropologist and a geographer. Quality control of the brucellosis and Q-fever serology was conducted at the Institute of Veterinary Bacteriology of the University of Berne, Switzerland and the Valais Central Laboratory, Sion, Switzerland, respectively.

2.1. Sampling and data collection

The study took place in the Chadian provinces Chari-Baguirmi and Kanem. Nomadic Fulani cattle breeders and Arab camel or cattle breeders were included in the study to consider two different types of livestock breeding. The following multistage selection procedure of nomadic camps was adopted before the actual sampling: based on established contacts by the geographer and his preliminary knowledge of transhumance routes, two Fulani and two Arab representatives of different nomadic sub-groups in the pre-defined study zone were contacted. Each representative was asked to identify 10 concentration zones of nomadic camps (usually defined by the name of the main village in the vicinity). Camp elders (boulamas) were contacted at markets, weddings, and circumcision ceremonies or by following a herd to the camp in five (selected with two dice) out of the 10 zones. In total, approximately 100 boulamas were asked for participation in the study after they were informed about the objectives and the sampling procedure. Half of these boulamas did not want to participate (the main reason given was the blood sampling of the people). Out of the list with boulamas willing to participate, 15 camps per ethnic group were selected with random numbers. In addition, the camp of one important leader per ethnic group needed to be included to ensure acceptance among pastoralists.

Sixteen Fulani and 15 Arab camps were visited during a first sampling in May/June 1999 (hot dry season) with the help of guides with a good knowledge of the approximate geographical distribution of camps. The sample size of 30 camps to visit was feasible.

Twenty-seven of these camps were visited again up to 400 km further north or east during a second sampling in October/November 1999, after the annual rainfalls. During a third sampling in March/April 2000, six Fulani and four Arab camps were visited for a third time. In addition, 12 Fulani and 11 Arab camps were newly included in the study. A unique identification number was allocated for each visited camp, which was retained for all samplings.

In each visited camp, five men (≥ 15 years old), five women (≥ 15 years old) and five children (boys or girls, 1 month to 14 years old) were selected with random-number cross-tables prepared for different group sizes of men, women, and children. The selection of numbers, which were handed out to all individuals at arrival, was made with two dice. The median numbers of tents (representing approximately one family), men, women and children per camp were 7, 7, 10 and 25, respectively, for Fulani; and 8, 10, 10 and 23 for Arabs. After a complete physical examination (recording of, e.g. fever, splenomegaly, hepatomegaly, pale conjunctiva), a pre-tested structured questionnaire including typical signs of brucellosis (such as nature of fever and headache, muscle and joint pain, tiredness) as well as factors either known or thought to influence the transmission from livestock to humans of brucellosis and Q-fever was completed with participants. In addition, reported symptoms and duration of illness were recorded. Venous blood was taken with 5 ml Vacutainer[®] tubes with informed consent of each participant or of young children's mothers. Whole blood was centrifuged with a mobile centrifuge for 10 min at 5000 rpm. Serum was transported on ice in 2 ml tubes to the laboratory. Each tube was labelled with a code including an individual sampling number, and information on age-class, sex, ethnic group, and camp identification. The physician treated sick people in the camps at no charge. People who could not be treated immediately were referred to local dispensaries. Children <5 years old were vaccinated against measles, BCG, and yellow fever during the second and third sampling.

Animals of different owners (usually family members) normally were herded separately during the day—but animals of one camp intermixed during the night (although small-ruminants and camels or cattle have separate rest areas). Animals were sampled early in the morning or before sunset on the camp site. Blood specimens from 10 cattle or 10 camels (*Camelus dromedarius*), as well as from five sheep and five goats—almost exclusively females in lactation for all species—were obtained by venipuncture with 5 or 10 ml Vacutainer[®] tubes. Milk samples from the same females were collected in sterile 10 ml tubes. All tubes were labelled with a code including an individual sampling number, and information on species, and camp identification. A semi-quantitative assessment of tick infestation on animals was done (no ticks, ticks <10, $10 \leq$ ticks < 100, ticks \geq 100 per animal). The breed, age, name, number of births, and number of abortions were registered for each animal on the basis of information from the owner. The veterinarian treated sick animals.

2.2. Serological tests

2.2.1. Brucellosis serology

All human and livestock sera were subjected to the Rose-Bengal plate-agglutination test (RBT); 30 μ l of serum and 30 μ l of antigen (*B. abortus* strain 99, Sanofi Diagnostics

Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) were mixed and rotated on a glass plate for 4 min. Agglutination values were recorded as negative, +, ++, +++ and ++++. Sera with values \geq ++ (all with time-to-reaction <2 min) and <++ were classified as positive and negative, respectively. The RBT is a simple and inexpensive test to detect antibodies against *Brucella* spp. in serum of many species. However, sensitivity and specificity vary in different settings and depending on investigators (Maichomo et al., 1998; Ostanello et al., 1999). Possible non-specific reactions due to cross-reactions (e.g. with *Yersinia* spp.) which can cause false-positive *Brucella* RBT results also must be considered (Chart et al., 1992; OIE, 1996).

A commercially available indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (CHEKIT[®]-Brucellose, Dr. Bommeli AG, Liebefeld-Bern, Switzerland) also was used because it has a better reproducibility of results compared to the RBT, but is technically simpler to perform than the complement-fixation test (CFT). This assay uses microtiter plates with wells precoated with a lipopolysaccharide–phenol extract of the *B. abortus* 99 Weybridge strain and, as conjugate, a monoclonal anti-ruminant-IgG (also reacting with IgG of different animal species, including human). The protocol of the ELISA manufacturer was followed with the exception of a shorter time to reaction of the chromogen (stopped after 5–10 min instead of 25 min) because of higher room temperatures in Chad compared to Switzerland. The optical densities (OD) of all samples were tested in duplicate to obtain the mean OD, and doubtful duplicates were re-assayed. Results were expressed as the percentage of the ratio between the corrected sample OD and positive control OD (S/P-ratio) and was calculated as follows:

$$\frac{S}{P} = \frac{\text{mean OD}_{\text{sample}} - \text{mean OD}_{\text{negative control}}}{\text{mean OD}_{\text{positive control}} - \text{mean OD}_{\text{negative control}}} \times 100\%$$

RBT-positive camel sera from another study from a herd with signs of clinical brucellosis were tested. The ELISA was positive for the seven RBT-positive camel sera and was negative for 37 RBT-negative samples. The S/P-ratio-value \geq 100% (recommended by the manufacturer) was used for classification of brucellosis seropositive livestock sera. The specificity and sensitivity of this test in detecting antibodies against *Brucella* spp. relative to the complement-fixation test are 99.9 and 96.8%, respectively (Behring Diagnostik, 1994). The specificity and sensitivity to detect antibodies against *B. melitensis* are 82 and 93% relative to the CFT, and these test characteristics were used for small-ruminant sera (predominance of *B. melitensis* infections) (Bommeli, 2000).

Two human reference brucellosis sera and two RBT-positive field human sera showed a good correlation ($r^2 = 0.84$) between optical densities (OD) obtained with the monoclonal anti-ruminant-IgG-peroxidase-conjugate and anti-human-IgG-peroxidase-conjugate (Sigma) diluted 1:10,000 at 5, 10, 20, and 30 min of reaction with the ELISA chromogen. Human sera were evaluated further, due to lower affinity to anti-ruminant-conjugate and due to RBT-positive but ELISA-negative results which could not alone be explained by “a too high cutoff value” for the human sera. Twelve RBT-positive human sera (out of a total of 19 RBT-positive) and 26 RBT-negative human sera were selected with computerised random numbers and tested with the CFT following the protocol of the OIE manual (1996). Receiver-operating characteristic (ROC) analyses (reference variable consisting of positive [RBT- or CFT-positive] and negative [RBT- and CFT-negative] samples) were used

to determine an appropriate positive threshold (by intervals of samples). The cutoff should yield a high specificity, but consider a putative low seroprevalence to minimise false classification of human sera. The ROC plot was moderately accurate (AUC = 0.88) (Greiner et al., 2000). The selected cutoff (S/P-ratio value of 75%) also was examined by visual observation of frequency distributions of serum samples. Specificity and sensitivity were 100 and 60%.

All RBT-positive sera were tested with the ELISA using the same protocol as described above, but now with an anti-human-IgM-peroxidase-conjugate (SigmaTM) diluted 1:12,000. The ROC-curve analyses performed as described above indicated an appropriate cutoff at the S/P-ratio value of 30% (AUC = 0.88).

2.2.2. *Q-fever serology*

The indirect ELISA (CHEKIT[®]-Q-fever, Dr. Bommeli AG, Liebefeld-Bern, Switzerland) was used to assay for antibodies against *C. burnetii* in blood sera of livestock and humans (collected during the first sampling) according to the manufacturer's instructions. Results were recorded as positive when S/P-ratio-values were $\geq 40\%$. At this threshold-value (recommended by the manufacturer), a good visual cutoff was seen for all species. Specificity and sensitivity of this test are 100 and 92% relative to the CFT and indirect immunofluorescence test (IFAT) (Thiele et al., personal communication cited in Bommeli, 1997). Thirteen out of 15 Q-fever ELISA-positive results of human sera were also positive with the IFAT using phase-I and phase-II *C. burnetii* antigens (Valais Central Laboratory, Sion, Switzerland).

2.3. *Culture of milk for brucellosis*

A sample of 10 ml of aseptically collected milk was stored at 4 °C overnight. A selective supplement for the isolation of *Brucella* species (OXOIDTM) was added to Columbia agar containing ethyl violet. Supernatant milk cream was spread on the agar and incubated at 37 °C in air supplemented with 10% CO₂ for at least 5 days. Presumptive identification of *Brucella* spp. was based on purple coloration of colonies, colony morphology, Gram stain, and agglutination with monospecific antiserum. Further testing included CO₂ requirement, H₂S production and PCR method to determine genus (Herman and De Ridder, 1992). Definitive *Brucella* spp. identification was done at the German National Veterinary Medical Reference Laboratory for Brucellosis (BGVV, Berlin-Marienfelde).

2.4. *Data analyses*

Blood samples and questionnaire data of same individuals (identified by their name and age) having been examined a second ($n = 47$) or third time ($n = 4$) in a subsequent sampling were withdrawn from analyses to avoid repeated sampling. Among these 51 samples, none was brucellosis seropositive. We used Intercooled STATA 7.0 for Windows (Stata Corporation, Texas, USA) for data analyses. Logistic-regression models with random-effect (RE) on the camp level (xtlogit procedure) were used to estimate apparent seroprevalences (pooled from the three samplings). The apparent seroprevalences were converted to estimated true seroprevalences using the formula developed by Rogan and Gladen (1978) and confidence intervals were calculated using the formula of Abel (1993).

Factors possibly associated with seropositivity in humans were evaluated with logistic-regression models (with RE at the camp level) using backward stepwise selection and a removal level for covariates at $P = 0.10$ based on the likelihood-ratio test (LRT). Separate models were established for brucellosis and Q-fever with the same variables. Variables were sampling number, group (Fulani, Arab camel breeder, Arab cattle breeder), age (categorised as 5–14, 15–44, and ≥ 45), sex, consumption of raw milk, contact with livestock placentas and/or abortion material, performance of obstetric work for livestock (for the last four variables, detailed information on frequency and livestock species was recorded for further analyses). Meaningful interactions (sex and age category, ethnic group and behavioural factors) were tested. The RE logistic-regression procedure also was used to evaluate factors influencing livestock seropositivity within each species (sampling, age, parity, breed (for cattle), and ethnic group of owner). The ordinal data on tick infestation was dichotomised as ticks < 10 and ≥ 10 for use of logistic regression. Seropositivity in livestock species, as well human serologic results and reported symptoms were tested with the chi-square test (or where appropriate, Fisher's exact test was used).

To analyse the interaction between seropositivity in people and in livestock within camps, a generalised linear latent and mixed model (STATA command `gllamm`, Rebe-Hesketh, 2001) was used. This multilevel model allowed for inclusion of the denominator (number of people sampled per camp) in the analysis. The goodness-of-fit of the models (G) was assessed by the difference of the deviance ($-2 \log$ likelihood) of the model with the intercept only and of the final model, and a chi-square test was performed on the appropriate degrees of freedom to determine p -values.

3. Results

3.1. Samples

Blood samples could not be obtained from 80% of young children (< 5 years), 20% of older children (5–14 years), 5% of adults aged 15–45 years and 15% of older adults ≥ 46 years due to difficulties with blood taking or refusal of participants or their mothers. Brucellosis-serology results were available for 860 humans and 1637 animals. A total of 368 human and 613 animal sera were tested for Q-fever. Complete questionnaire data was available from 710 people and for 1142 animals (Table 1).

3.2. Individual and camp seroprevalences of humans and livestock

A total of 28 brucellosis-seropositive human samples resulted in a true seroprevalance of 3.9% (Table 2). One of these sera showed titres for IgG- and IgM-antibodies. Four other sera had high IgM-antibody titres alone—indicating recent sero-conversion (Tizard, 1992). Positive results were more frequent for cattle (seroprevalance of 6.6%) than for camels and small ruminants (0.4 and 0%) (Table 2). Cattle kept by Fulani and Arabs were equally affected (RE logistic-regression model adjusted for sampling, cattle breed and age of cattle, $P = 0.5$). Two strains of *Brucella abortus* biovar 6 were isolated from two cow-milk samples. Brucellosis-seropositive animals were found in 14 out of

Table 1
Overview of the samples used in a survey of brucellosis and Q-fever in nomadic pastoralists and their livestock in Chad (1999–2000)

Age class (years) or species	Brucellosis		Q-fever	
	Serum samples	Questionnaire data ^a	Serum samples	Questionnaire data ^a
Fulani cattle breeders				
Humans				
0–4	18	0	16	0
5–14	64	24	36	32
≥15	399	374	158	155
Livestock				
Cattle	488	465	163	153
Goat	216	176	71	61
Sheep	206	160	78	63
Arab cattle breeders				
Humans				
0–4	0	0	0	0
5–14	9	2	3	2
≥15	72	71	6	6
Livestock				
Cattle	90	76	11	8
Goat	29	16	4	3
Sheep	34	24	5	3
Arab camel breeders				
Humans				
0–4	14	0	10	0
5–14	53	22	33	29
≥15	231	217	106	98
Livestock				
Camel	288	128	142	26
Cattle	30	18	21	19
Goat	129	34	59	3
Sheep	127	45	59	12

^a Humans: age, sex, and risk behaviour. Livestock: age, number of births, and history of abortions.

20 camps with at least one seropositive person and in 3/5 camps with at least two seropositive persons. No significant correlation was found between human brucellosis serostatus and camp proportions of seropositive large animals (cattle and camels) and of small ruminants (generalised linear latent and mixed model, $G = 1.3$; d.f. = 2; $P = 0.5$).

Fifteen Q-fever seropositive blood samples were taken from 11 Arab camel breeders and 4 Arab cattle breeders. The human seroprevalence for Q-fever was 1%. However, two or more Q-fever seropositive camels were found in each camel herd, and individual seroprevalence in camels was 80%. (Table 2). No significant correlation was found between human Q-fever serostatus and camp proportions of seropositive animals (both $P > 0.1$).

Table 2
Individual and camp seroprevalences of brucellosis and Q-fever obtained in a survey in nomadic pastoralists and their livestock in Chad (1999–2000)^a

Zoonosis	Age class (years) or species	Individual			Camp		
		N tested	% Positive		N tested	% Positive	
			Prevalence	95% CI		≥1 positive = cutoff	≥2 positive = cutoff
Brucellosis	Humans	860	4	2, 5	54	37	9
	0–4	32	5	0, 19		Not calculated	
	5–14	126	1	0, 9		Not calculated	
	≥15	702	4	2, 6		Not calculated	
	Camel	288	0.4	0, 2	17	24	0
	Cattle	608	7	4, 9	39	64	28
	Goat	374	0	– ^b	49	4	0
	Sheep	367	0	– ^b	46	4	0
Q-fever	Humans	368	1	0, 2	32	22	12
	0–4	26	4	0, 12		Not calculated	
	5–14	72	2	0, 5		Not calculated	
	≥15	270	2	0.1, 3		Not calculated	
	Camel	142	80	71, 87	14	100	100
	Cattle	195	4	1, 7	19	37	21
	Goat	134	13	7, 19	28	46	11
	Sheep	142	11	5, 16	28	43	14

^a Apparent seroprevalences were calculated with RE on the camp level and then transformed into true seroprevalences.

^b Not applicable due to very low apparent seroprevalences and test characteristics.

3.3. Factors associated with human serostatus of *Brucella* spp. and *C. burnetii*

Factors associated with brucellosis and Q-fever seropositivity are presented in Table 3. There was a (weak) trend ($P = 0.11$) toward an association between male participants and brucellosis seropositivity (male seroprevalence 4.8 versus female seroprevalence 2.5). Being a camel breeder was a significant ($P = 0.03$) risk factor for Q-fever seropositivity in humans.

Virtually all participants (including children under 5 years), consumed raw milk (98%, 95% CI 96–99) and 62% (59–66%) said they had direct contact with placentas of livestock from time to time. No differences in the frequency of raw-milk consumption or the species producing the milk were observed between genders within camel or cattle breeders (data not shown). Most adult camel breeders (87%) consumed small-ruminant milk in addition to camel milk and 10% also consumed cattle milk bought at markets or from neighbouring camps. Sporadic direct contact with placentas was reported for 27% (21/77) of children aged from 5 to 14 years and was as high as 66% for adults. In total, 84% adults did obstetric work, and more men than women reported performing obstetric work on the livestock (RE logistic-regression adjusted for age category and ethnic group, $P < 0.0001$).

Table 3

Results of backward stepwise RE logistic-regression analyses of potential risk factors (explanatory variables) for *Brucella* spp. and *C. burnetii* seropositivity from a survey in nomadic pastoralists and their livestock in Chad (1999–2000)

Explanatory variable	Negative (<i>n</i> = 683)	Positive (<i>n</i> = 27)	OR	95% CI	<i>P</i> (LRX ²)
Brucellosis ^a					
Sex					
Females	307	8	1	–	
Males	376	19	2	0.8, 4.5	0.11
	Negative (<i>n</i> = 310)	Positive (<i>n</i> = 12)			
Q-fever ^b					
Breeding system					
Cattle breeder	192	3	1	–	
Camel breeder	118	9	9	1, 82	0.03
Sex					
Females	147	2	1	–	
Males	163	10	4	0.8, 21	0.07

^a Brucellosis: *G* = 2.5, d.f. = 1, *P* = 0.1.

^b Q-fever: *G* = 8, d.f. = 2, *P* = 0.02.

3.4. Clinical manifestation and zoonotic serostatus in humans and animals

Four out of five participants with brucellosis IgM-antibodies reported an illnesses of >1-year duration. Back pain around the kidneys was reported by three out of five. In comparison, only 70/847 other participants mentioned this symptom (Fisher's exact test *P* = 0.005). Results of physical examination were not different for IgM-seropositive and seronegative participants (all *P* from Fisher's exact test ≥ 0.2).

A total of 19% of brucellosis-seropositive cows had a history of abortion. Brucellosis seropositivity of cattle was significantly correlated to history of abortion (RE logistic-regression adjusted for age and breed, OR = 2.8; 95% CI 1.2–7; *P* = 0.03). Multiple abortions have been reported for 4 out of 10 seropositive cows with history of abortion. In our settings, carpal hygromas were only seen in two cattle herds and animals of these herds did not show higher brucellosis seroprevalences than animals in other camps.

Camels had a higher tick burden than cattle, with 19% of camels with ≥ 10 ticks (mostly in the perianal area) per animal versus 7% of cattle (RE logistic-regression adjusted for sampling, OR = 3.5; 95% CI 1.3–9; *P* = 0.01). The Fulani reported efforts to reduce the tick burden of their cattle using smoke, picking off ticks, or acaricide treatments.

4. Discussion and conclusions

The 3.5% seroprevalence for brucellosis in humans in our study indicates that this infection is endemic at a low level—comparable to other nomadic settings (Roth et al., in press). We did not identify any relationship between human seropositivity and seroprevalences of different livestock species in the same nomadic camps. Milk is a staple food in

nomadic pastoralist societies and is an important source of vitamin A for nomadic pastoralists (Zinsstag et al., 2002). On the other hand, uncooked milk—which was the way virtually all participants of our study consumed it—also is a source of infection with milk-borne zoonoses. Young children might have acquired brucellosis seropositivity through consumption of raw milk ($n = 2$). Furthermore, brucellosis can be acquired as an occupational hazard for nomads performing obstetric work. Men did most of the livestock obstetric work, which might explain why more men were seropositive for brucellosis in this study than in other sub-Saharan populations (Gidel et al., 1974). The source of infection for camel breeders remains unclear. With regard to high-risk behaviour, we concluded that seroprevalences in humans were rather low (likely due to limited active foci in livestock). An unexpected high variability of inter-visit camp-member composition was observed. This dynamic of nomadic camps might partially explain the non-correlated relationship between seroprevalences in humans and in livestock. Only a weak association between clinical symptoms of people and serologic results also was observed by other authors for brucellosis (Lefèvre et al., 1970; Maichomo et al., 1998).

Nomadic pastoralists try to keep contacts between different livestock herds (including sedentary local herds) as low as possible. Nonetheless, animals are sometimes purchased or kept on behalf of “foreign” owners. The cattle herd with the highest mean brucellosis ELISA-values was composed of recently purchased animals (with unknown history of abortion). Our results on cattle seroprevalence (7%) are in accordance with other data obtained in the Sahelian zone of other African countries (Gidel et al., 1974; Akakpo and Bornarel, 1987). In contrast, an earlier sero-study of cattle in sedentary herds of southern Chad found seroprevalences between 20 and 30% (Domenech et al., 1982)—but seropositivity of cattle for brucellosis seems to be generally more prevalent in the more-humid regions south of the Sahel.

We found an association between any history of abortion and seropositivity of cows—an association often described in literature (McDermott and Arimi, 2002). Typical clinical signs of brucellosis in cattle are well known to Fulani nomads, but the Fulani did not associate the disease in cattle with that in humans (Krönke, 2001). Out of 49 Fulani questioned on the symptoms of the livestock illness *bakkale*, 12 mentioned swollen testicles, 20 infertility of cattle, 26 frequent miscarriages, and all 49 swollen knees (hygromas—but not all animals with hygromas are brucellosis sero-reactors; Perreau, 1956).

To our knowledge, the very-high Q-fever seroprevalence of camels (80%) has not been reported in the literature so far. Being a camel breeder was a significant risk factor for human Q-fever seropositivity. Afzal and Sakkir (1994; United Arab Emirates) and Elamin et al. (1992; Sudan) stated that camels are to be considered as an important source of Q-fever. However, Q-fever seroprevalence was as low as 1% in our study. Domenech et al. (1985)—who also observed a good knowledge of breeders on livestock abortions—stated that Q-fever (and chlamydiosis) only played a minor role in abortion compared to brucellosis. As a matter of fact, they found higher seroprevalences of Q-fever among animals with no history of abortion as compared to animals with miscarriages. This finding is in accordance with our study.

In general, the indirect ELISA is considered well suited for serological survey in non-vaccinated populations because laboratory variations are reduced in comparison to other tests (Samartino et al., 1999). It was not the primary aim of this study to assess the test

characteristics of the brucellosis ELISA for use on human sera; however, contradictory results of different serologic tests made further testing necessary to best evaluate the test characteristics. The use of a blocking or competitive ELISA (being species-antibody-independent) or (for the presence of brucellosis-anti-IgM-human sera), the use of a conjugate binding to human-IgG- and IgM-antibodies in the indirect ELISA would have been more appropriate (but was not available).

The sampling procedure allowed us to visit camps during the dry and wet seasons and, thus, season-dependent diseases such as malaria could be recorded. We decided to revisit the same camps at second and third sampling. The described procedure with selection of camps could not be newly established for the second sampling when nomadic groups were very dispersed in remote zones.

The dynamic of the composition of nomadic camps led to the selection of mainly new individuals (>85%) at second and third visit in the same camps. The variable sampling number was not associated significantly with the human serostatus (adjusted for sex, age class and group, $P > 0.1$). The period of seroconversion can basically not be determined by looking at IgG-antibody titres. Therefore, we decided to pool the three samplings after exclusion of second or third blood samples from same individuals. We had five IgM-positive samples, and four out of these were collected during the first sampling in the dry season. More-active brucellosis foci prior to the first sampling than during the following year (leading to increased IgM-titres) cannot be excluded. However, we do not think that this represents a seasonal variation because we should have seen the same trend during the next dry season. As to Q-fever, only sera and data of the first sampling have been evaluated.

In parallel to rearrangement of the composition of the camp-members, the camp's herd composition changed over time. Animals have not been marked, and thus the proportion of animals which have been sampled a second time is unknown. Almost exclusively females in lactation were sampled. At the first visit of a camp, the animal pointed out by the veterinarian sometimes was not captured; if so, a neighbouring animal for which the livestock owner wanted a treatment (most often against trypanosomiasis) was presented—despite the previous explanations that no animal would be treated before the sampling procedure was completed. The names of each camel and cattle were requested to judge whether the information on age, parity and abortion should be recorded. In 80% of the cases, the owner (or a relative who knew the life history of his animals very well) was present. Recall bias and the unawareness of abortions during the first part of gestation must nevertheless be considered. We have no indication that livestock abortions are under-reported due to shame. In contrast, the painful nature of reporting human miscarriages can lead to an under-reporting, and any data relative to this topic have to be interpreted cautiously and were not evaluated any further.

The nomads' working rhythm allowed for examination and interviewing only in the early morning or in the evening before sunset; time per participant for physical examination and completion of the survey questionnaire (always by the same physician) was limited. Therefore, the number of questions on risk behaviour was limited. Complete individual questionnaire data was missing from 17% of participants for whom a blood sample was available. Furthermore, blood was only taken from 20% of children <5 years old. These missing data represent a source of bias (especially, the systemic missing of data on young children); however, the consequences for the final results of the study cannot be predicted easily. For example small children might have been less resistant to zoonotic infections

than adults—but, in contrast, only were exposed to one risk factor (consumption of raw milk) and had less direct contact to potentially infected animal material. Tick-infestation of livestock was not recorded during the first sampling and thus could not be compared to Q-fever serostatus.

Due to their marginalised status, nomads are mostly not considered for health interventions. Our study was directed towards acquisition of knowledge on morbidity of Chadian nomadic pastoralist communities and the development of health-care services adapted to the specific needs of nomadic populations. Three-fourth of the participants had a complaint of respiratory tract disorders, alimentary disorders, or malaria (Daoud, 2001). The impact of the zoonotic diseases tested on the health status of the study populations seemed to be comparatively low. The present study helped to better appraise the relevance of zoonotic seroprevalences in humans and livestock and to start a fruitful intersectoral collaboration between the Chadian public-health and veterinary sectors following the concept of “one medicine” (Schwabe, 1984). Bovine and human tuberculosis (with a special focus on tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* among human patients) currently is being evaluated in the first mycobacteria laboratory in Chad. Joint human and animal vaccination campaigns among nomadic communities have been established, for which public-health agents join the veterinary teams during compulsory cattle vaccination to vaccinate nomadic children and women in remote pastoral areas. Health-information campaigns are grafted upon these vaccination activities, whereby information on the hazards and prevention of zoonotic diseases can be communicated to a larger population.

In conclusion, human seroprevalences of brucellosis and Q-fever were relatively low in nomadic pastoralist communities of the Sahelian zone in Chad, although seroprevalences of brucellosis in cattle was 7% or of Q-fever in camels 80% and most nomads reported high-risk behaviours such as consumption of raw milk or contact with aborted livestock material.

Acknowledgements

This work was supported by the Swiss National Science Foundation as part of the grants NF 3233.52202.97 and the individual project 4 “Health and Well-being” of the National Centre of Competence in Research North-South (“Research Partnerships for Mitigating Syndromes of Global Change”). We thank Dr. Olivier Peter for his help on Q-fever serology and Dr. P. Vounatsou for statistical assistance.

References

- Abel, U., 1993. Die Bewertung Diagnostischer Tests. Hippokrates, Stuttgart, Germany.
- Afzal, M., Sakkir, M., 1994. Survey of antibodies against various infectious disease agents in racing camels in Abu Dhabi, United Arab Emirates. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 13, 787–792.
- Akakpo, A.J., Bornarel, P., 1987. Epidémiologie des brucelloses animales en Afrique tropicale: enquêtes clinique, sérologique et bactériologique. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 6, 981–1027.
- Behring Diagnostik, 1994. Etude de Validation Chekit Brucellosestest Serum. Behring Diagnostics, France, 36 pp.
- Blood, D.C., Radostits, O.M., 1989. *Veterinary Medicine—A Textbook of the Disease of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*. Baillière Tindall, London.

- Bommeli, A.G., 1997. Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen.
- Bommeli, A.G., 2000. Validation Report for the Detection of *Brucella melitensis* Specific Antibodies. Dr. Bommeli AG, 19 pp.
- Bonfiglioli, A.M., Watson, C., 1992. Pastoralists at a Crossroad. UNICEF/UNSO Project for Nomadic Pastoralists in Africa (NOPA), UNICEF, New York.
- Chabasse, D., Roure, C., Rhaly, A.A., Maiga, D., Traore, M., Tounkara, A., Dumon, H., Ranque, P., 1983. Evaluation de l'état sanitaire des populations nomades et semi-nomades du Gourma-Mali—approche épidémiologique. *Med. Trop.* 43, 127–135.
- Chart, H., Okubadejo, O.A., Rowe, B., 1992. The serological relationship between *Escherichia coli* O157 and *Yersinia enterocolitica* O9 using sera from patients with brucellosis. *Epidemiol. Infect.* 108, 77–85.
- Daoud, S., 2001. Etat de santé des pasteurs nomades du Chari-Baguirmi et du Kanem au Tchad. Institut Tropical Suisse, N'Djaména, Chad.
- Domenech, J., Lucet, P., Vallat, B., Stewart, C., Bonnet, J.B., Hentic, A., 1982. La brucellose bovine en Afrique centrale. III. Résultats statistiques des enquêtes menées au Tchad et au Cameroun. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 35, 15–22.
- Domenech, J., Trap, D., Gaumont, R., 1985. Etude de la pathologie de la reproduction chez les bovins en Afrique centrale: enquête sur la chlamydie et la fièvre Q. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 38, 138–143.
- Elamin, E.A., Elias, S., Dauschies, A., Rommel, M., 1992. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pastoral camels (*Camelus dromedarius*) in the Butana plains, mid-Eastern Sudan. *Vet. Parasitol.* 43, 171–175.
- Gidel, R., Albert, J.P., Le Mao, G., Retif, M., 1974. La brucellose en Afrique occidentale et son incidence sur la santé publique. Résultats de dix enquêtes épidémiologiques effectués en Côte d'Ivoire, Haute-Volta et Niger, de 1970 à 1973. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 27, 403–418.
- Giroud, P., le Gac, P., Brizard, H., Laurent, G., 1951. Réactions allergiques à l'antigène *Rickettsia burnetii* chez le personnel Africain assurant le reavitaillement et l'alimentation en viande de l'Oubangui-Chari (A.E.F.). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 44, 165–169.
- Greiner, M., Pfeiffer, D., Smith, R.D., 2000. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.* 45, 23–41.
- Herman, L., De Ridder, H., 1992. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2099–2101.
- Krönke, F., 2001. Perception of ill-health in a FulBe pastoralist community and its implications on health interventions in Chad. Ph.D. Thesis. University of Basel, Switzerland.
- Lefèvre, M., Sirol, J., Maurice, Y., Monteil, J.C., 1970. Contribution à l'étude de la brucellose humaine et animale au Tchad. *Med. Trop.* 30, 477–486.
- Maichomo, M.W., McDermott, J.J., Arimi, S.M., Gathura, P.B., 1998. Assessment of the Rose-Bengal plate test for the diagnosis of human brucellosis in health facilities in Narok district, Kenya. *East Afr. Med. J.* 75, 219–222.
- Massenet, D., Djime, O., Karifene, R., 1993. Enquête séroépidémiologique sur la brucellose. *Med. Trop.* 53, 253–255.
- Maurice, Y., Gidel, R., 1968. Incidence de la fièvre Q en Afrique Centrale. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 61, 721–737.
- McDermott, J.J., Arimi, S.M., 2002. Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. *Vet. Microbiol.* 90, 111–134.
- ME (Ministère de l'Elevage), 2000. Mission de Coopération et d'Action Culturelle, LRVZ, Projet Appui au Secteur de l'Elevage au Tchad oriental, Projet ASETO. Situation de la tuberculose et de la brucellose des bovins en zone périurbaine d'Abéché (préfecture du Ouaddai, Tchad). N'Djaména, Tchad.
- Meslin, F.-X., Stöhr, K., Heymann, D., 2000. Public health implications of emerging zoonoses. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 19, 310–317.
- OIE, 1996. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 3rd ed. Office International des Epizooties, Paris.
- Ostanello, F., Farina, L., Turilli, C., Serra, P., Cagnolati, V., Abdullah, M., Scagliarini, A., Prosperi, S., 1999. Reliability of results of the Rose Bengal test performed for export control in northern Somalia. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 18, 660–666.
- Perreau, P., 1956. La Brucellose Bovine au Tchad. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 3, 247–250.
- Rebe-Hesketh, S., 2001. GLLAMM Manual. Technical Report 2001/01. Department of Biostatistics and Computing, Institute of Psychiatry, King's College, University of London, UK.

- Rogan, W.J., Gladen, B., 1978. Estimating prevalence from the results of a screening test. *Am. J. Epidemiol.* 107, 71–76.
- Roth, F., Zinsstag, J., Orkhan, D., Ochir, C., Cosivi, O., Carrin, G., Pfeiffer, D., Otte, J., Kolar, J., in press. Improvement of human health through interventions in the veterinary sector: economic analysis of mass vaccination of livestock against brucellosis in Mongolia. *Bulletin of WHO*.
- Samartino, L., Gall, D., Gregoret, R., Nielson, K., 1999. Validation of enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Microbiol.* 70, 193–200.
- Schwabe, C., 1984. *Veterinary Medicine and Human Health*. Williams and Wilkins, Baltimore/London.
- Tasei, J.P., Ranque, P., Baliq, H., Traore, A.M., Quilici, M., 1982. La brucellose humaine au Mali. *Acta Trop.* 39, 253–264.
- Tizard, I., 1992. *Veterinary Immunology*. Saunders, Philadelphia, PA.
- Zinsstag, J., Schelling, E., Daoud, S., Schierle, J., Hofmann, P., Diguimbaye, C., Moto, D.D., Ndoutamia, G., Knopf, L., Vounatsou, P., Tanner, M., 2002. Serum retinol of Chadian nomadic pastoralist women in relation to their livestock's milk retinol and β -carotene content. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 72, 221–228.

CURRICULUM VITAE

Nom: Colette DIGUIMBAYE
Date de naissance: 15 Septembre 1960
Nationalité: Tchadienne
Situation familiale: mariée
Adresse: B.P 4041 N'Djaména Tchad/ Tél. 51 73 98

Education:
1966-1971 Etude primaire (N'Djaména)
1971-1979 Etude secondaire (N'Djaména)

Etudes universitaires

1980 Université d'Etat de Moscou «Lomonossov», faculté de Biologie
1985 Obtention du diplôme (MSc) en Biologie, spécialité Microbiologie
2000- 2004 PhD:Titre: «La tuberculose humaine et animale au Tchad: Contribution à la mise en évidence et caractérisation des agents causaux et leur implication en santé publique. (Prof. Dr. G. E. Pfyffer, Prof. Dr. N. Weiss) (sous la supervision Dr. J. Zinsstag)

Activités professionnelles

Décembre 1986 Affectation au Ministère de l'Elevage
Janvier 1988 Affectation au Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha.

Productions scientifiques

BIDJEH, K., IDRIS A. O., **DIGUIMBAYE C.**, GANDA K., MAURICE Y.: Incidence des anticorps peste bovine chez les petits ruminants au Tchad. Bulletin du Centre de Recherche Appliquée, 1989, n°5, p. 31-36

BIDJEH. K., **DIGUIMBAYE C.**, GANDA K.: Variole caprine au Tchad : Etude du pouvoir pathogène du virus chez les ovins et caprins. Rev. , Elev. Méd. Vét. Pays tropicaux, 1990, 43 (1), 33-36.

BIDJEH K., GANDA K., **DIGUIMBAYE C.**, IDRIS A. O.: Notes sur la variole caprine au Tchad: Etude des foyers. Rev. , Elev. , Méd. Vét. Pays tropicaux, 1990, 43(1) 31-33.

BIDJEH K., **DIGUIMBAYE C.**, GANDA K., IMADINE M.: Notes sur les avortements des chèvres dans la région de N'Djaména: Etude des causes ; Revue scientifique du Tchad, 1993, Vol; 3, N°1, p 1-4.

IDRIS A. O, BIDJEH K., GANDA K., **DIGUIMBAYE C.**, MAURICE Y.: Sensibilité des races ovines et caprines tchadiennes au virus de la PPR. In: African small ruminant research and development proceeding, Bamenda (Cameroun), 18-25 January 1989, p. 370- 381.

DIGUIMBAYE C.: Sérosurveillance de la peste bovine au Tchad : Utilisation du test ELISA indirect. In: The sero-monitoring of rinderpest throughout Africa Phase I. IAEA-TECDOC- 623, IAEA, Vienna (1991).

DIGUIMBAYE C.: Campagne de vaccination contre la peste bovine au Tchad. Sérosurveillance de la peste bovine. Rapport d'activité. In: The sero-monitoring of rinderpest throughout Africa. Phase II. Results for 1992, IAEA, (Vienna).

C. DIGUIMBAYE, B. KEBKIBA, P. BORNAREL: La surveillance sérologique des anticorps anti-virus bovipestique chez les bovins du Tchad. In: The sero-monitoring of rinderpest throughout Africa. Phase II. IAEA- TECDOC, IAEA, Vienna (1994).

SCHELLING E., DIGUIMBAYE C., DAOUD S., NICOLET J., BOERLIN B., TANNER M. AND ZINSSTAG J.(2003)- Brucellosis and Q-fever seroprevalences of nomadic pastoralists and their livestock in Chad Prev. Vet. Med. 61: 279-293.

ZINSSTAG J., SCHELLING E., DAOUD S., SCHIERLE J., HOFMANN P., DIGUIMBAYE C., DAUGLA D. M., NDOUTAMIA G., KNOPF L., VOUNATSOU P. and TANNER M. (2002a) Serum retinol of Chadian nomadic pastoralist women in relation to their livestock's milk retinol and beta-carotene content. Journal of Vitamin and Nutrition Research. International Journal of Vitamin and Nutrition Research. 72(4): 221-228.

SCHELLING E., DIGUIMBAYE C., DAOUD S., NICOLET J., ZINSSTAG J. Séroprévalences des maladies zoonotiques chez les pasteurs nomades et leurs animaux dans le Chari-Baguirmi du Tchad. (sous presse).

C. DIGUIMBAYE, E. SCHELLING, G. E. PFYFFER, R. NGANDOLO, G. NDOUTAMIA, M. TANNER, J. ZINSSTAG - Premiers isolements de mycobactéries tuberculeuses chez l'homme et l'animal au Tchad (sous presse).

Durant la préparation de ma thèse, j'ai eu à bénéficier de trois stages au Centre National des Mycobactéries à Zurich.

Octobre – Décembre 2000

Méthodes d'isolements et d'identification biochimique des mycobactéries tuberculeux.

Janvier- Avril 2002

Identification des mycobactéries tuberculeuses au moyen de la biologie moléculaire (ACCUPROBE, SPOLIGOTYPING, RFLP).

Juin- Septembre 2003

Analyse et typage des souches isolées au Tchad par les méthodes de biologie moléculaires (Real-time PCR avec LightCycler et SPOLIGOTYPING).

J'ai eu l'honneur de prendre part aux conférences des professeurs suivants:

Chr. Lengeler, B. Obrist, P. Pluschke, T. Smith, M. Tanner, P. Vounatsou, M. Weiss, N. Weiss, J. Zinsstag.