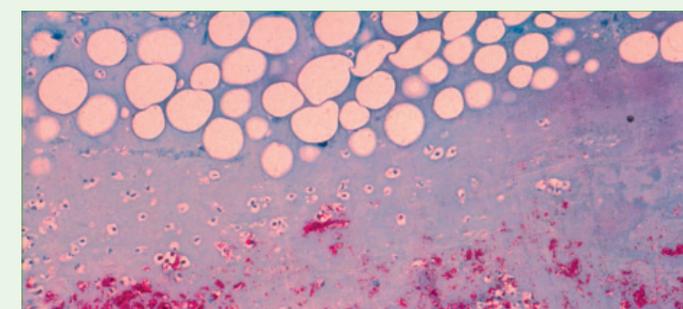


DIAGNOSTIC DE L'ULCÈRE DE BURULI AU LABORATOIRE – UN MANUEL DESTINÉ AU PERSONNEL DE SANTÉ

# DIAGNOSTIC DE L'ULCÈRE DE BURULI AU LABORATOIRE

UN MANUEL DESTINÉ  
AU PERSONNEL  
DE SANTÉ



Édité par : Françoise Portaels

Le présent manuel est un guide spécialisé sur les techniques et les méthodes de laboratoire à utiliser pour le diagnostic de l'ulcère de Buruli, une maladie provoquée par *Mycobacterium ulcerans*. Destiné aux techniciens et aux scientifiques de laboratoire travaillant sur cette maladie, le présent manuel décrit les méthodes exactes à mettre en œuvre pour réaliser un certain nombre de tests diagnostiques. Les procédures recommandées, utilisables dans l'ensemble du système de santé, sont adaptées aux services périphériques, des districts et centraux et ce, conformément aux ressources, compétences et matériel variables que l'on trouve classiquement dans les pays où l'ulcère de Buruli est endémique.

La trentaine de photos en couleur, les tableaux, les diagrammes et les modèles de formulaires de demandes pour les laboratoires renforcent encore l'utilité pratique du manuel. Les divers chapitres donnent des explications quant au recueil et au transport des échantillons cliniques et aux différentes méthodes disponibles pour le diagnostic de l'ulcère de Buruli. Le manuel décrit essentiellement les méthodes de diagnostic et détaille pas à pas les instructions pour réaliser un grand nombre d'analyses en microbiologie et histopathologie. Les changements histopathologiques durant le traitement antibiotique et les réactions paradoxales sont parmi les nouveautés de ce manuel. Le rôle des programmes nationaux, des établissements de santé et des laboratoires (en mettant tout particulièrement l'accent sur l'assurance de la qualité) pour contribuer à la confirmation de l'ulcère de Buruli, sont bien décrits. Le manuel donne également des conseils très complets sur l'interprétation des résultats.



# DIAGNOSTIC DE L'ULCÈRE DE BURULI AU LABORATOIRE

---

UN MANUEL DESTINÉ AU PERSONNEL  
DE SANTÉ

Edité par : Françoise Portaels



**Organisation  
mondiale de la Santé**

Catalogage à la source: Bibliothèque de l'OMS:

Diagnostic de l'ulcère de Buruli au laboratoire : manuel destiné au personnel de santé / édité par Françoise Portaels.

1.Ulcère de Buruli - diagnostic. 2.Ulcère de Buruli – prévention et contrôle. 3.Mycobacterium ulcerans. I.Portaels, Françoise. II.Organisation mondiale de la Santé.

ISBN 978 92 4 250570 2

(classification NLM : WC 302)

### **© Organisation mondiale de la Santé 2014**

Tous droits réservés. Les publications de l'Organisation mondiale de la Santé sont disponibles sur le site Web de l'OMS ([www.who.int](http://www.who.int)) ou peuvent être achetées auprès des Éditions de l'OMS, Organisation mondiale de la Santé, 20 avenue Appia, 1211 Genève 27 (Suisse) (téléphone : +41 22 791 3264 ; télécopie : +41 22 791 4857 ; courriel : [bookorders@who.int](mailto:bookorders@who.int) . Les demandes relatives à la permission de reproduire ou de traduire des publications de l'OMS – que ce soit pour la vente ou une diffusion non commerciale – doivent être envoyées aux Éditions de l'OMS via le site Web de l'OMS à l'adresse [http://www.who.int/about/licensing/copyright\\_form/en/index.html](http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html)

Les appellations employées dans la présente publication et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part de l'Organisation mondiale de la Santé aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites. Les lignes en pointillé sur les cartes représentent des frontières approximatives dont le tracé peut ne pas avoir fait l'objet d'un accord définitif.

La mention de firmes et de produits commerciaux ne signifie pas que ces firmes et ces produits commerciaux sont agréés ou recommandés par l'Organisation mondiale de la Santé, de préférence à d'autres de nature analogue. Sauf erreur ou omission, une majuscule initiale indique qu'il s'agit d'un nom déposé.

L'Organisation mondiale de la Santé a pris toutes les précautions raisonnables pour vérifier les informations contenues dans la présente publication. Toutefois, le matériel publié est diffusé sans aucune garantie, expresse ou implicite. La responsabilité de l'interprétation et de l'utilisation dudit matériel incombe au lecteur. En aucun cas, l'Organisation mondiale de la Santé ne saurait être tenue responsable des préjudices subis du fait de son utilisation.

Imprimé en Italie

WHO/HTM/NTD/IDM/2014.1

# TABLE DES MATIÈRES

---

REMERCIEMENTS	iv
ILLUSTRATIONS ET TABLEUX	vi
ABBRÉVIATIONS	viii
<b>1. INTRODUCTION ET IMPORTANCE DE LA CONFIRMATION EN LABORATOIRE DE L'ULCÈRE DE BURULI</b>	<b>  1</b>
<b>2. RECUEIL DES ÉCHANTILLONS CLINIQUES</b>	<b>  2</b>
2.1 TYPES D'ÉCHANTILLONS CLINIQUES	2
2.1.1 ASPIRATION À L'AIGUILLE FINE	2
2.1.2 ÉCOUVILLONS	2
2.1.3 BIOPSIES (À L'EMPORTE-PIÈCE OU CHIRURGICALES)	3
2.2 RECUEIL DES ÉCHANTILLONS SUR LE TERRAIN	3
2.3 RECUEIL DES ÉCHANTILLONS DANS LES CENTRES DE TRAITEMENT	3
<b>3. CONSERVATION ET TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS CLINIQUES</b>	<b>  4</b>
3.1 EN VUE D'ANALYSES BACTÉRIOLOGIQUES	4
3.2 EN VUE D'UNE RECHERCHE D'ADN PAR AMPLIFICATION GÉNIQUE (PCR)	5
3.3 EN VUE D'ANALYSES HISTOPATHOLOGIQUES	5
<b>4. LES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE CONFIRMATION EN LABORATOIRE ET LEURS LIMITES</b>	<b>  6</b>
4.1 ANALYSES DE LABORATOIRE POUR LE DIAGNOSTIC DE L'ULCÈRE DE BURULI	6
4.2 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS	7
4.3 EXAMEN DIRECT DES FROTTIS	7
4.4 CULTURE <i>IN VITRO</i>	8
4.4.1 DÉCONTAMINATION AVANT MISE EN CULTURE	8
4.4.2 MILIEU DE CULTURE	8
4.4.3 CONDITIONS DE CULTURE ET DURÉES D'INCUBATION	8
4.4.4 IDENTIFICATION DE <i>MYCOBACTERIUM ULCERANS</i>	8
4.5 PCR POUR IS2404	9
4.5.1 MÉTHODES D'EXTRACTION DE L'ADN	9
4.5.2 IDENTIFICATION DE <i>MYCOBACTERIUM ULCERANS</i> PAR LA PCR	10
4.5.2.1 PCR EN GEL	10
4.5.2.2 PCR EN TEMPS RÉEL	10
4.6 IDENTIFICATION D'AUTRES MYCOBACTÉRIES POSITIVES POUR IS2404	11
4.7 MÉTHODES EN HISTOPATHOLOGIE	11
4.7.1 SÉLECTION DU SITE POUR LE PRÉLÈVEMENT DE LA BIOPSIE	11
4.7.1.1 LÉSIONS NON ULCÉRATIVES	12
4.7.1.2 LÉSIONS ULCÉRATIVES	12
4.7.2 FIXATION DES TISSUS	12
4.7.3 PRÉPARATION DES COUPES HISTOPATHOLOGIQUES	12

4.7.4	MODIFICATIONS GROSSIÈRES	12
4.7.5	MODIFICATIONS HISTOPATHOLOGIQUES AVANT LE TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE	13
4.7.5.1	MODIFICATIONS CUTANÉES	13
4.7.5.2	GANGLIONS LYMPHATIQUES	18
4.7.5.3	MODIFICATIONS DE L'OS	19
4.7.5.4	PATIENTS SOUFFRANT D'UNE FORME ÉTENDUE DE LA MALADIE	21
4.7.6	IMMUNOCHIMIE ET ANALYSE DES RÉACTIONS IMMUNITAIRES LOCALES LIÉES À LA CHIMIOTHÉRAPIE	21
4.7.7	RÉACTIONS PARADOXALES	25
5.	ASSURANCE DE LA QUALITÉ	26
6.	RÔLE DES PROGRAMMES NATIONAUX, DES ÉTABLISSEMENTS DE SANTÉ ET DES LABORATOIRES	27
6.1	PROGRAMMES NATIONAUX DE LUTTE CONTRE L'ULCÈRE DE BURULI	27
6.2	ÉTABLISSEMENTS DE SANTÉ	27
6.3	LABORATOIRES	27
6.3.1	LABORATOIRES DE NIVEAU PÉRIPHÉRIQUE	27
6.3.2	LABORATOIRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE	27
6.3.3	LABORATOIRE INTERNATIONAL (SUPRANATIONAL) DE RÉFÉRENCE	28
6.3.4	RÉSEAU MONDIAL DE LABORATOIRES CONFIRMANT LA MALADIE CAUSÉE PAR <i>MYCOBACTERIUM ULCERANS</i> (ULCÈRE DE BURULI)	28
7.	PROPOSITION D'ALGORITHME POUR DIAGNOSTIQUER L'ULCÈRE DE BURULI	30
	RÉFÉRENCES	31
	ANNEXES	35
	ANNEX 1. RECUEIL DES ÉCHANTILLONS CLINIQUES	37
	ANNEX 2. MILIEUX DE TRANSPORT UTILISÉS EN VUE D'ANALYSES BACTÉRIOLOGIQUES	41
	ANNEX 3. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS EN VUE D'ANALYSES BACTÉRIOLOGIQUES	43
	ANNEX 4. EXAMEN DIRECT DES FROTTIS	44
	ANNEX 5. CULTURE <i>IN VITRO</i> DE <i>MYCOBACTERIUM ULCERANS</i>	51
	ANNEX 6. PROTOCOLES DE L'AMPLIFICATION GÉNIQUE (PCR)	62
	ANNEX 7. TECHNIQUES DE COLORATION EN HISTOPATHOLOGIE	76
	ANNEX 8. ASSURANCE DE LA QUALITÉ	94
	ANNEX 9. FORMULAIRES UTILES (UB 01 ET UB 03)	98
	ANNEX 10. GUIDE DES TECHNIQUES DE PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS POUR LA CONFIRMATION EN LABORATOIRE DE L'ULCÈRE DE BURULI (MALADIE CAUSÉE PAR <i>MYCOBACTERIUM ULCERANS</i> )	100

# REMERCIEMENTS

---

Rédigé par :

Professeur Françoise Portaels, Unité de Mycobactériologie, Département des Sciences biomédicales, Institut de Médecine Tropicale, Anvers (Belgique)

Dr Miriam Eddyani, Unité de Mycobactériologie, Département des Sciences biomédicales, Institut de Médecine Tropicale, Anvers (Belgique)

Mme Caroline Lavender, Laboratoire de Référence des Mycobactéries, Laboratoire de Référence de l'État de Victoria pour les Maladies Infectieuses, Victoria (Australie)

Dr Richard Phillips, Département de Médecine, Komfo Anokye Teaching Hospital, Kumasi (Ghana)

Dr Gisela Bretzel, Département des Maladies infectieuses et de Médecine tropicale, Université Ludwig-Maximilian de Munich, Munich (Allemagne)

Dr Marcus Beissner, Département des Maladies infectieuses et de Médecine tropicale, Université Ludwig-Maximilian de Munich, Munich (Allemagne)

Dr Dissou Affolabi, Laboratoire de Référence des Mycobactéries, Cotonou, (Bénin)

Avec la participation de :

Dr Kingsley Asiedu, Département de la Lutte contre les Maladies tropicales négligées, Organisation mondiale de la Santé, Genève (Suisse)

Dr Luc Brun, Université de Parakou, Parakou (Bénin)

Professeur Bouke de Jong, Unité de Mycobactériologie, Département des Sciences biomédicales, Institut de Médecine Tropicale, Anvers (Belgique)

Dr Sara Eyangoh, Laboratoire des Mycobactéries, Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé (Cameroun)

Dr Janet Fyfe, Laboratoire de Référence des Mycobactéries, Laboratoire de Référence de l'État de Victoria pour les Maladies Infectieuses, Victoria (Australie)

Dr Solange Kakou-Ngazon, Microbiologie, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Abidjan (Côte d'Ivoire)

Professeur Anatole Kibadi Kapay, Unité de Chirurgie Plastique, Hôpital Universitaire de Kinshasa, Faculté de Médecine, Université de Kinshasa, Kinshasa (République démocratique du Congo)

Dr Wayne M. Meyers, Institut de Pathologie des Forces Armées, Washington D.C. (Etats-Unis d'Amérique)

Dr Kazue Nakanaga, Centre de Recherche sur la Lèpre, Institut national des Maladies infectieuses, Tokyo (Japon)

Dr Daniel O'Brien, Département des Maladies infectieuses, Hôpital de Geelong, Barwon Health, Geelong (Australie)

Professeur Gerd Pluschke, Parasitologie médicale et Biologie infectieuse, Institut Tropical et de Santé Publique Suisse, Bâle (Suisse)

Dr Jean-Jacques Roux, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Centre Hospitalier de Chambéry, Chambéry (France)

Dr Marie-Therese Ruf, Parasitologie médicale et Biologie infectieuse, Institut Tropical et de Santé Publique Suisse, Bâle (Suisse)

Dr Armand Van Deun, Unité de Mycobactériologie, Département des Sciences biomédicales, Institut de Médecine Tropicale, Anvers (Belgique)

Mr Koen Vandelannoote, Unité de Mycobactériologie, Département des Sciences biomédicales, Institut de Médecine Tropicale, Anvers (Belgique)

Professeur Dorothy Yeboah-Manu, Institut Noguchi pour la recherche médicale, Faculté des Sciences de la Santé, Université du Ghana, Accra (Ghana)

Groupe de travail du réseau de laboratoires de l'OMS sur l'ulcère de Buruli.

Le présent document a été produit avec l'appui d'Anesvad (Espagne) (<http://www.anesvad.org>).

# ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

---

## ILLUSTRATIONS

- Figure 1. Cultures de souches africaines, australiennes et japonaises de *Mycobacterium ulcerans*
- Figure 2. Électrophorèse en gel additionné de bromure d'éthidium sous éclairage UV
- Figure 3. Coupe d'un nodule excisé chirurgicalement, présent dans l'ulcère de Buruli
- Figure 4. Coupe microscopique d'un nodule
- Figure 5. Tissu cutané et sous-cutané provenant d'une lésion non ulcérate très étendue provoquée par *M. ulcerans*, qui couvrait 50 % de la surface abdominale d'un enfant de 9 ans
- Figure 6. Base nécrosée d'un ulcère de Buruli faisant apparaître de nombreux adipocytes fantômes (dans la partie supérieure) et de nombreux bacilles acido-alcoolo résistants (BAAR) (dans la partie inférieure)
- Figure 7. Vascularite sévère dans le tissu sous-cutané d'une lésion de l'ulcère de Buruli
- Figure 8. Adipocytes fantômes et vascularite
- Figure 9. La coloration Ziehl-Neelsen (ZN) d'une coupe parallèle à celle de la Figure 4 met en évidence des BAAR confinés au centre de la lésion
- Figure 10. Tissu sous-cutané provenant des bords d'un ulcère de Buruli : on observe des adipocytes fantômes accompagnés de BAAR dans l'espace interstitiel
- Figure 11. Des amas de BAAR infiltrent la base des bords d'un ulcère de Buruli
- Figure 12. Échantillon de biopsie provenant du bord d'un ulcère de Buruli et montrant le décollement du derme et une nécrose massive de l'épiderme, du derme, de l'hypoderme et de l'aponévrose
- Figure 13. Tissu sous-cutané provenant du bord d'un ulcère de Buruli et montrant la nécrose et l'épaississement d'une cloison interlobulaire
- Figure 14. Guérison d'un ulcère de Buruli à un stade précoce, dans la phase d'organisation : lymphocytes, cellules épithélioïdes et cellules géantes
- Figure 15. Granulome bien formé au cours de la réaction d'hypersensibilité retardée dans un ulcère de Buruli en voie de guérison
- Figure 16. Guérison d'un ulcère de Buruli à un stade avancé, avec des cicatrices sur la plus grande partie de la coupe
- Figure 17. Adénopathie associée à un ulcère de Buruli
- Figure 18. Adénite nécrosante d'un ganglion lymphatique à proximité d'un ulcère de Buruli
- Figure 19. Radiographie de la jambe mettant en évidence la destruction de l'os
- Figure 20. Ostéomyélite du tibia avec nécrose de la moelle et érosion de la travée osseuse
- Figure 21. Ostéomyélite du tibia avec des amas de BAAR dans la moelle nécrosée
- Figure 22. Ostéomyélite du tibia avec nécrose de la moelle et une travée osseuse en voie de dissolution dans la zone des BAAR
- Figure 23. Aperçu schématique des profils d'infiltration cellulaire et de la répartition d'éléments mycobactériens dans des lésions de l'ulcère de Buruli traitées par antibiotiques
- Figure 24. Bandes de leucocytes entourant le centre nécrosé non infiltré d'une lésion de l'ulcère de Buruli.
- Figure 25. Accumulation de lymphocytes B dans des lésions de l'ulcère de Buruli
- Figure 26. Organisation détaillée d'un granulome présent dans une lésion de l'ulcère de Buruli traitée par antibiotiques

Figure 27. Algorithme pour diagnostiquer l'ulcère de Buruli aux niveaux périphérique, national de référence et supranational

Figure 28. Coloration Ziehl-Neelsen d'un frottis d'une lésion d'un ulcère de Buruli

Figure 29. Coloration d'un frottis avec un fluorochrome (auramine O)

Figure 30. PCR en temps réel avec la technologie d'amplification génique TaqMan

Figure 31. Courbes d'amplification pour la PCR quantitative en temps réel

Figure 32. Coupe colorée selon la méthode de Harris à l'hématoxyline-éosine mettant en évidence une panniculite chez un cas d'ulcère de Buruli

Figure 33. Coupe de ganglion lymphatique coloré selon la méthode de Ziehl-Neelsen et provenant d'un cas d'ulcère de Buruli

Figure 34. Coupe histologique d'un kyste phaeomycotique, imprégnée à la méthénamine argentique selon la méthode de Grocott

Figure 35. Coloration de Gram selon Brown-Hopps d'un tissu infecté par *Rhodococcus* spp.

Figure 36. Éléments fongiques dans un ulcère cutané coloré à l'acide periodique-Schiff (PAS) et examiné à fort grossissement

## TABLEAUX

Tableau 1. Avantages et inconvénients des méthodes utilisées pour la confirmation en laboratoire de l'ulcère de Buruli

Tableau 2. Réseau mondial de laboratoires pour la confirmation de la maladie causée par *Mycobacterium ulcerans* (ulcère de Buruli)

## ABRÉVIATIONS

---

<b>AFF</b>	aspiration à l'aiguille fine
<b>BAAR</b>	bacilles acido-alcool résistants
<b>dNTP</b>	désoxynucléotide triphosphate
<b>EDTA</b>	acide éthylènediaminetétraacétique
<b>FAM</b>	colorant fluorescent 6-carboxyfluorescéine
<b>OADC</b>	acide oléique, albumine, dextrose et catalase
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la Santé
<b>PANTA</b>	polymyxine B, amphotéricine B, acide nalidixique, triméthoprime et azlocilline
<b>PCR</b>	amplification génique par réaction en chaîne de la polymérase
<b>TE</b>	tampon chlorhydrate de trisaminométhane [Tris] plus acide éthylènediaminetétraacétique [EDTA]
<b>Tris</b>	trisaminométhane
<b>ZN</b>	Coloration Ziehl-Neelsen



# 1. INTRODUCTION ET IMPORTANCE DE LA CONFIRMATION EN LABORATOIRE DE L'ULCÈRE DE BURULI

---

Pour des personnes expérimentées, le diagnostic clinique de l'ulcère de Buruli est en général simple quand il concerne un patient provenant d'une région connue pour être endémique, qui se présente avec un ulcère non douloureux typique caractérisé par des bords creusés. Toutefois, dans les régions où le personnel soignant ne rencontre pas beaucoup de cas d'ulcère de Buruli, le diagnostic clinique peut être problématique. Par conséquent, le nombre de cas peut être surestimé et il se peut que des maladies autres que l'ulcère de Buruli soient mal prises en charge. En 2012, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a publié un document sur le diagnostic clinique et le traitement de l'ulcère de Buruli (1).

La confirmation microbiologique est essentielle pour plusieurs raisons :

- 1) pour confirmer qu'il s'agit bien de l'ulcère de Buruli ;
- 2) pour déterminer la prévalence et l'incidence précises de l'ulcère de Buruli dans une zone géographique donnée ;
- 3) pour confirmer de nouveaux foyers ;
- 4) pour prendre convenablement en charge la maladie à l'aide d'une thérapie antimycobactérienne avec ou sans chirurgie ;
- 5) pour confirmer l'échec d'un traitement, ou une rechute ou une réinfection après traitement.

Puisque de plus en plus de professionnels de santé ont recours aux médicaments antimycobactériens pour traiter l'ulcère de Buruli, l'usage approprié de ces médicaments et la confirmation du succès ou de l'échec d'un traitement (points 4 et 5) sont appelés à prendre une importance croissante.

Il n'existe pas de test diagnostique extemporané fiable pouvant être fait sur le lieu même des soins. Les chercheurs travaillent pour en mettre un au point. Quatre analyses de laboratoire sont disponibles pour confirmer le diagnostic clinique (Chapitre 4) :

- 1) l'examen direct des frottis à la recherche de bacilles acido-alcoolo résistants (BAAR) ;
- 2) la culture *in vitro* ;
- 3) l'amplification génique (PCR) ciblant la séquence génomique IS2404 ;
- 4) l'examen histopathologique.

Il règne cependant une certaine confusion autour de la notion de confirmation en laboratoire et sur les résultats à rapporter. En 2001, l'OMS recommandait qu'au moins 50 % de la totalité des cas soient confirmés par PCR (2). Certains cliniciens et programmes nationaux déclarent « 50 % de confirmation » lorsqu'ils ont envoyé les échantillons de 50 % de leurs patients au laboratoire pour analyse. Or l'envoi d'un échantillon à un laboratoire en vue d'une confirmation microbiologique ne signifie pas que l'échantillon est positif pour *Mycobacterium ulcerans*. Le terme « cas confirmé » désigne un cas ayant été trouvé positif pour *M. ulcerans* par au moins une analyse de laboratoire. Comme les résultats de l'assurance externe de la qualité révèlent des performances peu satisfaisantes pour certains laboratoires, il est préférable que la positivité soit obtenue pour deux tests de laboratoire au lieu d'un, comme le recommande le manuel de l'OMS de 2001 sur le diagnostic de l'ulcère de Buruli (3).

Lors de la Réunion de l'OMS sur l'ulcère de Buruli, organisée en 2013, une nouvelle recommandation concernant le diagnostic en laboratoire a été émise: Les programmes nationaux de lutte devraient renforcer la confirmation des cas en laboratoire de façon à confirmer par un résultat positif à la PCR au moins 70 % des cas notifiés.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> <http://www.who.int/buruli/archives/en/index.html>

## 2. RECUEIL DES ÉCHANTILLONS CLINIQUES

---

Un guide des techniques de prélèvement d'échantillons pour la confirmation en laboratoire est disponible sur le site Web de l'OMS<sup>1</sup> et figure à l'*Annexe 10*.

Pour le diagnostic, les échantillons doivent être recueillis avant le traitement du patient. Compte tenu de la répartition hétérogène des mycobactéries dans les lésions, il convient de recueillir au moins deux échantillons cliniques de chaque lésion. Le type d'échantillons cliniques à recueillir dépend :

- du lieu où les échantillons sont recueillis (sur le terrain ou dans un centre de traitement) ;
- de la forme clinique de la maladie ;
- des raisons qui ont nécessité une confirmation microbiologique.

Des ressources supplémentaires sont disponibles :

- sur le site Web du consortium Stop Buruli<sup>2</sup> ;
- sur le site Web du BuruliVac<sup>3</sup> ;
- et à l'*Annexe 10*.

### 2.1 TYPES D'ÉCHANTILLONS CLINIQUES

Pour les plaques non ulcérées et les formes œdémateuses de la maladie, il faut demander au patient ou à un proche d'indiquer l'endroit où la lésion est apparue, cet endroit étant celui qui permettra le plus probablement de poser un diagnostic.

#### 2.1.1 ASPIRATION À L'AIGUILLE FINE

L'aspiration à l'aiguille fine (AAF) peut être réalisée sur n'importe quelle lésion non ulcérate, telle que les papules, les nodules, les plaques, les œdèmes, ou les ulcères qui n'ont pas de bords décollés (autrement dit quand la présence de bords cicatriciels pourrait empêcher l'écouvillonnage). Dans le cas de l'AAF, les échantillons doivent être prélevés à l'aide d'aiguilles de petit calibre (par exemple calibre 21, calibre 22 ou calibre 23, de 25 mm de diamètre) fixées à une seringue. La technique d'aspiration optimale est décrite à l'*Annexe 1*. L'utilisation de cette technique garantit l'obtention d'une quantité suffisante de matériel. Dans la majorité des cas, on considère que deux échantillons prélevés par AAF conviennent.

#### 2.1.2 ÉCOUVILLONS

L'écouvillonnage est la technique la plus utile face à des ulcères qui ont des bords creusés (voir l'*Annexe 1* pour les techniques à utiliser lorsque les ulcères ont des bords cicatriciels qui empêchent l'utilisation d'écouvillons). Au moins deux écouvillons doivent être passés sous les bords décollés des ulcères. Le centre de l'ulcère ne doit pas être écouvillonné car *M. ulcerans* n'y est généralement pas présent. La technique à utiliser pour les écouvillons est décrite à l'*Annexe 1*.

---

<sup>1</sup> [http://www.who.int/entity/buruli/Guidance\\_sampling\\_techniques\\_MU\\_infection.pdf](http://www.who.int/entity/buruli/Guidance_sampling_techniques_MU_infection.pdf)

<sup>2</sup> <http://www.stopburuli.org/index.php/FNA-e-tutorial.html>

<sup>3</sup> <http://www.burulivac.eu/index.php?id=17923>

### 2.1.3 BIOPSIES (À L'EMPORTE-PIÈCE OU CHIRURGICALES)

Les biopsies à l'emporte-pièce ne constituent pas les prélèvements de choix bien qu'elles puissent être utilisées dans un nombre limité de circonstances telles que celles indiquées ci-dessous. Les biopsies à l'emporte-pièce (de 3 mm ou 4 mm de diamètre) doivent être prélevées après anesthésie locale ; les biopsies chirurgicales peuvent être prélevées sous anesthésie générale au cours d'une excision chirurgicale. Les biopsies doivent être prélevées au centre des lésions non ulcératives, ou dans le bord nécrosé des ulcères qui bordent le tissu sain (viable). Les biopsies de tissu devront contenir toute l'épaisseur du tissu infecté, y compris le tissu adipeux sous-cutané. Cependant, il se peut que les échantillons provenant des bords des lésions non ulcératives soient ceux qui conviennent le mieux pour l'histopathologie.

Pour la confirmation en routine de l'ulcère de Buruli, les écouvillonnages et l'aspiration à l'aiguille fine suffisent. Les indications pour les biopsies à l'emporte-pièce ou chirurgicales sont les suivantes :

- poser le diagnostic différentiel de l'ulcère de Buruli ;
- chercher la cause d'une réaction paradoxale (voir note ci-dessous et section 4.7.7 pour plus d'informations) ;
- déterminer s'il y a échec thérapeutique malgré une administration réussie d'antibiotiques de qualité avérée ;
- établir l'éventualité d'une évolution cancéreuse ;
- reconformer, dans des essais cliniques, le diagnostic clinique par au moins deux méthodes de laboratoire (voir note ci-dessous), et évaluer le processus pathogène et l'efficacité thérapeutique.

**N.B.** Au sens le plus large, une réaction paradoxale est une réaction à un traitement médical qui est opposée à l'effet normalement attendu.

**N.B.** Si la lésion s'est ulcérée, on préfère l'écouvillonnage plutôt que la biopsie.

## 2.2 RECUEIL DES ÉCHANTILLONS SUR LE TERRAIN

Ce sont les techniques moins invasives (telles que les écouvillons ou l'AAF) qui peuvent être utilisées pour le recueil d'échantillons sur le terrain, afin de permettre le diagnostic décentralisé nécessaire aux études de prévalence ou d'incidence, ou de confirmer de nouveaux foyers. Les biopsies à l'emporte-pièce ou chirurgicales ne doivent pas être prélevées sur le terrain car le geste nécessite des conditions stériles rigoureuses qui peuvent être difficiles à maintenir dans ce contexte.

## 2.3 RECUEIL DES ÉCHANTILLONS DANS LES CENTRES DE TRAITEMENT

Pour la confirmation en routine d'un cas suspect d'ulcère de Buruli, les échantillons prélevés par écouvillon doivent être obtenus sous les bords décollés des ulcères; les échantillons prélevés par AAF doivent être recueillis sur les papules, les nodules, les plaques, les œdèmes et les ulcères non creusés.

Les échantillons prélevés par écouvillon ou AAF suffisent pour poser un diagnostic en laboratoire dans la plupart des cas. Le recours aux biopsies à l'emporte-pièce doit être réservé aux situations exceptionnelles telles qu'indiquées dans la section 2.1.3. Si les patients nécessitent un traitement chirurgical, les échantillons chirurgicaux seront éventuellement transmis au laboratoire pour analyse (voir également les indications pour les biopsies chirurgicales dans la section 2.1.3).

Si la radiographie met en évidence la présence d'une ostéomyélite ou si une ostéomyélite est découverte à l'occasion d'une intervention chirurgicale, des échantillons d'os doivent être recueillis pour confirmer l'implication de *M. ulcerans*.

### 3. CONSERVATION ET TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS CLINIQUES

---

Avant d'être amenés au laboratoire, les échantillons doivent être étiquetés avec les informations appropriées (par exemple, le nom du patient, la date d'obtention de l'échantillon, ou le code de l'échantillon), selon les pratiques habituelles. Pour écrire sur les étiquettes, il faut utiliser un marqueur indélébile. De plus, tous les formulaires (par exemple, les fiches de données normalisées de l'OMS et les autres fiches propres à chaque projet) doivent être correctement remplis et transmis au laboratoire en même temps que l'échantillon.

Plusieurs méthodes de recueil, de transport et de traitement des échantillons ont été utilisées dans des contextes différents ; par exemple, les échantillons peuvent être fractionnés en sous-échantillons qui subissent des tests de laboratoire différents, ou on peut recueillir pour chaque test des échantillons distincts. Diverses approches pour la conservation et le transport des échantillons ont été validées dans des conditions de terrain ; par exemple, dans certains cas, différents types de tubes stériles, de milieux de transport ou de sacs de prélèvement d'échantillons ont été utilisés.

En règle générale, lorsqu'il est possible d'effectuer les analyses microbiologiques dans les 24 heures, il faut garder les échantillons cliniques à 4 °C jusqu'à l'analyse. Lorsqu'il n'est pas possible de procéder aux analyses microbiologiques dans les 24 heures ou lorsqu'on ne dispose pas de réfrigérateurs, il faut utiliser un milieu de transport approprié pour l'échantillon. Il est important de noter, toutefois, que certains milieux de transport conviennent aux analyses microbiologiques et moléculaires (telles que la PCR) (voir l'*Annexe 2* pour les milieux de transport appropriés), mais que les milieux utilisés seulement pour l'analyse PCR (tampon trisaminométhane [Tris] plus acide éthylènediaminetétraacétique [EDTA], ou une solution d'alcool et d'eau distillée) ne conviennent pas à la mise en culture.

#### 3.1 EN VUE D'ANALYSES BACTÉRIOLOGIQUES

S'il est possible de traiter dans les 24 heures les échantillons destinés à la mise en culture, on peut alors les placer sans additifs dans un récipient stérile et les conserver à 4 °C. Si l'on ne dispose pas de réfrigérateurs ou si le transport jusqu'au laboratoire doit prendre plusieurs jours, les milieux de transport sont alors essentiels parce qu'ils protègent la viabilité des mycobactéries.

On recommande de transporter les échantillons prélevés par AAF dans un milieu de transport liquide contenant un bouillon de base de Dubos additionné d'acide oléique, d'albumine, de dextrose et de catalase (OADC, Becton Dickinson) et de polymyxine B, d'amphotéricine B, d'acide nalidixique, de triméthoprime et d'azlocilline (PANTA, Becton Dickinson).

Les écouvillons et/ou les fragments tissulaires prélevés par biopsies à l'emporte-pièce ou chirurgicales (fragments de tissu cutané ou d'os récoltés lors d'excisions chirurgicales) doivent être transportés dans un milieu de transport liquide additionné de gélose à 0,5 % ; cet ajout permet d'obtenir un milieu de transport semi-solide (4,5).

Tous les types d'échantillons recueillis pour le diagnostic de l'ulcère de Buruli ont été transportés avec succès dans un bouillon de base de Dubos avec de l'albumine pour bouillon de Dubos additionnée de PANTA ou un bouillon de Dubos avec 10 % d'OADC et du PANTA (4–8).

Les échantillons placés dans les milieux de transport doivent être conservés à 4 °C, mais ils peuvent être envoyés à température ambiante à des laboratoires nationaux ou internationaux de référence en vue d'une confirmation microbiologique. Les milieux de transport sont décrits en détail à l'*Annexe 2*.

### 3.2 EN VUE D'UNE RECHERCHE D'ADN PAR AMPLIFICATION GÉNIQUE (PCR)

Tous les milieux de transport bactériologiques décrits dans la section 3.1 permettent l'analyse des échantillons (ou des sous-échantillons) par PCR (4,5,8).

Les échantillons qui seront utilisés uniquement pour la PCR peuvent également être placés dans une solution d'alcool et d'eau distillée (en proportions 1:1), dans du tampon phosphate, ou dans du tampon TE (Tris chlorhydrate plus EDTA).

**N.B.** L'alcool peut perturber certains protocoles d'extraction d'ADN, tels que la trousse d'extraction d'ADN Genra Puregene DNA Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne), que l'on décrit à l'*Annexe 6*.

Une solution de lyse cellulaire commercialisée par Qiagen permet de conserver les échantillons à tester par PCR pendant plusieurs mois à température ambiante et également de les transporter à température ambiante (6,7,9,10). Il est aussi possible de transporter les échantillons dans l'azote liquide (11).

### 3.3 EN VUE D'ANALYSES HISTOPATHOLOGIQUES

Les biopsies destinées à l'analyse histopathologique doivent être placées dans du formol à 10 % (7,11,12). On fixe de préférence le tissu dans une solution à 10% de formol neutre tamponné (pH 7,4) (voir section 4.6.2).

## 4. LES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE CONFIRMATION EN LABORATOIRE ET LEURS LIMITES

---

### 4.1 ANALYSES DE LABORATOIRE POUR LE DIAGNOSTIC DE L'ULCÈRE DE BURULI

Quatre analyses de laboratoire sont disponibles pour confirmer le diagnostic clinique de l'ulcère de Buruli :

- 1) l'examen direct des frottis pour la recherche de BAAR ;
- 2) la culture in vitro ;
- 3) l'amplification génique (PCR) ciblant la séquence génomique IS2404 ;
- 4) l'examen histopathologique.

Ces analyses présentent chacune des avantages et des inconvénients, et la méthode utilisée dépendra du type d'échantillon recueilli, de la finalité de l'analyse (à savoir, poser un diagnostic ou surveiller le résultat d'un traitement) et du lieu où l'analyse est réalisée (par exemple, dans un laboratoire périphérique ou dans un laboratoire de référence) (*Tableau 1*).

L'examen direct des frottis destiné à mettre les BAAR en évidence est disponible dans la plupart des zones d'endémie en tant que test de diagnostic de première intention. L'OMS recommande actuellement qu'au moins 70 % des cas cliniques suspects d'ulcère de Buruli soient confirmés par un test positif par PCR. Un réseau de laboratoires effectuant la PCR a été mis en place dans les pays d'endémie (une liste de ces laboratoires est donnée dans la section 6.3.4). Toutefois, seuls quelques rares laboratoires de district sont en mesure de pratiquer la PCR, si bien que celle-ci se limite généralement aux laboratoires de référence spécialisés, bien équipés. L'accès à la culture et à l'histopathologie ne s'est pas encore généralisé dans les régions où l'ulcère de Buruli est endémique.

Le taux de positivité des différents tests dépend de la qualité des échantillons, et peut varier en fonction du type d'échantillon et de la forme clinique de la maladie. Pour la microscopie et la culture, des taux de positivité allant de 30 % à 60 % ont été rapportés [5–7,9,13–17]. Parmi les vrais cas d'ulcère de Buruli (c'est-à-dire, ceux confirmés par au moins deux analyses de laboratoire positives), l'examen direct des frottis et la culture donnent des résultats moins souvent positifs lorsque l'analyse est faite sur des nodules (60 % de positivité) que lorsque les échantillons sont recueillis sur des formes œdémateuses (80 % de positivité). *M. ulcerans* est particulièrement difficile à cultiver à partir de l'os (20 % de positivité) [18]. Des études menées dans différents pays d'Afrique font état de taux de positivité pour la PCR compris entre 70 % et plus de 90 % [9,16,17,19–22], et une sensibilité allant de 85 % à 89 % [5,6,23,24]. La sensibilité de l'histopathologie est d'environ 90 % [6,7,10,12].

Pour éviter toute erreur de diagnostic due à des résultats faux-positifs ou faux-négatifs, on recommande d'obtenir un résultat positif pour deux analyses différentes avant d'établir un diagnostic définitif.

Une autre méthode de diagnostic en laboratoire est basée sur une nouvelle méthode d'amplification de l'ADN appelée amplification isothermique médiée par boucle (ou LAMP pour *loop mediated isothermal amplification*) [25–27]. Bien que cette technique ne soit pas utilisée actuellement pour le dépistage de routine, elle pourrait bien devenir un moyen rapide, simple et peu coûteux de dépister *M. ulcerans*, qui pourrait être mis en œuvre au niveau local quand l'accès à un laboratoire bien équipé n'est pas possible.

TABLEAU 1. AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DES MÉTHODES UTILISÉES POUR LA CONFIRMATION EN LABORATOIRE DE L'ULCÈRE DE BURULI<sup>a</sup>

Méthode	Avantages	Inconvénients
Examen direct de frottis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peut être effectué sur des échantillons prélevés par écouvillon, AAF ou biopsie</li> <li>• Facile à exécuter au niveau local</li> <li>• Pas besoin de matériel ni d'équipement coûteux</li> <li>• Résultats obtenus rapidement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Faible sensibilité (&lt; 60 %)</li> <li>• Nécessite un personnel qualifié</li> <li>• Ne fait pas la distinction entre organismes viables et non viables</li> <li>• Nécessite un contrôle rigoureux de la qualité</li> </ul>
Culture in vitro de <i>Mycobacterium ulcerans</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peut être effectué sur des échantillons prélevés par écouvillon, AAF ou biopsie</li> <li>• Seule méthode qui peut faire la distinction entre organismes viables et non viables.</li> <li>• Méthode utilisable pour surveiller la réaction des patients au traitement antimycobactérien</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nécessite un laboratoire bien équipé</li> <li>• Nécessite un personnel qualifié</li> <li>• Long délai d'obtention des résultats (au moins 6-12 semaines)</li> <li>• Faible sensibilité (20-60 %)</li> <li>• Pas utile pour la prise en charge immédiate des patients</li> <li>• Nécessite un contrôle rigoureux de la qualité</li> </ul>
Amplification génique (PCR) pour IS2404	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peut être effectué sur des échantillons prélevés par écouvillon, AAF ou biopsie (fraîche ou incluse dans la paraffine)</li> <li>• Résultats obtenus rapidement</li> <li>• Sensibilité et spécificité élevées (&gt; 90 %)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nécessite un laboratoire bien équipé</li> <li>• Exécution coûteuse</li> <li>• Nécessite un personnel hautement qualifié</li> <li>• Nécessite un contrôle rigoureux de la qualité</li> <li>• Ne fait pas la distinction entre organismes viables et non viables</li> </ul>
Histopathologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Résultats obtenus assez rapidement</li> <li>• Grande sensibilité (environ 90 %)</li> <li>• Utile pour poser un diagnostic différentiel et surveiller les réactions au traitement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nécessite un laboratoire bien équipé</li> <li>• Exécution coûteuse</li> <li>• Nécessite un personnel hautement qualifié</li> <li>• Nécessite une procédure invasive (biopsie)</li> </ul>

AAF, aspiration à l'aiguille fine PCR, amplification génique par réaction en chaîne de la polymérase.

<sup>a</sup> Adapté à partir de : Guide des techniques de prélèvement d'échantillons pour la confirmation en laboratoire de l'ulcère de Buruli (infection à *Mycobacterium ulcerans*). Genève, Organisation mondiale de la Santé, 2004. [http://www.who.int/buruli/Guidance\\_sampling\\_techniques\\_MU\\_infection\\_fr.pdf](http://www.who.int/buruli/Guidance_sampling_techniques_MU_infection_fr.pdf); consulté en février 2014)

## 4.2 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Si des échantillons distincts ont été recueillis pour chaque test, on traite chaque échantillon de la manière décrite dans les annexes. Si le même échantillon doit être utilisé pour un certain nombre de tests différents, on doit fractionner l'échantillon initial en sous-échantillons de la manière décrite à l'Annexe 3. Des portions aliquotes de la suspension (sous-échantillons) sont alors préparées pour chaque test.

## 4.3 EXAMEN DIRECT DES FROTTIS

On connaît plusieurs techniques de coloration des mycobactéries : Ziehl–Neelsen, Kinyoun et l'auramine O. En général, la méthode utilisée localement pour le diagnostic en laboratoire de la tuberculose peut également être utilisée pour diagnostiquer l'ulcère de Buruli. Dans la plupart des cas, il s'agira de la méthode de Ziehl–Neelsen (Annexe 4). Le résultat de la lecture des frottis se fera en utilisant la même méthode que celle employée localement pour l'examen des frottis de crachats servant au diagnostic de la tuberculose.

## 4.4 CULTURE *IN VITRO*

### 4.4.1 DÉCONTAMINATION AVANT MISE EN CULTURE

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

On a utilisé plusieurs méthodes pour décontaminer les échantillons avant leur mise en culture. En général, lorsque les méthodes de décontamination sont trop drastiques, elles réduisent la possibilité d'obtenir une culture positive pour *M. ulcerans*. La méthode de décontamination choisie dépend du milieu de culture utilisé. Le milieu le plus largement utilisé est le milieu de Löwenstein–Jensen. Chacune des méthodes décrites à l'Annexe 5 peut être utilisée avec le milieu de Löwenstein–Jensen. Toutefois, la méthode à l'acide oxalique est la méthode de choix car elle donne de faibles taux de contamination et un nombre plus élevé de cultures positives (8).

Un taux de contamination global de l'ordre de 2-5 % est acceptable pour la culture *in vitro* des mycobactéries à partir d'échantillons non stériles. Le choix de la méthode de décontamination revient donc au microbiologiste et dépendra non seulement de la nature des échantillons mais aussi de leur degré de contamination au laboratoire (4,8,28).

### 4.4.2 MILIEU DE CULTURE

Le milieu de Löwenstein–Jensen additionné de 0,75 % de glycérol est le milieu le plus universellement utilisé (4,8,29), mais un certain nombre de milieux de culture solides et liquides ont été utilisés pour isoler *M. ulcerans* (par exemple, le milieu d'Ogawa, le système BACTEC [Becton Dickinson], le milieu de Middlebrook 7H12B, le milieu de Middlebrook 7H11, et le tube avec indicateur de croissance mycobactérienne BBL [également connu sous le nom de MGIT, Becton Dickinson]). En Australie, on a constaté que *M. ulcerans* se développait mieux sur du milieu de Brown et Buckle, qui permet la croissance de la plupart des mycobactéries et diffère du Löwenstein–Jensen en ce qu'il contient des jaunes d'œufs et de la gélose au lieu d'œufs entiers, et donc n'a pas besoin d'être coagulé. Les compositions précises du milieu de Löwenstein–Jensen, du milieu de Brown et Buckle et du milieu d'Ogawa sont présentées à l'Annexe 5.

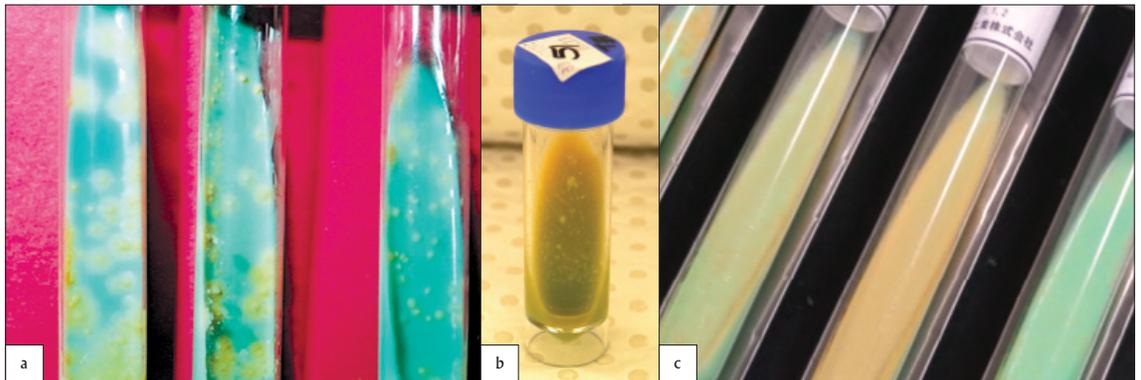
### 4.4.3 CONDITIONS DE CULTURE ET DURÉES D'INCUBATION

*M. ulcerans* se développe dans les mêmes conditions que *M. tuberculosis* sauf pour la température, qui doit se situer entre 29 et 33 °C. Les cultures primaires deviennent en général positives après 6 à 12 semaines d'incubation (selon la charge bactérienne de l'inoculum), mais il arrive que certains échantillons nécessitent une incubation beaucoup plus longue, jusqu'à 9-12 mois parfois (4). On choisira la durée d'incubation en fonction des objectifs de l'investigation (prise en charge du patient à court terme, ou recherche à plus long terme).

Les colonies évoquant *M. ulcerans* apparaissent jaunâtres, rugueuses et à bords bien démarqués. Les souches africaines et japonaises sont plus jaunâtres que les australiennes (Figure 1), dont la pigmentation est parfois très légère. Il convient de sélectionner une colonie isolée et typique pour la repiquer sur un milieu de Löwenstein–Jensen, Brown et Buckle ou Ogawa.

### 4.4.4 IDENTIFICATION DE *MYCOBACTERIUM ULCERANS*

*M. ulcerans* appartient au groupe des mycobactéries à croissance lente. Les repiquages sont généralement positifs après 3 à 4 semaines d'incubation à 29-33 °C, selon le nombre de bacilles dans l'inoculum.

FIGURE 1. CULTURES DE SOUCHES AFRICAINES, AUSTRALIENNES ET JAPONAISES DE *MYCOBACTERIUM ULGERANS*

Les souches africaines (a) et japonaises (c) sont plus jaunâtres que les australiennes (b). (Avec l'aimable autorisation de Françoise Portaels, Kazuo Nakanaga et Janet Fyfe)

À l'heure actuelle, l'identification de *M. ulcerans* se fait par PCR. Les modes opératoires sont décrits à l'Annexe 5 (section 5.4).

#### 4.5 PCR POUR IS2404

La séquence cible la plus courante pour la confirmation par PCR de l'ulcère de Buruli est la séquence d'insertion IS2404 (longue de 1274 pb), présente à raison de plus de 200 copies dans le génome de *M. ulcerans*. Plusieurs méthodes d'extraction et d'amplification de l'ADN de *M. ulcerans* ont été publiées [30,31]. La sensibilité de la PCR est élevée, mais cette technique reste relativement onéreuse. Les laboratoires qui manquent d'expérience dans cette technique peuvent être confrontés à des résultats faux-positifs et faux-négatifs, ce qui implique de mettre en place des mesures de contrôle de la qualité très strictes.

##### 4.5.1 MÉTHODES D'EXTRACTION DE L'ADN

D'une manière générale, l'extraction d'ADN peut être réalisée sur les échantillons spécialement recueillis pour la confirmation par PCR, de même que sur les échantillons ou des sous-échantillons qui doivent être analysés à l'aide d'autres méthodes bactériologiques. Toutefois, on recommande fortement de réaliser l'extraction sur des échantillons n'ayant pas subi de procédures de décontamination [30].

Les procédures d'extraction comportent généralement une lyse physique (par exemple, une homogénéisation mécanique, un traitement aux ultrasons ou un traitement thermique) ou une lyse chimique (par exemple, une digestion par la protéinase K), ou les deux, en association avec des procédures ultérieures de précipitation et de purification (par exemple, au moyen de phénol et de chloroforme) pour libérer l'ADN des cellules de *M. ulcerans*. Les méthodes d'extraction de l'ADN font intervenir des techniques aussi bien manuelles qu'automatisées. Le volume final d'ADN extrait dépend de la méthode utilisée [6,9,10,15,16,19,21,22,24,30–32].

L'Annexe 6 décrit un certain nombre de méthodes d'extraction couramment utilisées.

À cause du grand nombre de germes présents dans certains échantillons cliniques et dans les cultures, il faut travailler avec un soin extrême lorsqu'on extrait l'ADN des échantillons (par exemple, en vue d'une identification ou d'un génotypage), afin d'éviter la contamination de la zone de travail, qui pourrait entraîner une contamination croisée des échantillons cliniques. Dans la mesure du possible, il faudra effectuer l'extraction de l'ADN des cultures dans une zone séparée du laboratoire, à l'aide de réactifs et de matériels réservés à cet usage (par exemple, sous un poste de sécurité biologique distinct, et en utilisant des pipettes et une centrifugeuse distinctes).

#### 4.5.2 IDENTIFICATION DE *MYCOBACTERIUM ULCERANS* PAR LA PCR

La PCR permet d'identifier *M. ulcerans* à partir de l'ADN extrait directement des échantillons cliniques (recueillis par écouvillonnage, AAF, ou biopsies à l'emporte-pièce ou chirurgicales) (voir section 2.2) ou des colonies sur milieux de culture. La PCR a pour principal avantage de permettre au laboratoire un diagnostic définitif de l'infection à *M. ulcerans* dans un délai de quelques jours à 2 semaines après la réception d'un échantillon clinique. Les méthodes de PCR les plus fréquemment utilisées sont la PCR en gel traditionnelle en une étape et la PCR en temps réel ciblant l'élément d'insertion IS2404.

##### 4.5.2.1 PCR en gel

Les amorces et le protocole de PCR décrits dans l'édition précédente de ce manuel (3) et à l'Annexe 6 de la présente édition sont différents de ceux initialement décrits par Ross et ses collègues (33) et par Stinear et ses collègues (34) : ils amplifient une région de 515 pb de IS2404.

Plusieurs autres protocoles de PCR en gel ciblant IS2404 ont été publiés. Guimaraes-Peres et ses collègues ont mis au point une technique de PCR nichée qui utilise les amorces MUI et MU2 pour le premier cycle d'amplification d'un fragment de 568 pb de IS2404 ; les amorces PGP3 et PGP4 ont été utilisées pour le deuxième cycle d'amplification d'un produit de 217 pb (19). Phillips et ses collègues ont décrit un protocole de PCR modifié, conçu pour réduire le risque de contamination des amplicons dans le mélange de PCR ; ce protocole utilise les amorces PU4F et PU7Rbio pour amplifier un fragment de 154 pb de IS2404 (21).

Pour résoudre les difficultés techniques liées à l'utilisation de procédures de diagnostic par PCR dans les pays tropicaux, une PCR faisant appel à des réactifs secs a été mise au point ; cette procédure amplifie une séquence de 492 pb dans IS2404 et utilise des réactifs lyophilisés et les amorces lyophilisées MU5 et MU6, qui sont stables à température ambiante (10).

Après avoir été amplifiés dans un thermocycleur, les produits de la PCR sont détectés sous éclairage UV (transilluminateur) après une électrophorèse sur des gels d'agarose colorés, par exemple, au bromure d'éthidium ou GelRed (Biotium). Pour éviter la contamination, qui peut conduire à des résultats faussement positifs, il faut faire attention à effectuer la préparation de l'échantillon, l'extraction d'ADN, la préparation du mélange réactif de PCR, l'amplification PCR, et l'électrophorèse dans des zones séparées du laboratoire. Il est conseillé d'intégrer dans chaque analyse PCR des témoins d'extraction, plusieurs témoins négatifs, des témoins d'inhibition et des témoins positifs, comme détaillé à l'Annexe 8.

Avec l'expérience, un agent de laboratoire peut se fier à la comparaison visuelle entre la position du produit de PCR issu de l'échantillon testé et celle du témoin positif sur le gel pour déterminer le résultat. Si les deux produits de la PCR (le témoin positif et l'échantillon testé) s'alignent précisément et si les témoins négatifs sont négatifs, on peut conclure à la présence de *M. ulcerans* dans l'échantillon inconnu testé. Toutefois, un système d'assurance de la qualité doit être en place et, si possible, les résultats de la PCR devront être comparés à ceux de l'examen direct des frottis et de la culture, pour s'assurer de leur exactitude.

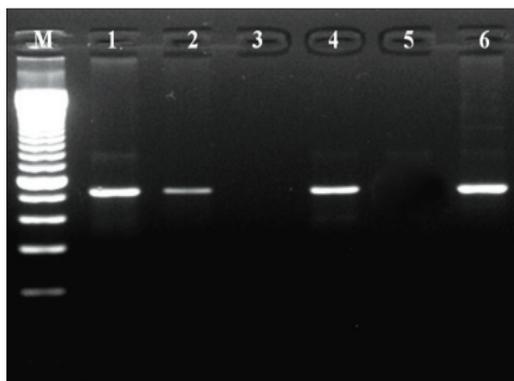
La Figure 2 illustre des résultats d'échantillons testés par PCR.

L'Annexe 6 décrit une PCR en gel traditionnelle en une étape (avec les amorces MUInew et MU2new), l'analyse PCR à base de réactifs secs et l'analyse PCR en temps réel.

##### 4.5.2.2 PCR en temps réel

La PCR en temps réel, également appelée PCR en temps réel quantitative (ou qPCR), présente plusieurs avantages par rapport à la PCR en gel traditionnelle : elle est plus spécifique (donne moins de résultats faux-positifs) et plus sensible (donne moins de résultats faux-négatifs) et son délai d'exécution est

FIGURE 2. ÉLECTROPHORÈSE EN GEL ADDITIONNÉ DE BROMURE D'ÉTHIDIUM SOUS ÉCLAIRAGE UV



M = marqueur de 100 Kb, bandes 1, 2 et 4 = Écouvillons de patients ayant une maladie due à *M. ulcerans* ; bande 3 = Écouvillon d'un patient ayant un ulcère chronique (qui n'est pas dû à *M. ulcerans*), bande 5 = Témoin négatif et bande 6 = témoin positif. (Avec l'aimable autorisation de Dorothy Yeboah-Manu)

plus rapide ; elle nécessite moins de main-d'œuvre ; elle permet de quantifier l'ADN présent dans l'échantillon ; et elle présente un risque moins élevé de contaminations croisées du fait du format en tube fermé, qui évite la manipulation post-PCR d'échantillons contenant des nombres élevés d'amplicons.

Différents types de PCR en temps réel ciblant la séquence d'insertion IS2404 ont été décrits. Le test mis au point par Fyfe et coll. s'est avéré rapide et fiable, mais aussi très sensible et spécifique [32]. Une PCR en temps réel modifiée, faisant appel à des réactifs moins coûteux, a été décrite par Beissner et coll. [35]. La limite de détection de cette technique est au moins 100 fois plus basse que celle de la PCR traditionnelle. De plus, puisque le test est multiplexé avec un témoin positif interne, il permet de détecter les inhibiteurs de la PCR éventuellement présents dans les échantillons cliniques. Du fait de la baisse de prix des consommables utilisés pour la PCR en temps réel, le coût de cette analyse est comparable à celui de la PCR en gel traditionnelle. Cependant, disposer d'un service de laboratoire approprié et d'un thermocycleur en temps réel reste un prérequis. L'analyse PCR en temps réel est décrite à l'Annexe 6.

#### 4.6 IDENTIFICATION D'AUTRES MYCOBACTÉRIES POSITIVES POUR IS2404

Il se peut que d'autres mycobactéries que *M. ulcerans* soient porteuses de la séquence IS2404 [36], mais cela n'interfère pas avec le diagnostic de l'ulcère de Buruli par PCR dans la mesure où aucune preuve n'indique que ces mycobactéries positives pour IS2404 provoquent des symptômes similaires à ceux de l'ulcère de Buruli chez l'homme. De plus, les mycobactéries positives pour IS2404 autres que *M. ulcerans* peuvent être facilement distinguées de *M. ulcerans* par des techniques moléculaires qui peuvent s'appliquer directement aux échantillons cliniques [37,38].

#### 4.7 MÉTHODES EN HISTOPATHOLOGIE

Il est très important de connaître en détail l'historique et la description de la lésion excisée pour que l'évaluation soit utile et aux fins d'archivage. La description doit inclure l'âge et le sexe du patient, le numéro d'identification du laboratoire ou de l'hôpital, et des informations sur le site de la lésion. Il faut faire attention de bien identifier les échantillons en écrivant avec un marqueur indélébile sur l'étiquette du récipient.

##### 4.7.1 SÉLECTION DU SITE POUR LE PRÉLÈVEMENT DE LA BIOPSIE

On conseille l'utilisation d'échantillons obtenus après excision. Pour les analyses histopathologiques, on recommande les biopsies à l'emporte-pièce (de 3 mm ou 4 mm de diamètre).

#### 4.7.1.1 Lésions non ulcéraives

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

#### 4.7.1.2 Lésions ulcéraives

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

#### 4.7.2 FIXATION DES TISSUS

Le tissu doit être fixé à température ambiante aussi rapidement que possible après avoir été excisé, dans une solution à 10 % de formol neutre tamponné (pH 7,4). Le tissu doit être découpé de façon à ce que l'épaisseur de l'échantillon ne dépasse pas 10 mm. Dans l'idéal, il faut prévoir pour le fixer un volume de formol au moins 10 fois supérieur à celui du tissu. La fixation initiale doit être réalisée à température ambiante car la pénétration du formol est liée à la température de la solution. Le tissu doit être laissé en contact avec la solution de fixation pendant au moins 24 heures.

Après fixation, les échantillons doivent être transférés dans un récipient contenant de l'éthanol à 70 %, avant de subir d'autres traitements. Après fixation, on peut expédier les échantillons dans des volumes moins importants de fixateur.

Il faut d'abord fixer les échantillons d'os dans du formol puis les décalcifier, avant de les sectionner.

La coloration immunohistochimique n'est pas indispensable au diagnostic, mais elle permet de mieux appréhender l'état d'une lésion et peut également s'avérer utile pour le diagnostic différentiel. Elle peut être effectuée rétrospectivement sur des échantillons fixés dans du formol à 10 % tamponné. La fixation du tissu ne doit toutefois pas durer plus de 24 heures car une fixation prolongée peut détruire les sites antigéniques.

**N.B.** Le fixateur, à savoir le formol à 10 % tamponné, est sensible à l'oxydation et ne doit pas être utilisé pendant plus de 3 mois. Il doit être limpide et ne pas contenir de précipité ; son pH doit être de 6,5 ou plus.

#### 4.7.3 PRÉPARATION DES COUPES HISTOPATHOLOGIQUES

Il suffit de traiter comme d'habitude les tissus fixés. On prépare des coupes de 4 à 6 µm d'épaisseur que l'on colore :

- à l'hématoxyline-éosine ;
- par la méthode de Ziehl-Neelsen pour mettre les BAAR en évidence ;
- à l'acide périodique-Schiff ou à la méthénamine argentique de Grocott pour la recherche des champignons ; et
- par la méthode de Gram pour mettre en évidence d'autres bactéries (*Annexe 7*).

Suivre les indications pour l'emploi éventuel des autres colorations. La technique utilisée pour l'histochemie est détaillée à l'*Annexe 7*.

#### 4.7.4 MODIFICATIONS GROSSIÈRES

Les modifications à la surface des lésions non ulcéraives font souvent apparaître une perte des repères topographiques et une dépigmentation. On observe dans les coupes transversales des modifications de la pigmentation, une nécrose et une minéralisation. Les ganglions lymphatiques apparaissent souvent grisâtres à la surface de la coupe.

Après décalcification, on observe dans les coupes transversales d'os une nécrose jaunâtre de la moelle et souvent, un amincissement de la zone corticale.

#### 4.7.5 MODIFICATIONS HISTOPATHOLOGIQUES AVANT LE TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE

##### 4.7.5.1 Modifications cutanées

Les modifications cutanées dépendent du stade d'évolution de la maladie.

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

Durant cette phase, l'épiderme reste intact mais est souvent hyperplasique, d'aspect essentiellement psoriasiforme ou pseudo-épithéliomateux.

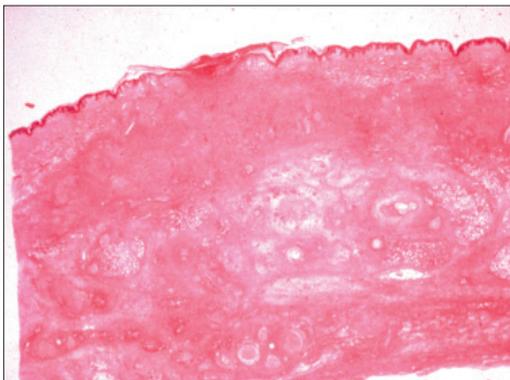
Le derme supérieur reste en général intact également, mais on peut y observer des dégénérescences à divers stades avec l'infiltration d'un petit nombre de cellules inflammatoires. Il y a une nécrose de coagulation confluyente dans le derme profond, le tissu sous-cutané et l'aponévrose sous-jacente (*Figure 3, Figure 4, Figure 5*).

FIGURE 3. COUPE D'UN NODULE EXCISÉ CHIRURGICALEMENT, PRÉSENT DANS L'ULCÈRE DE BURULI



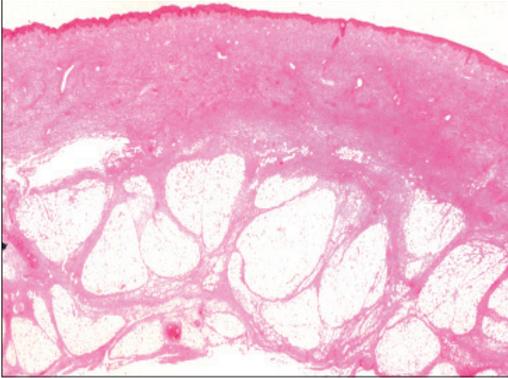
La zone centrale blanchâtre témoigne de la nécrose de coagulation. (Avec l'aimable autorisation de John Hayman)

FIGURE 4. COUPE MICROSCOPIQUE D'UN NODULE



Observer la nécrose massive de coagulation dans la couche profonde du derme et du tissu sous-cutané. Coloration à l'hématoxyline-éosine. (Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

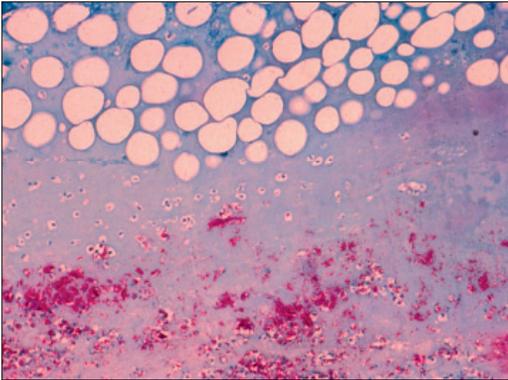
FIGURE 5. TISSU CUTANÉ ET SOUS-CUTANÉ PROVENANT D'UNE LÉSION NON ULCÉRATIVE TRÈS ÉTENDUE PROVOQUÉE PAR *M. ULCERANS*, QUI COUVRAIT 50 % DE LA SURFACE ABDOMINALE D'UN ENFANT DE 9 ANS



L'épiderme est intact. Il y a une nécrose massive de coagulation conflante dans l'ensemble de l'échantillon. Coloration à l'hématoxyline-éosine. (Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

On observe un œdème avec très peu de cellules inflammatoires, à moins que la lésion ne soit surinfectée par une bactérie pyogène. Les adipocytes enflent, mais peuvent perdre leur noyau tout en gardant leurs parois cellulaires (on les nomme parfois « adipocytes fantômes ») (*Figure 6*).

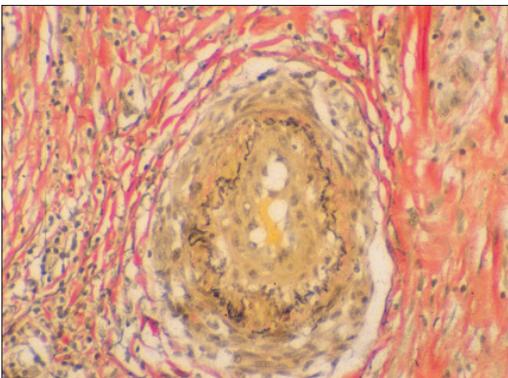
FIGURE 6. BASE NÉCROSÉE D'UN ULCÈRE DE BURULI FAISANT APPARAÎTRE DE NOMBREUX ADIPOCYTES FANTÔMES (DANS LA PARTIE SUPÉRIEURE) ET DE NOMBREUX BACILLES ACIDO-ALCOOLO RÉSISTANTS (BAAR) (DANS LA PARTIE INFÉRIEURE)



Coloration Ziehl-Neelsen. (Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

Dans le tissu sous-cutané, l'occlusion des vaisseaux par des thrombi est courante, et peut s'accompagner d'une vascularite (*Figure 7*, *Figure 8*).

FIGURE 7. VASCULARITE SÉVÈRE DANS LE TISSU SOUS-CUTANÉ D'UNE LÉSION DE L'ULCÈRE DE BURULI



Coloration Movat. (Avec l'aimable autorisation de John Hayman)

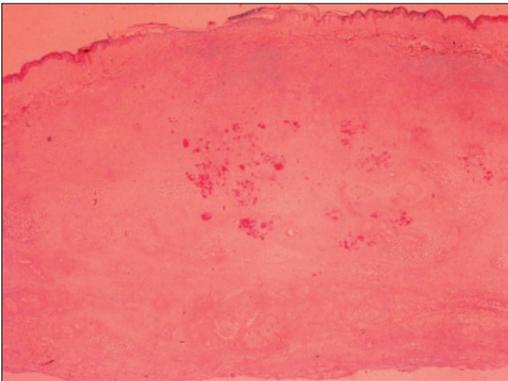
FIGURE 8. ADIPOCYTES FANTÔMES ET VASCULARITE



Coloration à l'hématoxyline-éosine. (Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

On observe différents degrés de minéralisation, notamment chez les patients africains. La coloration ZN classique met en évidence un grand nombre de BAAR extracellulaires, souvent en amas et confinés dans les zones nécrosées (*Figure 9*).

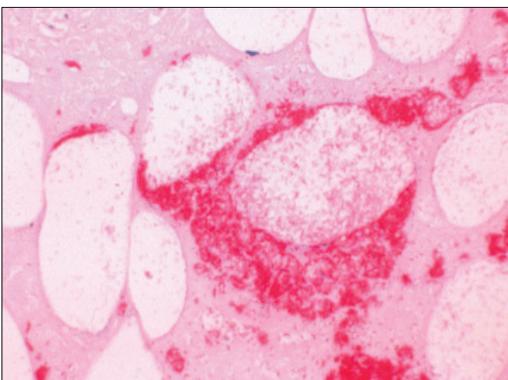
FIGURE 9. LA COLORATION ZIEHL-NEESEN (ZN) D'UNE COUPE PARALLÈLE À CELLE DE LA FIGURE 4 MET EN ÉVIDENCE DES BAAR CONFINÉS AU CENTRE DE LA LÉSION



La nécrose s'étend loin au-delà des BAAR. (Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

La plupart des bacilles se trouvent dans les zones profondes de l'échantillon mais peuvent envahir l'espace interstitiel dans le tissu adipeux et les cloisons interlobulaires du tissu sous-cutané (*Figure 10*).

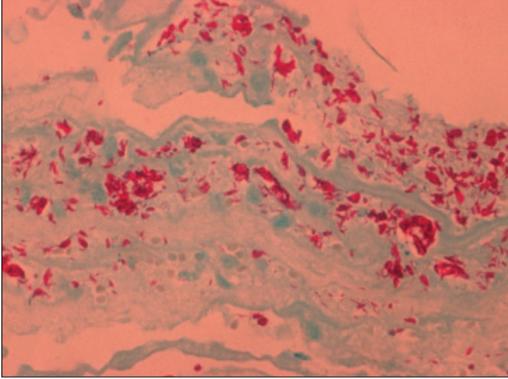
FIGURE 10. TISSU SOUS-CUTANÉ PROVENANT DES BORDS D'UN ULCÈRE DE BURULI : ON OBSERVE DES ADIPOCYTES FANTÔMES ACCOMPAGNÉS DE BAAR DANS L'ESPACE INTERSTITIEL



Coloration Ziehl-Neelsen. (Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

La nécrose persistante du derme aboutit en général à une dégénérescence de l'épiderme et finalement, à l'ulcération. Il arrive néanmoins que la nécrose s'étende latéralement, avec une prolifération des BAAR dans le tissu sous-cutané et l'aponévrose (*Figure 11*). Dans ce cas, l'ulcération de l'épiderme ne se produit alors que très tardivement. Quand la maladie évolue de cette manière, les patients développent la forme en plaque ou la forme œdémateuse.

FIGURE 11. DES AMAS DE BAAR INFILTRENT LA BASE DES BORDS D'UN ULCÈRE DE BURULI

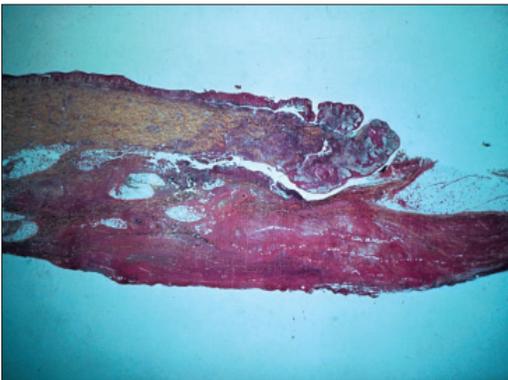


Amas de BAAR typiques. Coloration Ziehl-Neelsen. (Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

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

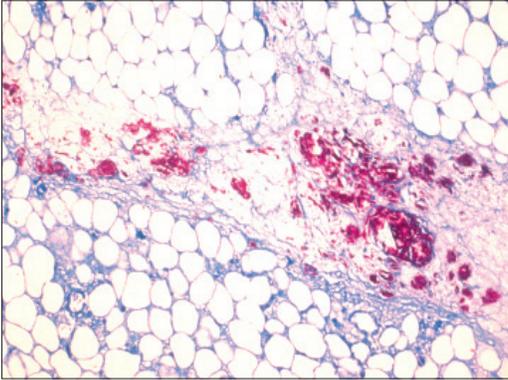
Les ulcères sont décollés et l'on observe la formation d'un nouvel épithélium sur les bords de la lésion et la surface en dessous du lambeau de derme qui la recouvre (*Figure 12*). L'épiderme adjacent est en général hyperplasique. La base de l'ulcère d'origine comporte une escarre nécrosée de débris cellulaires et de fibrine, et parfois une escarre centrale. On observe une nécrose de coagulation du tissu sous-cutané et de l'aponévrose semblable à celle décrite pour les lésions non ulcératives (*Figure 11*, *Figure 13*). Les BAAR se localisent à la base de l'escarre centrale et du tissu sous-cutané nécrosé. La maladie s'étend rarement au muscle sous-jacent. On observe parfois une vascularite et une minéralisation (*Figure 7*).

FIGURE 12. ÉCHANTILLON DE BIOPSIE PROVENANT DU BORD D'UN ULCÈRE DE BURULI ET MONTRANT LE DÉCOLLEMENT DU DERMIS ET UNE NÉCROSE MASSIVE DE L'ÉPIDERME, DU DERMIS, DE L'HYPDERME ET DE L'APONÉVROSE



(Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

FIGURE 13. TISSU SOUS-CUTANÉ PROVENANT DU BORD D'UN ULCÈRE DE BURULI ET MONTRANT LA NÉCROSE ET L'ÉPAISSISSEMENT D'UNE CLOISON INTERLOBULAIRE

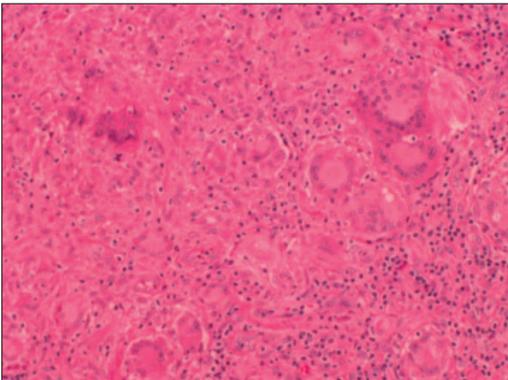


La cloison contient des amas de BAAR. Coloration Ziehl-Neelsen. (Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

#### Organisation (phase granulomateuse précoce)

La phase précoce de la guérison se caractérise par une réaction granulomateuse mal organisée dans le derme et le tissu sous-cutané (*Figure 14*). L'organisation des granulomes intervient souvent au cours de la quatrième semaine du traitement antibiotique.

FIGURE 14. GUÉRISON D'UN ULCÈRE DE BURULI À UN STADE PRÉCOCE, DANS LA PHASE D'ORGANISATION : LYMPHOCYTES, CELLULES ÉPITHÉLIOÏDES ET CELLULES GÉANTES



Coloration à l'hématoxyline-éosine. (Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

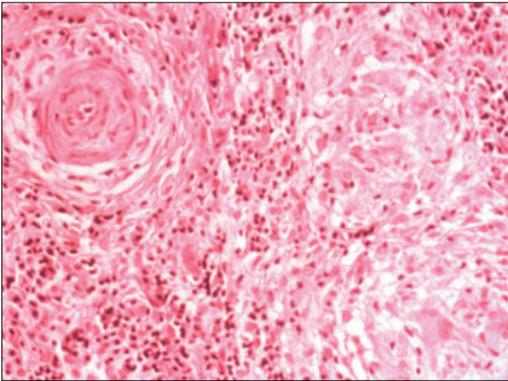
L'infiltration granulomateuse renferme des macrophages enflés (cellules épithélioïdes), des cellules géantes de Langhans et des lymphocytes, qui finissent par former des granulomes tuberculoïdes. On observe parfois des macrophages spumeux, des lymphocytes et des plasmocytes sur les bords de la graisse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

### Phase de guérison

Avec la progression de la guérison, le tissu de granulation se forme, suivi d'une fibrose et d'une cicatrice affaissée (*Figure 15*, *Figure 16*). On observe rarement des BAAR.

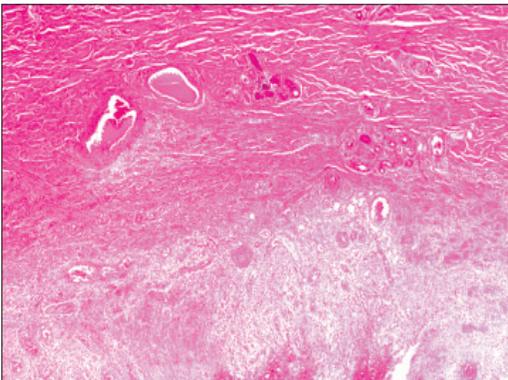
Quelques patients présentant des lésions anciennes, non traitées, peuvent également développer des granulomes au cours de la guérison spontanée.

FIGURE 15. GRANULOME BIEN FORMÉ AU COURS DE LA RÉACTION D'HYPERSENSIBILITÉ RETARDÉE DANS UN ULCÈRE DE BURULI EN VOIE DE GUÉRISON



Coloration à l'hématoxyline-éosine. (Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

FIGURE 16. GUÉRISON D'UN ULCÈRE DE BURULI À UN STADE AVANCÉ, AVEC DES CICATRICES SUR LA PLUS GRANDE PARTIE DE LA COUPE

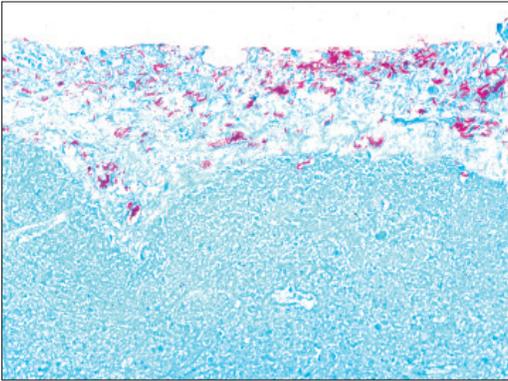


Coloration à l'hématoxyline-éosine. (Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

#### 4.7.5.2 Ganglions lymphatiques

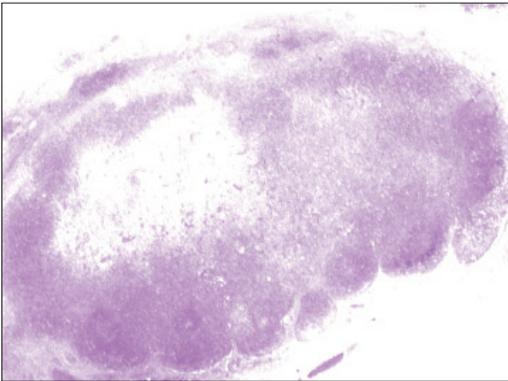
Bien que l'adénopathie clinique soit rarement manifeste, on observe souvent des adénites importantes à l'histopathologie, à la fois au niveau des ganglions adjacents à la lésion et au niveau des ganglions régionaux. Pour ceux qui sont adjacents, il arrive qu'il y ait une invasion importante de la capsule par les BAAR (*Figure 17*). On observe souvent une nécrose marquée du parenchyme avec destruction du tissu lymphoïde cortical (*Figure 18*). Dans ce cas, il arrive que le ganglion soit entièrement envahi par les BAAR. Les ganglions lymphatiques régionaux, cependant, peuvent présenter une histiocytose sinusoiïdale. On observe rarement de modifications granulomateuses, ni de BAAR.

FIGURE 17. ADÉNOPATHIE ASSOCIÉE À UN ULCÈRE DE BURULI



Le parenchyme du ganglion est nécrosé et fortement envahi de BAAR. Coloration Ziehl-Neelsen. (Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

FIGURE 18. ADÉNITE NÉCROSANTE D'UN GANGLION LYMPHATIQUE À PROXIMITÉ D'UN ULCÈRE DE BURULI



Le centre est détruit et il ne reste que des traces du tissu lymphoïde cortical. Coloration à l'hématoxyline-éosine (les colorations Ziehl-Neelsen de coupes parallèles mettent en évidence de nombreux BAAR sur la Figure 17). (Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

#### 4.7.5.3 Modifications de l'os

L'os peut être atteint par contamination directe à partir d'une lésion dans les tissus supérieurs, ou à partir de lésions connues distantes, probablement par propagation hémotogène de *M. ulcerans* (Figure 19).

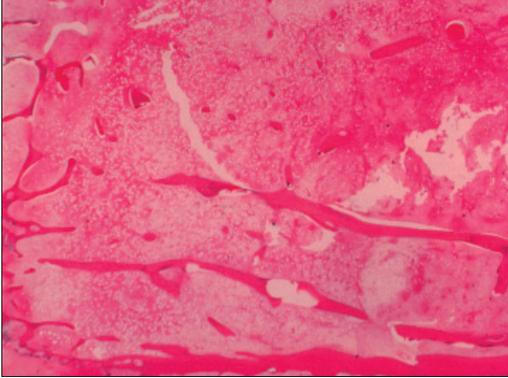
FIGURE 19. RADIOGRAPHIE DE LA JAMBE METTANT EN ÉVIDENCE LA DESTRUCTION DE L'OS



Le patient souffrait d'un ulcère de Buruli au-dessus de la zone atteinte. (Avec l'aimable autorisation de Giovanni Battista Priuli)

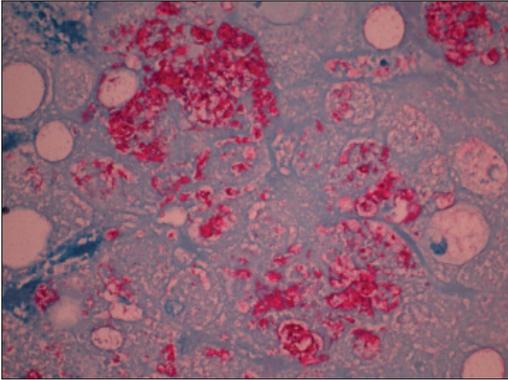
À l'histopathologie, une nécrose étendue de la moelle et une érosion de la travée osseuse apparaissent (Figure 20). On constate la présence de BAAR en nombre variable, le plus souvent dans la moelle nécrosée (Figure 21, Figure 22).

FIGURE 20. OSTÉOMYÉLITE DU TIBIA AVEC NÉCROSE DE LA MOELLE ET ÉROSION DE LA TRAVÉE OSSEUSE



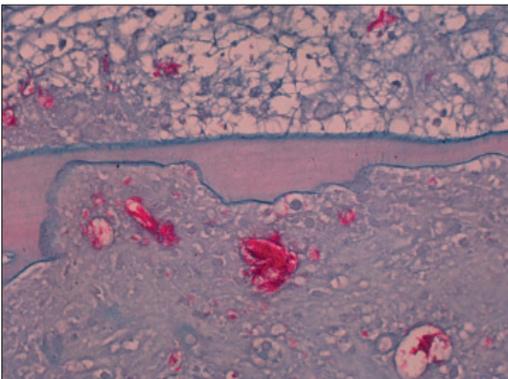
Coloration à l'hématoxyline-éosine. (Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

FIGURE 21. OSTÉOMYÉLITE DU TIBIA AVEC DES AMAS DE BAAR DANS LA MOELLE NÉCROSÉE



Coloration Ziehl-Neelsen. (Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

FIGURE 22. OSTÉOMYÉLITE DU TIBIA AVEC NÉCROSE DE LA MOELLE ET UNE TRAVÉE OSSEUSE EN VOIE DE DISSOLUTION DANS LA ZONE AVEC DES BAAR



Coloration Ziehl-Neelsen. (Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

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

#### 4.7.5.4 Patients souffrant d'une forme étendue de la maladie

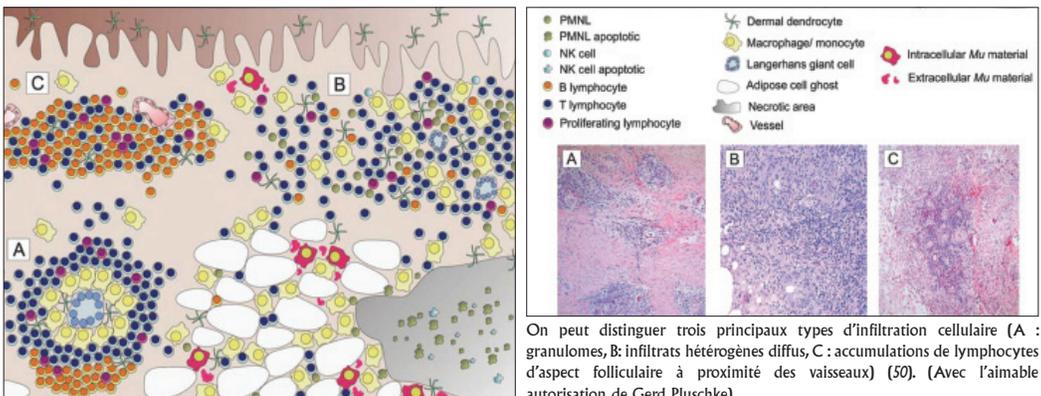
Les patients souffrant de lésions œdémateuses agressives atteignant de grandes parties du corps présentent souvent des œdèmes étendus et des troubles de la fonction rénale ou d'autres symptômes évoquant une atteinte viscérale. Ils meurent parfois assez rapidement au début de l'évolution de la maladie.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

#### 4.7.6 IMMUNOCHIMIE ET ANALYSE DES RÉACTIONS IMMUNITAIRES LOCALES LIÉES À LA CHIMIOTHÉRAPIE

À l'examen histopathologique, les lésions de l'ulcère de Buruli présentent des caractéristiques bien spécifiques, notamment la présence d'amas extracellulaires de BAAR répartis en foyers, une nécrose massive des tissus, des adipocytes fantômes et une infiltration cellulaire extrêmement faible au centre des lésions (39–41). Des signes d'inflammation chronique, des réactions granulomateuses et des BAAR intracellulaires peuvent toutefois être visibles à la périphérie des lésions non traitées, en particulier chez les malades ayant tendance à guérir spontanément (42).

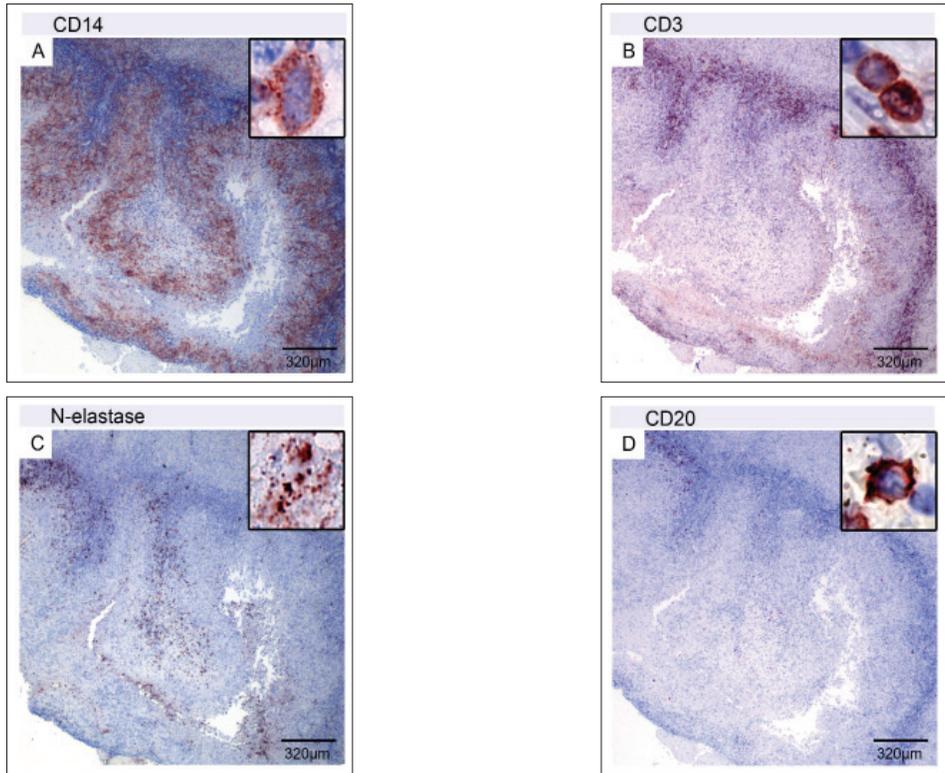
Pendant la chimiothérapie, il se produit peu à peu une infiltration chronique par les leucocytes, très probablement sous l'effet de molécules immunostimulantes et d'antigènes libérés par les mycobactéries détruites ; des infiltrats diffus apparaissent alors dans toutes les zones du tissu conjonctif dermique et du tissu adipeux atteints. Ce processus aboutit au développement de structures lymphoïdes ectopiques (Figure 23). Il est communément admis que les taux de mycolactone diminuent pendant la chimiothérapie, ce qui permet l'infiltration des leucocytes jusqu'aux mycobactéries extracellulaires, entraînant leur phagocytose et leur destruction. Les BAAR commencent à être internalisés par les phagocytes dès la fin de la deuxième semaine de traitement, lorsque *M. ulcerans* peut encore être cultivé à partir d'homogénats de tissu (41).

FIGURE 23. APERÇU SCHEMATIQUE DES PROFILS D'INFILTRATION CELLULAIRE ET DE LA RÉPARTITION D'ÉLÉMENTS MYCOBACTÉRIENS DANS DES LÉSIONS DE L'ULCÈRE DE BURULI TRAITÉES PAR ANTIBIOTIQUES



Les études immunohistochimiques donnent un aperçu de la composition cellulaire des infiltrats leucocytaires chroniques. Les restes d'infiltration précoce par les neutrophiles peuvent être détectés par immunohistochimie à l'intérieur des zones nécrosées centrales (*Figure 24*). Dans les lésions traitées, les macrophages et les monocytes CD14<sup>+</sup> se retrouvent généralement en abondance dans le tissu adipeux et autour des zones nécrosées (*Figure 24*), mais l'infiltration simultanée par les neutrophiles est souvent la conséquence d'une infection secondaire. Le rassemblement de cellules présentant l'antigène autour des zones nécrosées, le développement d'agrégats de lymphocytes B (*Figure 25*), et la présence de granulomes épithélioïdes hautement organisés (*Figure 26*), indiquent que la reconnaissance et l'apprêtement de l'antigène stimule les réactions immunitaires locales à *M. ulcerans*, actives et spécifiques.

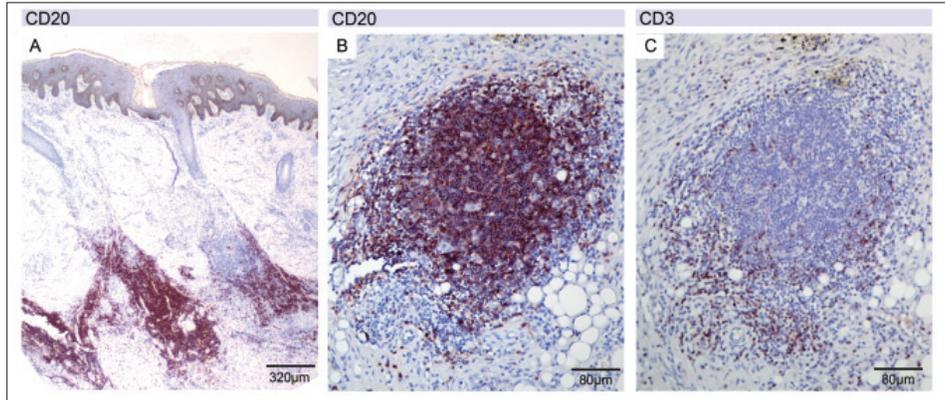
FIGURE 24. BANDES DE LEUCOCYTES ENTOURANT LE CENTRE NÉCROSÉ NON INFILTRÉ D'UNE LÉSION DE L'ULCÈRE DE BURULI



Une couronne de macrophages et de monocytes CD14<sup>+</sup> (A) s'imbrique dans une seconde couronne plus extérieure de lymphocytes T CD3<sup>+</sup> (B). Dans le noyau nécrosé, on a mis en évidence des débris de neutrophiles positifs pour la N-élastase (C), mais aucun neutrophile intact (insert D). On observe des amas de lymphocytes B CD20<sup>+</sup> loin du noyau nécrosé (48). (Avec l'aimable autorisation de Gerd Pluschke)

La couche extérieure des granulomes est essentiellement composée de lymphocytes T, les cellules T CD4<sup>+</sup> étant généralement plus nombreuses que les cellules T CD8<sup>+</sup>. Ces couronnes de lymphocytes sont parsemées de dendrocytes dermiques. Des agrégats de lymphocytes B, en foyers, apparaissent sur les bords extérieurs de la couche de lymphocytes T. Le centre des granulomes est occupé par des cellules présentant l'antigène, en particulier des cellules géantes de Langhans et des macrophages épithélioïdes. Dans les granulomes de la tuberculose humaine, le noyau central est habituellement nécrosé ; mais ce n'est pas le cas dans les lésions des patients souffrant de l'ulcère de Buruli traités par antibiotiques.

FIGURE 25. ACCUMULATION DE LYMPHOCYTES B DANS DES LÉSIONS DE L'ULCÈRE DE BURULI



(A) Bande de lymphocytes B CD20+ ; (B) Amas de lymphocytes B CD20+ parsemés de quelques lymphocytes T CD3+ ; (C) (48). (Avec l'aimable autorisation de Gerd Pluschke)

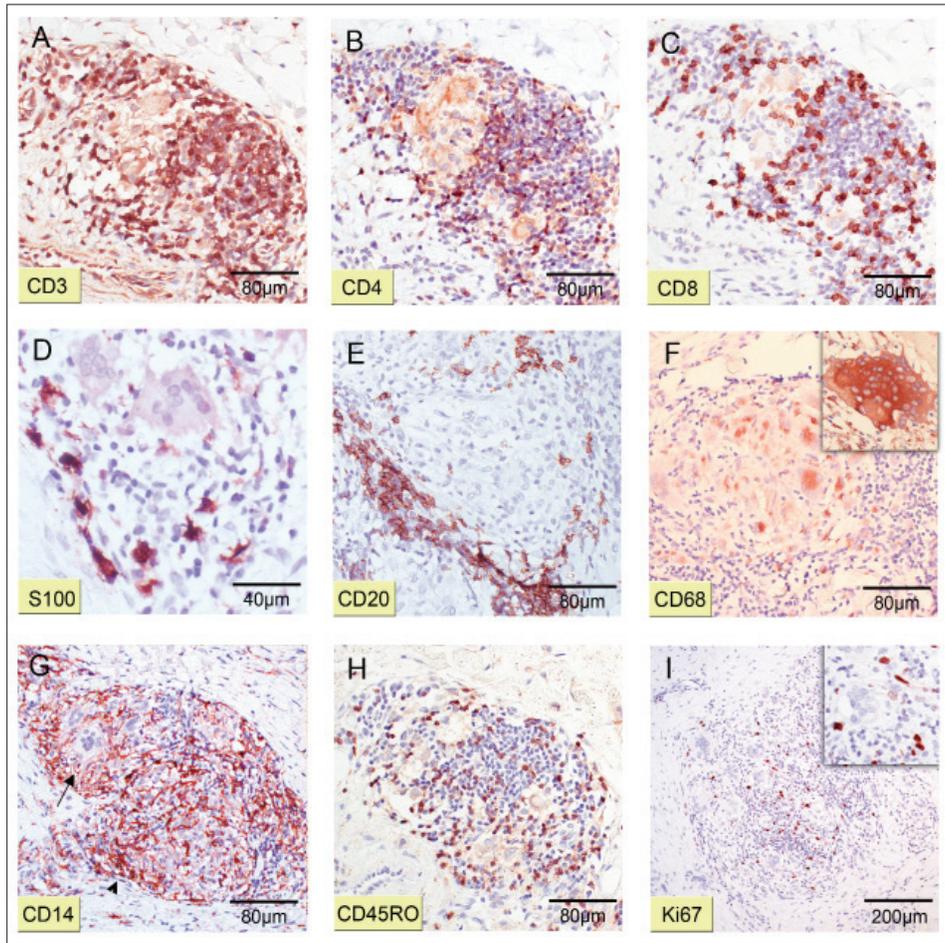
La répartition des différents types de leucocytes n'est pas forcément homogène dans les lésions de l'ulcère de Buruli ; par conséquent, l'analyse d'une seule biopsie peut ne pas être représentative de la lésion tout entière. De plus, il existe une grande variation de réponse d'un individu à l'autre en termes d'observations histopathologiques et de résultat clinique. Même si un tissu lymphoïde ectopique est supposé se former dans les maladies infectieuses, principalement pour séquestrer les agents pathogènes, ce processus s'accompagne souvent de dégâts tissulaires. Dans l'ulcère de Buruli, le développement de réactions paradoxales pendant le traitement (43,44), notamment un agrandissement des ulcères et une évolution accélérée des plaques non ulcéraives et des œdèmes en lésions ulcéraives, peut constituer chez certains patients un syndrome inflammatoire de reconstitution immunitaire (IRIS). Une telle aggravation transitoire de lésions connues ou l'apparition de nouvelles lésions caractéristiques de la maladie malgré un traitement adapté, ou les deux, est connue depuis longtemps dans le cas de la lèpre et de la tuberculose.

Dans l'ulcère de Buruli, la détérioration des lésions après l'instauration d'un traitement antimycobactérien peut être liée à certains facteurs tels que :

- la charge de débris mycobactériens et de tissu nécrotique qui subsiste dans la lésion (45) ;
- une surinfection ; et
- la composition et l'état d'organisation des infiltrats cellulaires (46).

Le phénomène de réactivation, par exemple le développement de nouveaux ulcères ou de nodules douloureux plusieurs semaines à plusieurs mois après la fin du traitement, pourrait être considéré comme un effet bénéfique, à savoir la mise en route du système immunitaire adaptatif, conséquence du traitement réussi des lésions primaires, au lieu d'être considéré comme un échec de la chimiothérapie antimycobactérienne (47,48).

FIGURE 26. ORGANISATION DÉTAILLÉE D'UN GRANULOME PRÉSENT DANS UNE LÉSION DE L'ULCÈRE DE BURULI TRAITÉE PAR ANTIBIOTIQUES



Des coupes histologiques sériees ont été colorées avec des anticorps dirigés contre différents marqueurs membranaires ou marqueurs cytoplasmiques (contre coloration par l'hématoxyline). (A, B, C) Les marquages avec les anticorps anti CD3, CD4 et CD8, respectivement, montrent une couronne de lymphocytes auxiliaires ainsi que des lymphocytes T cytotoxiques entourant le centre du granulome. (D) Des dendrocytes dermiques S100+ se disséminent au sein des lymphocytes T dans la couche extérieure. (E) Marquage par l'anticorps anti CD20 mettant en évidence des lymphocytes B en périphérie du granulome. (F) Cellules présentatrices d'antigène CD68+, au centre d'un granulome ; l'insert montre de grandes cellules géantes de Langhans. (G) On peut observer de grandes quantités de CD14 liés à la membrane (flèche) et solubles (pointe de flèche). (H) Répartition des lymphocytes activés (CD45RO+). (I) Des cellules (Ki67+) en prolifération révèlent l'état actif des granulomes (50). (Avec l'aimable autorisation de Gerd Pluschke)

#### 4.7.7 RÉACTIONS PARADOXALES

Dans la tuberculose et d'autres infections à mycobactéries, le terme de réaction paradoxale décrit l'aggravation clinique de lésions préexistantes ou le développement de nouvelles lésions chez des patients dont l'état s'était initialement amélioré lorsqu'ils recevaient le traitement antimycobactérien [44,45,47–49]. Dans le traitement de l'ulcère de Buruli, le délai d'apparition des réactions paradoxales est imprévisible (elles peuvent apparaître quelques jours à quelques mois après le début de la chimiothérapie) ; la durée et la gravité de ces réactions sont elles aussi impossibles à prévoir. Les réactions paradoxales qui se produisent pendant un traitement antimycobactérien semblent plus fréquentes et graves chez les individus séropositifs pour le VIH qui suivent également une thérapie antirétrovirale très active. Pour ces cas, le mécanisme sous-jacent de la réaction paradoxale peut être un syndrome inflammatoire de reconstitution immunitaire (également nommé IRIS). Toutefois, il arrive que des réactions paradoxales se produisent aussi chez des patients qui ne sont pas immunodéprimés, et pour ces cas, les mécanismes exacts ne sont pas bien élucidés.

La réaction paradoxale, telle qu'elle a été définie dans l'ulcère de Buruli, comprend l'agrandissement des ulcères, l'évolution accélérée des plaques non ulcératives et des œdèmes en lésions ulcératives, et l'émergence de nouvelles lésions pendant le traitement antibiotique. Différents mécanismes sous-jacents peuvent coexister ; il est par conséquent inexact de considérer toutes les réactions paradoxales survenant pendant le traitement de l'ulcère de Buruli comme un IRIS.

Dans la mesure où la mycolactone provoque une suppression de l'immunité locale (et parfois générale) dans les lésions de l'ulcère de Buruli, pratiquement tous les patients souffrant de l'ulcère de Buruli sous traitement antimycobactérien développent de fortes réactions immunitaires locales. Chez de nombreux malades, l'infiltration massive des lésions et le développement d'un tissu lymphoïde atypique ne semblent pas gêner la cicatrisation des plaies. On considère que les fortes réactions immunitaires locales constituent un bon marqueur du succès du traitement antimycobactérien (avec la destruction de *M. ulcerans* et la chute correspondante des taux de mycolactone), et qu'elles ne sont pas obligatoirement le signe de complications liées aux réactions immunitaires. Chez les patients traités pour l'ulcère de Buruli, il est difficile de faire la différence entre une détérioration résultant d'une réaction paradoxale et une détérioration résultant d'un échec thérapeutique.

## 5. ASSURANCE DE LA QUALITÉ

---

Si le dépistage en laboratoire de l'ulcère de Buruli n'est pas fiable, il peut arriver que des patients souffrant de cette maladie ne soient pas diagnostiqués, ce qui risque de leur faire développer une forme plus grave de la maladie, mais aussi d'entraîner une sous-estimation de la charge de morbidité dans une région donnée. Inversement, des patients qui ne souffrent pas de cette maladie peuvent se retrouver inutilement traités, et la charge de morbidité peut être surestimée. Il est donc indispensable de s'assurer de l'exactitude et de la fiabilité de toutes les analyses de laboratoire, objectif qui peut être atteint à travers un processus connu sous le nom d'assurance de la qualité.

L'exactitude et la fiabilité des analyses de laboratoire sont indispensables au succès des programmes de lutte contre l'ulcère de Buruli. Toutes les composantes du système d'analyse doivent être contrôlées pour garantir la qualité de l'ensemble du processus, pour détecter et diminuer les erreurs, et pour améliorer l'uniformité des résultats entre les différents sites d'analyse. L'assurance de la qualité doit être mise en œuvre par chaque laboratoire (au titre du contrôle interne de la qualité) et également par un laboratoire de référence (il s'agit alors d'une évaluation externe de la qualité).

- **Contrôle interne de la qualité** : il comprend la surveillance systématique en interne des pratiques de travail, des procédures techniques, du matériel et des produits, et inclut la surveillance de la qualité des réactifs (tels que les colorants).
- **Évaluation externe de la qualité** : c'est un processus qui évalue la performance d'un laboratoire. Il peut inclure l'évaluation sur site des laboratoires, le recours à l'analyse de panels d'échantillons, et le réexamen en aveugle des résultats d'analyses.

Les systèmes de contrôle interne de la qualité et d'évaluation externe de la qualité sont détaillés à l'*Annexe 8* (à partir du programme de formation sur l'examen direct des frottis par microscopie pour la recherche des BAAR, Current Laboratory Practice Series) (5).

## 6. RÔLE DES PROGRAMMES NATIONAUX, DES ÉTABLISSEMENTS DE SANTÉ ET DES LABORATOIRES

---

Les programmes nationaux, les établissements de santé et les laboratoires remplissent chacun un rôle important pour assurer la qualité de la confirmation de l'ulcère de Buruli au laboratoire.

### 6.1 PROGRAMMES NATIONAUX DE LUTTE CONTRE L'ULCÈRE DE BURULI

- veillent à ce que les laboratoires locaux et les laboratoires nationaux de référence disposent des ressources appropriées pour traiter les échantillons de diagnostic ;
- surveillent les activités des laboratoires locaux et des laboratoires nationaux de référence ;
- rassemblent les résultats de tous les laboratoires et transmettent ces résultats aux autorités nationales et internationales (telles que les ministres de la santé et l'OMS) ;
- identifient les besoins en matière de formation dans les laboratoires, et coordonnent la formation avec les laboratoires pour le personnel des établissements de santé le cas échéant.

### 6.2 ÉTABLISSEMENTS DE SANTÉ

- recherchent chez les patients présumés atteints de l'ulcère de Buruli des lésions non ulcératives ou ulcératives ;
- obtiennent des échantillons appropriés pour une confirmation du diagnostic ;
- étiquettent les échantillons et remplissent le formulaire UB 03 (*Annexe 9*) ;
- transportent les échantillons jusqu'à un laboratoire local ou jusqu'au laboratoire national de référence ;
- recueillent les résultats du laboratoire ;
- reportent les résultats sur les formulaires UB 01 et UB 03 (*Annexe 9*) ;
- transmettent les résultats au programme national.

### 6.3 LABORATOIRES

#### 6.3.1 LABORATOIRES DE NIVEAU PÉRIPHÉRIQUE

- reçoivent et traitent les écouvillons et les échantillons prélevés par AAF en effectuant l'examen direct des frottis ;
- enregistrent les résultats des frottis dans les 24 heures, et transmettent ceux-ci au programme national en respectant le délai indiqué dans les lignes directrices relatives à la notification des cas ;
- font parvenir au laboratoire national de référence 20 % de tous les échantillons traités, pour que ces derniers y soient contrôlés dans le cadre de l'assurance externe de la qualité.

#### 6.3.2 LABORATOIRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE

- reçoit et traite les écouvillons, les échantillons prélevés par AAF et, si nécessaire, les pièces biopsiques prélevées à l'emporte-pièce ou excisées, par les méthodes suivantes : examen direct des frottis, amplification génique (PCR), culture, et histopathologie (dans certains laboratoires) ;
- fait parvenir les résultats de l'examen direct des frottis à l'établissement de santé dans un délai de 24 à 48 heures pour les frottis, 2 semaines pour la PCR, 4 semaines pour l'histopathologie et 6 mois pour les cultures. L'établissement de santé transmettra les résultats au programme national en respectant le délai indiqué dans les lignes directrices nationales relatives à la notification ;

- reçoit environ 20 % de tous les échantillons traités par les laboratoires périphériques, afin de procéder à une assurance externe de la qualité sur les résultats de la microscopie ;
- organise périodiquement des essais d'aptitude sur la microscopie à destination des laboratoires périphériques à l'aide de panels d'échantillons ; idéalement, à une fréquence annuelle. Un réexamen en aveugle des lames peut être prévu de temps en temps pour les laboratoires qui rencontrent régulièrement des problèmes au cours des essais d'aptitude ;
- organise des formations sur les méthodes en microscopie pour :
  - les techniciens qui sont nouveaux dans le réseau des laboratoires de microscopie,
  - certains techniciens dans le cas où le processus d'assurance externe de la qualité a mis au jour des problèmes bien précis,
  - tous les techniciens si un changement important est intervenu dans les procédures utilisées au sein du réseau.
- supervise périodiquement le travail des laboratoires périphériques ; idéalement, à une fréquence trimestrielle ;
- organise périodiquement un réexamen en aveugle des lames émanant des laboratoires périphériques ; idéalement, à une fréquence trimestrielle. Des analyses sur panels d'échantillons peuvent être prévues pour les laboratoires qui rencontrent régulièrement des problèmes au cours du processus de réexamen en aveugle ; ce type d'analyse peut être prévu une fois par an pour tous les laboratoires.

### 6.3.3 LABORATOIRE INTERNATIONAL (SUPRANATIONAL) DE RÉFÉRENCE

- reçoit et traite les écouvillons, les échantillons prélevés par AAF et, si nécessaire, les pièces biopsiques prélevées à l'emporte-pièce ou excisées, par les méthodes suivantes : examen direct des frottis, amplification génique (PCR), et occasionnellement, culture et histopathologie ;
- fait parvenir les résultats à l'établissement de santé dans un délai de 24 à 48 heures pour les frottis, 2 semaines pour la PCR, 4 semaines pour l'histopathologie et 6 mois pour les cultures. L'établissement de santé transmettra les résultats au programme national en respectant le délai indiqué dans les lignes directrices nationales relatives à la notification ;
- organise périodiquement des essais d'aptitude sur la PCR à destination des laboratoires nationaux de référence à l'aide de panels d'échantillons ; idéalement, à une fréquence annuelle. Un réexamen en aveugle des échantillons peut être prévu pour les laboratoires qui rencontrent régulièrement des problèmes au cours des essais d'aptitude. Dans ce cas, 10 % de tous les échantillons traités par le laboratoire national de référence sont réanalysés dans le cadre de l'assurance externe de la qualité ;
- valide et met en place de nouvelles techniques de diagnostic ;
- supervise périodiquement le travail des laboratoires périphériques ; idéalement, à une fréquence trimestrielle ;
- organise périodiquement un réexamen en aveugle des lames émanant des laboratoires périphériques ; idéalement, à une fréquence trimestrielle. Des analyses sur panels d'échantillons peuvent être prévues pour les laboratoires qui rencontrent régulièrement des problèmes au cours du processus de réexamen en aveugle ; ce type d'analyse peut être prévu une fois par an pour tous les laboratoires.

### 6.3.4 RÉSEAU MONDIAL DE LABORATOIRES POUR LA CONFIRMATION DE LA MALADIE CAUSÉE PAR *MYCOBACTERIUM ULCERANS* (ULCÈRE DE BURULI)

Un réseau de laboratoires effectuant la PCR a été établi dans les pays d'endémie et dans les pays non endémiques. Ces laboratoires sont indiqués dans le *Tableau 2*.

Les résultats de l'assurance de la qualité de la PCR, effectuée par la plupart de ces laboratoires, ont été publiés [52].

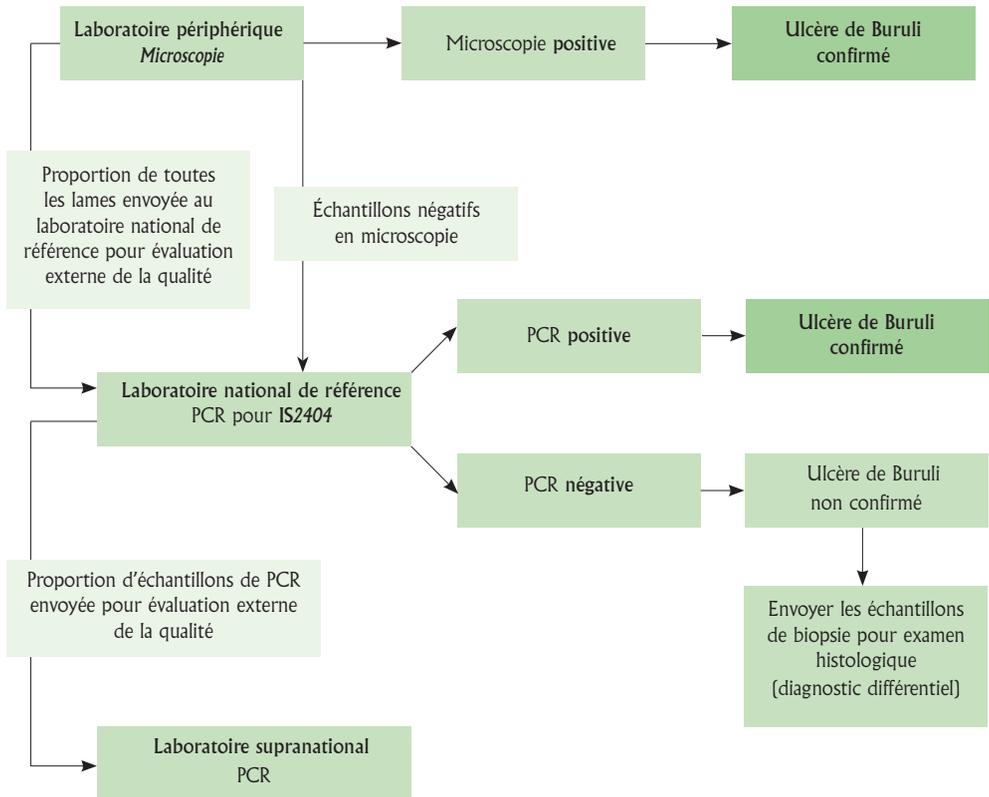
TABLEAU 2. RÉSEAU MONDIAL DE LABORATOIRES POUR LA CONFIRMATION DE LA MALADIE CAUSÉE PAR *MYCOBACTERIUM ULCERANS* (ULCÈRE DE BURULI)

Pays	Nom du laboratoire	Personne à contacter
1. Allemagne	Département des Maladies infectieuses et de Médecine tropicale, Université Ludwig-Maximilian de Munich	Dr Gisela Bretzel <i>bretzel@lrz.uni-muenchen.de</i> Dr Marcus Beissner <i>beissner@lrz.uni-muenchen.de</i>
2. Australie	Laboratoire de référence de l'État de Victoria pour les Maladies infectieuses, Melbourne*  Laboratoire de référence des mycobactéries, Pathologie Queensland	Dr Janet Fyfe <i>Janet.Fyfe@mh.org.au</i> Mme Caroline Lavender <i>Caroline.Lavender@mh.org.au</i> Dr Sushil Pandey <i>sushil_pandey@health.qld.gov.au</i>
3. Belgique	Institut de Médecine Tropicale, Anvers*	Professeur Françoise Portaels <i>fportaels@itg.be</i> Professeur Bouke de Jong <i>bdejong@itg.be</i> Dr Miriam Eddyani <i>MEddyani@itg.be</i>
4. Bénin	Laboratoire de Référence des Mycobactéries, Cotonou  Centre de dépistage et de traitement de l'ulcère de Buruli "Raoul et Madeleine Follereau" de Pobè	Dr Dissou Affolabi <i>affolabi_dissou@yahoo.fr</i> Professeur Séverin Anagonou <i>anagonou_severin@yahoo.fr</i> Dr Estelle Marion <i>stel.marion@yahoo.fr</i>
5. Cameroun	Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé	Dr Sara Eyangoh <i>eyangoh@pasteur-yaounde.org</i>
6. Côte d'Ivoire	Institut Pasteur, Abidjan	Professeur Mireille Dosso <i>mireilledosso@yahoo.fr</i> Dr Solange Kakou Ngazoa <i>ngazoa_solange@yahoo.fr</i> Dr N'Guetta Aka <i>aka_nguetta@yahoo.fr</i>
7. France	Université et CHU d'Angers - Institut de Biologie en Santé- IRIS	Dr Laurent Marsollier <i>laurent.marsollier@inserm.fr</i>
8. Guyane française	Institut Pasteur, Cayenne	Dr Anne-Sophie Drogoul <i>annes0.drogoul@gmail.com</i>
9. Ghana	Institut Noguchi pour la recherche médicale, Accra  Centre de Recherches collectives de Kumasi, Kumasi	Professeur Dorothy Yeboah-Manu <i>DYeboah-Manu@noguchi.mimcom.org</i> Dr Anthony Ablordey <i>AAblordey@noguchi.mimcom.org</i> Dr Richard Phillips <i>rodamephillips@gmail.com</i> Mr Michael Frimpong <i>mfrimpong28@gmail.com</i>
10. République centrafricaine	Institut Pasteur, Bangui	Dr Fanny-Elodie Minime-Lingoupou <i>filingoupou@yahoo.fr</i>
11. République démocratique du Congo	Institut National de Recherche Biomédicale (INRB), Kinshasa	Professeur Anatole Kibadi Kapay <i>akibadi@yahoo.fr</i> Mme Bibiche Mundabi <i>mbd852000@yahoo.fr</i>
12. Japon	Centre de Recherche sur la Lèpre, Institut national des Maladies infectieuses, Tokyo	Dr Kazue Nakanaga <i>nakanaga@nih.go.jp</i>
13. Suisse	Institut Tropical et de Santé Publique Suisse, Bâle	Professeur Gerd Pluschke <i>Gerd.Pluschke@unibas.ch</i>
14. Togo	Institut National d'Hygiène, Lomé	Dr Abiba Banla-Kere <i>kerebanla@hotmail.com</i>

\* L'Institut de Médecine Tropicale à Anvers, en Belgique, est un Centre collaborateur de l'OMS pour le diagnostic et la surveillance de l'infection à *Mycobacterium ulcerans* ; le Laboratoire de référence de l'État de Victoria pour les maladies infectieuses à Melbourne, en Australie, est un Centre collaborateur de l'OMS pour *Mycobacterium ulcerans*

## 7. PROPOSITION D'ALGORITHME POUR DIAGNOSTIQUER L'ULCÈRE DE BURULI

FIGURE 27. ALGORITHME POUR DIAGNOSTIQUER L'ULCÈRE DE BURULI AUX NIVEAUX PÉRIPHÉRIQUE, NATIONAL DE RÉFÉRENCE ET SUPRANATIONAL (53)



PCR: « polymerase chain reaction », réaction d'amplification en chaîne par polymérase.

Proposition d'algorithme pour les laboratoires diagnostiquant l'ulcère de Buruli aux niveaux périphérique, national de référence, et supranational (53) (Avec l'aimable autorisation de Dissou Affolabi)

## RÉFÉRENCES

---

1. *Treatment of Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer): guidance for health workers*. Geneva, World Health Organization, 2012 (WHO/HTM/NTD/IDM/2012.1).
2. *Summary report of the meeting of the WHO Technical Advisory Group on Buruli ulcer, Geneva, World Health Organization, 2008* (available at: [http://www.who.int/entity/buruli/events/TAG\\_report\\_FINAL.pdf](http://www.who.int/entity/buruli/events/TAG_report_FINAL.pdf); accessed February 2013).
3. Portaels F, Johnson P, Meyers WM, eds. *Buruli ulcer: diagnosis of Mycobacterium ulcerans disease. A manual for health care providers*. Geneva, World Health Organization, 2001 (WHO/CDS/CPE/GBUI/2001.4).
4. Eddyani M et al. Primary culture of *Mycobacterium ulcerans* from human tissue specimens after storage in semisolid transport medium. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46:69–72.
5. Eddyani M et al. Fine-needle aspiration, an efficient sampling technique for bacteriological diagnosis of nonulcerative Buruli ulcer. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47:1700–1704.
6. Herbinger KH et al. Comparative study of the sensitivity of different diagnostic methods for the laboratory diagnosis of Buruli ulcer disease. *Clinical Infectious Diseases*, 2009, 48:1055–1064.
7. Siegmund V et al. Dry reagent-based polymerase chain reaction compared with other laboratory methods available for the diagnosis of Buruli ulcer disease. *Clinical Infectious Diseases*, 2007, 45:68–75.
8. Yeboah-Manu D et al. Evaluation of decontamination methods and growth media for primary isolation of *Mycobacterium ulcerans* from surgical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42:5875–5876.
9. Bretzel G et al. A stepwise approach to the laboratory diagnosis of Buruli ulcer disease. *Tropical Medicine and International Health*, 2007, 12:89–96.
10. Siegmund V et al. Dry-reagent-based PCR as a novel tool for laboratory confirmation of clinically diagnosed *Mycobacterium ulcerans*-associated disease in areas in the tropics where *M. ulcerans* is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43:271–276.
11. Rondini S et al. Contiguous spread of *Mycobacterium ulcerans* in Buruli ulcer lesions analysed by histopathology and real-time PCR quantification of mycobacterial DNA. *Journal of Pathology*, 2006, 208:119–128.
12. Guarner J et al. Histopathologic features of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Emerging Infectious Diseases*, 2003, 9:651–656.
13. Affolabi D et al. Effects of grinding surgical tissue specimens and smear staining methods on Buruli ulcer microscopic diagnosis. *Tropical Medicine and International Health*, 2008, 13:187–190.
14. Affolabi D et al. Setting up a national reference laboratory for Buruli ulcer: the case of Benin. *Tropical Medicine and International Health*, 2008, 13:365–368.
15. Bretzel G et al. Laboratory confirmation of Buruli ulcer disease in Togo, 2007–2010. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2011, 5:e1228 (doi:10.1371/journal.pntd.0001228).
16. Mensah-Quainoo E et al. Diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer) at a treatment centre in Ghana: a retrospective analysis of laboratory results of clinically diagnosed cases. *Tropical Medicine and International Health*, 2008, 13:191–198.
17. Phanzu D et al. *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer) in a rural hospital in Bas-Congo, Democratic Republic of Congo, 2002–2004. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2006, 75:311–314.

18. Portaels F et al. Buruli ulcer and its bone lesions: about 73 cases. *Bulletin des séances—Académie royale des sciences d'outre-mer*, 2003, 49:161–190.
19. Guimaraes-Peres A et al. Comparison of two PCRs for detection of *Mycobacterium ulcerans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37:206–208.
20. Noeske J et al. Buruli ulcer disease in Cameroon rediscovered. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2004, 70:520–526.
21. Phillips R et al. Sensitivity of PCR targeting the IS2404 insertion sequence of *Mycobacterium ulcerans* in an assay using punch biopsy specimens for diagnosis of Buruli ulcer. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43:3650–3656.
22. Stienstra Y et al. Analysis of an IS2404-based nested PCR for diagnosis of Buruli ulcer disease in regions of Ghana where the disease is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41:794–797.
23. Herbingier KH et al. Efficiency of fine-needle aspiration compared with other sampling techniques for laboratory diagnosis of Buruli ulcer disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48:3732–3734.
24. Phillips RO et al. Sensitivity of PCR targeting *Mycobacterium ulcerans* by use of fine needle aspirates for diagnosis of Buruli ulcer. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47(4):924–6.
25. Ablordey A et al. Detection of *Mycobacterium ulcerans* by the loop mediated isothermal amplification method. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2012, 6:e1590 (doi:10.1371/journal.pntd.0001590).
26. de Souza D et al. A quick and cost effective method for the diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* infection. *BMC Infectious Diseases*, 2012, 12:8 (doi: 10.1186/1471-2334-12-8).
27. Njiru ZK et al. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium ulcerans* by use of a loop-mediated isothermal amplification test. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50:1737–1741.
28. Palomino JC, Portaels F. Effects of decontamination methods and culture conditions on viability of *Mycobacterium ulcerans* in the BACTEC system. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 6:402–408.
29. Palomino JC et al. Effect of oxygen on growth of *Mycobacterium ulcerans* in the BACTEC system. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36:3420–3422.
30. Affolabi D et al. Effects of decontamination, DNA extraction, and amplification procedures on the molecular diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer). *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50:1195–1198.
31. Durnez L et al. A comparison of DNA extraction procedures for the detection of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer, in clinical and environmental specimens. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 76:152–158.
32. Fyfe J et al. Development and application of two multiplex real-time PCR assays for the detection of *Mycobacterium ulcerans* in clinical and environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73:4733–4740.
33. Ross BC et al. Development of a PCR assay for rapid diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35:1696–1700.
34. Stinear T et al. Identification and characterization of IS2404 and IS2606: two distinct repeated sequences for detection of *Mycobacterium ulcerans* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37:1018–1023.
35. Beissner M et al. Detection of viable *Mycobacterium ulcerans* in clinical samples by a novel combined 16S rRNA reverse transcriptase/IS2404 real-time qPCR assay. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2012, 6:e1756 (doi:10.1371/journal.pntd.0001756).
36. Yip MJ et al. Evolution of *Mycobacterium ulcerans* and other mycolactone-producing mycobacteria from a common *Mycobacterium marinum* progenitor. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189:2021–2029.

37. Stragier P et al. Heterogeneity among *Mycobacterium ulcerans* isolates from Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 2006, 12:844–847.
38. Stragier P et al. Genotyping *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* by using mycobacterial interspersed repetitive units. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187:1639–1647.
39. Hayman JA. Out of Africa: observations on the histopathology of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Journal of Clinical Pathology*, 1993, 46:5–9.
40. Meyers WM. Mycobacterial infections of the skin. In: Doerr W, Uehlinger E, eds. *Spezielle Pathologische Anatomie* [Annals of Internal Medicine], 2nd ed. Berlin, Springer-Verlag, 1995:291–377.
41. Schutte D, Umboock A, Pluschke G. Phagocytosis of *Mycobacterium ulcerans* in the course of rifampicin and streptomycin chemotherapy in Buruli ulcer lesions. *British Journal of Dermatology*, 2009, 160:273–283.
42. Silva MT, Portaels F, Pedrosa J. Pathogenetic mechanisms of the intracellular parasite *Mycobacterium ulcerans* leading to Buruli ulcer. *Lancet Infectious Diseases*, 2009, 9:699–710.
43. Nienhuis WA et al. Paradoxical responses after start of antimicrobial treatment in *Mycobacterium ulcerans* infection. *Clinical Infectious Diseases*, 2012, 54:519–526.
44. O'Brien DP et al. "Paradoxical" immune-mediated reactions to *Mycobacterium ulcerans* during antibiotic treatment: a result of treatment success, not failure. *Medical Journal of Australia*, 2009, 191:564–566.
45. Ruf MT et al. Histopathological changes and clinical responses of Buruli ulcer plaque lesions during chemotherapy: a role for surgical removal of necrotic tissue? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2011, 5:e1334 [doi:10.1371/journal.pntd.0001334].
46. Schutte D, Pluschke G. Immunosuppression and treatment-associated inflammatory response in patients with *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer). *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2009, 9:187–200.
47. Beissner M et al. Spontaneous clearance of a secondary Buruli ulcer lesion emerging ten months after completion of chemotherapy—a case report from Togo. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2012, 6:e1747 [doi:10.1371/journal.pntd.0001747].
48. Ruf MT et al. Secondary Buruli ulcer skin lesions emerging several months after completion of chemotherapy: paradoxical reaction or evidence for immune protection? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2011, 5:e252 [doi: 10.1371/journal.pntd.0001252].
49. O'Brien DP et al. Paradoxical immune-mediated reactions to *Mycobacterium ulcerans* during antibiotic treatment: a result of treatment success, not failure. *Medical Journal of Australia*, 2009, 191:564–566.
50. Schutte D et al. Development of highly organized lymphoid structures in Buruli ulcer lesions after treatment with rifampicin and streptomycin. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2007, 1(1):e2 [doi:10.1371/journal.pntd.0000002].
51. *Acid-fast direct smear microscopy training package*. Atlanta, GA, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, World Health Organization, Association of Public Health Laboratories, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, United States Agency for International Development, United States Centers for Disease Control and Prevention, 2006 [Current Laboratory Practice Series].
52. Eddyani M et al. Multicenter external quality assessment program for PCR detection for *Mycobacterium ulcerans* in clinical and environmental specimens. *PLoS ONE*, 2014 [DOI: 10.1371/journal.pone.0089407].
53. Affolabi D. *Development of simple and inexpensive tools for the control of mycobacterial diseases in a low-resource country* [dissertation]. Antwerp, University of Antwerp, 2009.



---

---

# ANNEXES



# ANNEXES

## ANNEXE I: RECUEIL DES ÉCHANTILLONS CLINIQUES

Pour tous les échantillons cliniques, il faudra recueillir les informations cliniques pertinentes pour chaque patient, à l'aide du formulaire UB 03 élaboré par l'OMS (voir [http://www.who.int/buruli/control/FR\\_UB\\_03.pdf](http://www.who.int/buruli/control/FR_UB_03.pdf) ou l'*Annexe 9*). Dans la présente section, nous allons traiter uniquement de la collecte des échantillons pour le diagnostic en routine des cas ou des patients. De nos jours, les biopsies chirurgicales et les biopsies à l'emporte-pièce sont réservées à certaines indications (voir *Annexe 10*).

### I.1 PROCÉDURE DE PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLON PAR ASPIRATION À L'AIGUILLE FINE

Utiliser la technique d'aspiration appropriée permet avec certitude d'obtenir une quantité suffisante de tissu. La technique optimale est expliquée et illustrée par des photos et des vidéos dans le guide d'apprentissage étape par étape sur l'aspiration à l'aiguille fine (AAF) et le prélèvement par écouvillon, consultable sur le site Web du consortium Stop Buruli<sup>1</sup>.

#### I.1.1 MATÉRIEL POUR L'AAF

On a besoin du matériel suivant :

1. une seringue de 10 ml et des aiguilles de calibre 21, 22 ou 23 ;
2. des microtubes avec du milieu de transport liquide ; le milieu de transport utilisé dépend du laboratoire et du type d'analyse pratiqué ; autrement dit, du fait que l'échantillon sera mis en culture, ou testé uniquement par PCR (Polymerase Chain Reaction). Les échantillons qui seront utilisés uniquement pour la PCR peuvent être placés dans une solution d'alcool et d'eau distillée (en proportions 1:1), dans du tampon phosphate (PBS), ou dans du tampon TE (chlorhydrate de trisaminométhane [Tris] 10 mM plus acide éthylènediaminotétracétique [EDTA] 1 mM) ;
3. des lames de verre ;
4. un crayon à papier et un marqueur à encre indélébile ;
5. des gants en latex stériles à usage unique ;
6. des boules de coton ;
7. de l'alcool à désinfecter ;
8. du matériel de pansement.

Assurez-vous que tout est prêt avant de continuer :

- étiquetez les lames de verre avec un crayon à papier (en indiquant le numéro d'identification du patient et la date) ;
- étiquetez les microtubes avec un marqueur à encre indélébile (en indiquant le numéro d'identification du patient et la date).

#### I.1.2 MÉTHODES

Votre environnement de travail doit être aussi propre que possible.

Recueillez les antécédents médicaux du patient et réalisez l'examen clinique. Expliquez au patient ce que vous allez faire. Dites au patient que vous avez besoin de réaliser un test appelé aspiration à l'aiguille

<sup>1</sup> <http://www.stopburuli.org/index.php/fr/FNA-e-tutorial.html>

fine, pour déterminer la cause de la lésion (nodule, plaque, œdème ou ulcère) et pouvoir administrer le traitement approprié. Expliquez-lui que vous allez introduire une fine aiguille dans la lésion. La procédure pourra être légèrement douloureuse mais prendra moins d'une minute. Dites au patient que vous allez recueillir deux échantillons afin d'augmenter les chances de découvrir ce qui cause ses symptômes.

Expliquez que si les résultats du test sont négatifs, il faudra peut-être refaire un autre test 1 ou 2 semaines plus tard, parce qu'on a parfois besoin de plus d'un test pour obtenir des résultats exacts. Demandez au patient s'il a des questions.

L'assistant(e) doit avoir préparé un plateau avec des compresses ou des boules de coton imbibées d'alcool, une aiguille de calibre G 21, 22 ou 23 encapuchonnée sur laquelle est adaptée une seringue, un morceau de compresse sec, un sparadrap et un flacon pour échantillon qui a été obtenu auprès du laboratoire.

Avant de réaliser l'aspiration, enfiler des gants stériles pour vous protéger et protéger le patient. Assurez-vous de ne rien toucher qui pourrait contaminer vos mains gantées.

Nettoyez avec soin la lésion avec des compresses ou des boules de coton imbibées d'alcool. Assurez-vous de bien désinfecter la surface de la lésion, en badigeonnant plusieurs fois sur la peau de haut en bas. Palpez doucement la lésion. Localisez l'endroit où le tissu est le plus mou, ou estimez la position du centre de la lésion. Ce sera le site où vous allez insérer l'aiguille. Vous pouvez utiliser le marqueur pour délimiter la lésion et marquer le point où vous allez introduire l'aiguille.

Prenez la seringue et enlevez délicatement son capuchon. Insérez l'aiguille dans la lésion, et faites doucement pénétrer l'aiguille dans le tissu sous-cutané. Une fois l'aiguille à l'intérieur du tissu, aspirez complètement afin de créer une pression négative. Faites bouger lentement la seringue d'avant en arrière tout en maintenant la pression d'aspiration. Modifiez trois fois l'angle de l'aiguille, puis relâchez doucement l'aspiration. Veillez à ne pas aspirer de sang d'un vaisseau sanguin pendant l'opération. Le patient peut ressentir un peu d'inconfort, vous aurez donc besoin de surveiller sa réaction et de le rassurer si nécessaire.

Retirez l'aiguille et appliquez un morceau de compresse sec pour arrêter un éventuel saignement. Réexaminez le site de ponction. Si le saignement persiste, appliquez un deuxième morceau de compresse sec et un sparadrap.

Videz doucement le contenu de l'aiguille dans le flacon fourni par le laboratoire, étiquetez les microtubes avec un marqueur à encre indélébile (en indiquant le numéro d'identification du patient et la date).

**N.B.** Pour aspirer les bactéries, l'aiguille doit pénétrer à travers le tissu sous-cutané jusqu'au tissu adipeux. C'est à cet endroit que se situent les bactéries dans les lésions non ulcéraives.

Assurez-vous que seul le bout de l'aiguille (environ 1 cm) pénètre dans le tissu sous-cutané. Si l'aiguille est insérée trop profondément, elle pénétrera au-delà du tissu sous-cutané et de l'aponévrose. Utilisez une nouvelle aiguille et une nouvelle seringue si vous avez besoin de prélever un deuxième échantillon.

**N.B.** Seuls des médecins expérimentés ou des agents de santé expérimentés devraient pratiquer l'AAF ; les agents de santé doivent être suffisamment formés (formation continue) et encadrés pour pouvoir améliorer leurs compétences.

### 1.1.3 TRAITEMENT D'UN ÉCHANTILLON OBTENU PAR AAF

S'il est possible de réaliser un examen au microscope sur place, une goutte de l'aspirât est déposée sur une lame de verre (*Annexe 4*). Le reste est expulsé dans le milieu de transport liquide (*Annexe 2*).

Aspirez délicatement un peu de milieu de transport liquide dans l'aiguille puis éjectez-le dans le microtube. Pour être sûr que tout l'échantillon a été transféré, recommencez cette opération trois fois. Bouchez ensuite le microtube.

Faites attention à ne pas vous blesser avec l'aiguille. Jetez la seringue et l'aiguille dans une boîte collectrice d'aiguilles. L'échantillon (accompagné d'un formulaire UB O3 correctement rempli) doit être envoyé dès que possible au laboratoire le plus proche.

**N.B.** Dans certains types de lésions, notamment les plaques, l'aspiration peut avoir l'air d'un « tube sec » (c'est-à-dire qu'il peut sembler n'y avoir aucun aspirât visible dans la seringue). Malgré cela, certaines cellules auront été prélevées par l'aspiration.

## 1.2 PROCÉDURE DE PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLON PAR ÉCOUVILLON

Le prélèvement par écouvillonnage est une procédure simple, mais qui doit d'abord être expliquée au patient.

### 1.2.1 MATÉRIEL POUR L'ÉCOUVILLONNAGE

On a besoin du matériel suivant :

1. de l'alcool pour nettoyer la peau ;
2. un écouvillon imprégné d'alcool (un morceau de boule de coton ou de compresse plongé dans l'alcool) ;
3. un écouvillon stérile sur un applicateur en bois ou en plastique ;
4. des gants en latex propres à usage unique ;
5. un marqueur indélébile ;
6. du milieu de transport ; le milieu de transport utilisé dépend du laboratoire et du type d'analyse pratiqué ; autrement dit, du fait que l'échantillon sera mis en culture, ou testé uniquement par PCR.

### 1.2.2 MÉTHODES

Votre environnement de travail doit être aussi propre que possible.

Recueillez les antécédents médicaux du patient et réalisez l'examen clinique. Expliquez au patient ce que vous allez faire. Dites au patient que vous avez besoin de prélever une petite quantité de tissu de l'ulcère pour déterminer la cause de la maladie et pouvoir administrer le traitement approprié. Expliquez que vous allez vous servir d'un petit bout de coton sec sur un applicateur pour passer doucement le coton sous les bords de l'ulcère, afin de recueillir un peu de tissu. Dites au patient que vous allez recueillir deux échantillons afin d'augmenter les chances de découvrir ce qui cause ses symptômes. La procédure pourra être légèrement désagréable mais prendra moins d'une minute.

Expliquez-lui que si les résultats du test sont négatifs, il faudra peut-être refaire un autre test 1 ou 2 semaines plus tard, parce qu'on a parfois besoin de plus d'un test pour obtenir des résultats exacts. Demandez au patient s'il a des questions.

Demandez à votre assistant(e) de préparer un simple plateau avec un marqueur à encre indélébile, un coton-tige, un microtube avec du milieu de transport semi-solide, des gants en latex propres à usage unique, et un morceau de coton trempé dans de l'alcool ou un désinfectant. Avant d'effectuer l'écouvillonnage, enfiler des gants propres pour vous protéger et protéger le patient. Assurez-vous de ne rien toucher qui pourrait contaminer vos mains gantées.

À l'aide du coton imprégné d'alcool ou de désinfectant, nettoyez soigneusement deux fois la peau qui entoure l'ulcère, en évitant la base de l'ulcère.

Prenez le coton monté sur l'applicateur, et insérez-le délicatement sous les bords de l'ulcère. Faites rouler l'écouvillon et frottez les tissus situés sous les bords de l'ulcère, dans un mouvement de va-et-vient et dans le sens des aiguilles d'une montre. Introduisez délicatement l'écouvillon dans le tube stérile, et étiquetez le tube en indiquant le nom, l'âge et le sexe du patient ainsi que la date d'obtention de l'échantillon.

### 1.3. RESSOURCES SUPPLÉMENTAIRES

Une documentation plus détaillée est consultable sur les sites Web du consortium Stop Buruli<sup>1</sup> et de BuruliVac<sup>2</sup>.

---

<sup>1</sup> <http://www.stopburuli.org/index.php/fr/FNA-e-tutorial.html>

<sup>2</sup> <http://www.burulivac.eu/index.php?id=17923>

## ANNEXE 2: MILIEUX DE TRANSPORT UTILISÉS EN VUE D'ANALYSES BACTÉRIOLOGIQUES

Plusieurs milieux de transport sont recommandés pour les analyses bactériologiques (à savoir, l'examen direct de frottis, la culture et l'amplification génique par PCR) : un milieu de transport liquide pour l'AAF, un milieu de transport semi-solide pour les écouvillons et les biopsies, et un milieu de transport polymyxine B, amphotéricine B, acide nalidixique, triméthoprime et azlocilline (PANTA), utilisable pour tous les types d'échantillons.

Si seule une analyse PCR doit être effectuée sur l'échantillon, les solutions suivantes sont également utilisables : du tampon phosphate (PBS, voir l'Annexe 5 pour la préparation), du tampon TE (Tris chlorhydrate 10 mM plus EDTA 1 mM, pH 8,0), une solution de lyse cellulaire (par exemple, commercialisée par Qiagen), ou une solution d'alcool et d'eau distillée en proportions 1:1.

### 2.1 MILIEU DE TRANSPORT LIQUIDE

Les étapes permettant de préparer 200 ml de milieu de transport liquide sont données ci-dessous.

**Bouillon de base de Dubos** (numéro de produit Becton Dickinson : 238510)

1. Ajouter 1,3 g de bouillon de base de Dubos à 180 ml d'eau distillée.
2. Chauffer pour dissoudre.
3. Stériliser à 121-124 °C pendant 15 minutes avec un bouchon à vis desserré.
4. Laisser refroidir en dessous de 50 °C.
5. Ajouter dans des conditions d'asepsie 20 ml d'un supplément à base d'acide oléique, d'albumine, de dextrose et de catalase (OADC) (voir ci-dessous pour la préparation).
6. Ajouter dans des conditions d'asepsie 5 ml de PANTA (voir ci-dessous pour la préparation).
7. Incuber le milieu complet à 37 °C pendant 24 heures pour vérifier sa stérilité.
8. Répartir 1 ml dans des flacons stériles de 2 ml.

Les étapes permettant de préparer 1 litre de supplément OADC sont données ci-dessous.

#### Supplément OADC

1. Ajouter 0,6 ml d'acide oléique à 50 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0,05 N.
2. Agiter pendant environ 30 minutes.
3. Ajouter 50 g de fraction V de sérumalbumine bovine (numéro de produit Acros Organics : 94349-60-7).
4. Ajouter 920 ml d'eau distillée.
5. Ajouter 15 ml de glucose.
6. Agiter pour dissoudre pendant environ 2 heures.
7. Ajuster le pH à 6-7.
8. Filtrer.
9. Incuber pendant 24 heures à 37 °C pour tester la stérilité du supplément.

**N.B.** Il est également possible d'utiliser le tube avec indicateur de croissance mycobactérienne BBL de Becton Dickinson (également connu sous le nom de MGIT) additionné du supplément d'enrichissement OADC et du mélange d'antibiotiques PANTA (numéro de produit : 245116). Le PANTA lyophilisé est prêt à l'emploi après reconstitution.

Les étapes permettant de préparer 5 ml de supplément antimicrobien PANTA sont données ci-dessous.

**PANTA** (Becton Dickinson, numéro de produit : 442188)

1. Mettre 5 ml d'eau distillée dans 1 flacon de PANTA lyophilisé.
2. Ajouter au milieu de Dubos dans des conditions d'asepsie.

**N.B.** Le milieu de transport liquide peut se conserver à 2-8 °C pendant un maximum de 6 mois.

## 2.2 MILIEU DE TRANSPORT SEMI-SOLIDE

Les étapes permettant de préparer 200 ml de milieu de transport semi-solide sont données ci-dessous.

**Bouillon de base de Dubos** (numéro de produit Becton Dickinson : 238510)

1. Ajouter 1,3 g de bouillon de base de Dubos à 180 ml d'eau distillée.
2. Ajouter 1,0 g de gélose [concentration finale, 0,5 % de gélose].
3. Chauffer pour dissoudre.
4. Stériliser à 121-124 °C pendant 15 minutes avec un bouchon à vis desserré.
5. Laisser refroidir en dessous de 50 °C.
6. Ajouter dans des conditions d'asepsie 20 ml de supplément OADC (voir section 2.1 pour la préparation).
7. Ajouter dans des conditions d'asepsie 5 ml de PANTA (voir section 2.1 pour la préparation).
8. Incuber le milieu complet à 37 °C pendant 24 heures pour vérifier sa stérilité.
9. Répartir 1 ml dans des tubes stériles de 2 ml.

**N.B.** Le milieu de transport semi-solide peut se conserver à 2-8 °C pendant un maximum de 6 mois.

## 2.3 Milieu de transport PANTA

Les étapes permettant de préparer 246 ml de milieu de transport PANTA sont données ci-dessous.

**Bouillon de base de Dubos** (numéro de produit Becton Dickinson : 238510)

1. Dissoudre 1,5 g de bouillon de base de Dubos dans 204 ml d'eau distillée. Il n'est pas nécessaire de chauffer.
2. Stériliser à 121-124 °C pendant 15 minutes avec un bouchon à vis desserré.
3. Laisser refroidir en dessous de 50 °C.
4. Filtrer du glycérol [1,2,3-propanetriol] sur une unité filtrante stérile pour flacons de type Bottle Top [cette opération prend du temps à cause de la viscosité du glycérol].
5. Ajouter au bouillon, dans des conditions d'asepsie, 12 ml du glycérol stérilisé par filtration.

**Albumine pour milieu de Dubos** (numéro de produit Becton Dickinson : 230910)

1. Ajouter au bouillon stérile, dans des conditions d'asepsie, 24 ml d'albumine pour milieu de Dubos.

**PANTA** (Becton Dickinson numéro de produit : 245114)

1. Dissoudre deux flacons de PANTA lyophilisé en ajoutant 3 ml d'eau distillée dans chaque.
2. Ajouter au mélange Dubos-glycérol, dans des conditions d'asepsie, les 6 ml du PANTA dissous.
3. Incuber le milieu de transport PANTA pendant 24 heures à 37 °C pour tester sa stérilité.
4. Ajouter dans des conditions d'asepsie 500 µl de milieu de transport PANTA dans des tubes stériles de 2 ml, ce qui permet de préparer des récipients de transport prêts à l'emploi.

**N.B.** Le milieu de transport PANTA peut se conserver à 2-8 °C pendant un maximum de 6 mois.

### ANNEX 3: PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS EN VUE D'ANALYSES BACTÉRIOLOGIQUES

On recommande les approches suivantes.

#### 3.1 ASPIRATION À L'AIGUILLE FINE

1. Ensemencer l'AAF dans le milieu de transport approprié (*Annexe 2*) de la manière décrite à l'*Annexe 1*.
2. Bien mélanger au Vortex.

#### 3.2. ÉCOUVILLONS

1. Cassez l'extrémité d'un écouvillon et placer celle-ci dans un flacon ou un tube de 5 ml contenant des billes de verre, ou dans un tube contenant du milieu de transport.
2. Mettre en suspension les écouvillons dans un petit volume de tampon phosphate ou de sérum physiologique ; le volume nécessaire dépend du nombre de tests à effectuer.  
**N.B.** Les écouvillons maintenus dans du milieu de transport semi-solide doivent d'abord être retirés du milieu puis placés dans du tampon phosphate ou du sérum physiologique.
3. Bien mélanger au Vortex.

#### 3.3 ÉCHANTILLONS DE TISSUS PROVENANT D'UNE BIOPSIE À L'EMPORTE-PIÈCE OU D'UNE BIOPSIE CHIRURGICALE

1. Découper le tissu (frais ou dans du milieu de transport) en petits morceaux (par exemple dans une boîte de Pétri) à l'aide d'une lame de bistouri ou d'une paire de ciseaux stérile à usage unique ou stérilisable en autoclave. **N.B.** Si le matériel doit être réutilisé, il doit tout d'abord être plongé dans une solution désinfectante appropriée, puis brossé soigneusement avant d'être stérilisé afin d'éviter les contaminations croisées, notamment pour la PCR. Les désinfectants recommandés sont le glutaraldéhyde alcalin à 2 %, le phénol à 5 %, les désinfectants à base de phénol à 10 % (par exemple : Dettol), l'iode à 10 % ou l'alcool à 70 %.
2. Placer le tissu découpé dans un flacon ou un tube de 5 ml contenant des billes de verre.
3. Ajouter du tampon phosphate ou du sérum physiologique ; le volume nécessaire dépend du nombre de tests à effectuer.
4. Bien mélanger (par exemple avec un agitateur Vortex).

**N.B.** On peut également broyer la biopsie de tissu à l'aide d'un mortier et d'un pilon ou d'un broyeur de Potter, stériles.

**N.B.** Il faut faire soigneusement attention d'éviter les contaminations croisées lorsqu'on nettoie les instruments.

## ANNEXE 4: EXAMEN DIRECT DES FROTTIS

### 4.1 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

#### 4.1.1 AAF (VOIR L'ANNEXE 1 POUR PLUS DE DÉTAILS SUR LE PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS PAR AAF)

1. À l'aide d'un crayon à papier, marquer sur une lame de verre le numéro de série indiqué sur le registre du laboratoire.
2. Détacher délicatement l'aiguille de la seringue.
3. Aspirer doucement un peu d'air dans la seringue, puis reconnecter l'aiguille.
4. Faire avancer le piston de la seringue tout doucement pour éjecter une goutte de l'aspirât sur une lame de verre.
5. Préparer un frottis de l'aspirât sur la lame marquée, sécher à l'air, puis fixer à la chaleur en faisant passer la lame à travers une flamme trois fois de suite.

#### 4.1.2 ÉCOUVILLONS

1. À l'aide d'un crayon à papier, marquer sur une lame de verre le numéro de série indiqué sur le registre du laboratoire.
2. Placer l'écouvillon dans un flacon ou un tube de 5 ml contenant des billes de verre.
3. Ajouter 2 ml de tampon phosphate (PBS).
4. Bien mélanger au Vortex.
5. Préparer un frottis de la suspension sur la lame marquée, sécher à l'air, puis fixer à la chaleur en faisant passer la lame à travers une flamme trois fois de suite.

**N.B.** Si l'on ne dispose pas de billes de verre, ni d'agitateurs Vortex, on peut également préparer un frottis comme suit :

1. marquage d'une lame de verre ;
2. dépôt d'une goutte d'eau physiologique sur la lame ;
3. essuyage de l'écouvillon dans l'eau physiologique ;
4. séchage à l'air et fixation à la chaleur en faisant passer la lame à travers une flamme trois fois de suite.

#### 4.1.3 TISSU

1. À l'aide d'un crayon à papier, marquer sur une lame de verre le numéro de série indiqué sur le registre du laboratoire.
2. Préparer un frottis de la suspension sur la lame, sécher à l'air, puis fixer à la chaleur en faisant passer la lame à travers une flamme trois fois.

**N.B.** On peut également préparer les frottis directement à partir du tissu sans le broyer (13).

### 4.2 COLORATION DE ZIEHL-NEELSEN

En général, la méthode utilisée localement pour le diagnostic en laboratoire de la tuberculose peut également être utilisée pour diagnostiquer la maladie causée par *Mycobacterium ulcerans*. Dans la plupart des cas, il s'agira de la méthode de coloration de Ziehl-Neelsen à chaud. Le résultat du nombre de BAAR observés dans un frottis devra être exprimé à l'aide des mêmes échelles de cotation que celles utilisées localement pour l'examen des frottis de crachats servant au dépistage de la tuberculose.

Les réactifs décrits ci-dessous sont strictement réservés à la méthode de Ziehl-Neelsen à chaud. La méthode à chaud est supérieure aux méthodes à froid, telles que la coloration de Kinyoun.

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

#### 4.2.1 RÉACTIFS

Les étapes permettant de préparer les réactifs sont données ci-dessous.

##### 4.2.1.1 Solution de coloration à base de fuchsine phéniquée à 1 %

Cristaux de phénol	50 g
Éthanol ou méthanol à 95 %	100 ml
Eau distillée	50 ml
Fuchsine basique	10 g
Eau distillée	800 ml

La meilleure façon de préparer une solution de fuchsine phéniquée (1 litre) est la suivante :

1. Mélanger 100 ml d'alcool (éthanol ou méthanol à 95 %) avec 50 g de phénol dans un erlenmeyer de 1 litre au minimum.
2. Ajouter environ 50 ml d'eau distillée, mélanger à nouveau.
3. Ajouter 10 g de fuchsine basique en poudre, mélanger jusqu'à dissolution complète.
4. Ajouter 800 ml d'eau distillée, bien mélanger (par exemple par transfert à plusieurs reprises dans un second erlenmeyer de 1 litre si l'on ne dispose pas d'un volume plus grand). Un agitateur magnétique peut s'avérer utile. Il n'est pas nécessaire de chauffer.
5. Conserver dans un flacon en verre teinté et hermétiquement bouché.
6. Étiqueter le flacon en indiquant le nom du réactif (fuchsine phéniquée) et les dates de préparation et d'expiration.
7. Filtrer à l'avance ou extemporanément.

**N.B.** Ce réactif peut se conserver à température ambiante à l'abri de la lumière solaire directe pendant 12 mois. Les autres modes de préparation de cette solution ne donnent pas toujours de bons résultats et ne sont pas recommandés.

##### 4.2.1.2 Solution de décoloration

Éthanol à 70 % (qualité technique)	97 ml
Acide chlorhydrique (HCl) concentré	3 ml

1. Ajouter avec précaution l'acide chlorhydrique concentré à l'éthanol à 70 %.
2. Il faut toujours verser doucement l'acide dans l'alcool et non l'inverse.
3. Conserver dans un flacon en verre teinté.
4. Étiqueter le flacon en indiquant le nom du réactif (solution de décoloration ou acide-alcool) et la date de préparation.

**Mise en garde :** l'acide chlorhydrique (HCl) est un produit irritant et doit être manipulé avec précaution.  
**N.B.** La solution de décoloration peut être conservée à température ambiante pendant très longtemps.

### 4.2.1.3 Colorant de contraste

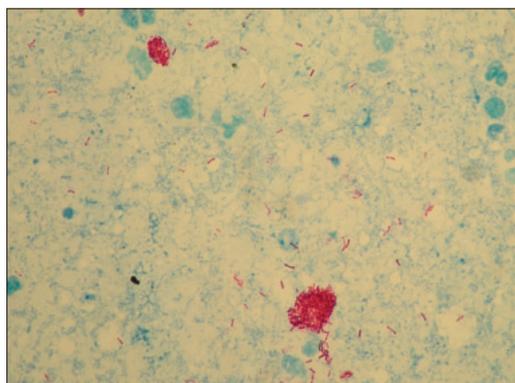
Chlorure de bleu de méthylène	0,1 g
Eau distillée	100 ml

1. Dissoudre le chlorure de bleu de méthylène dans l'eau distillée dans un flacon en verre teinté et hermétiquement bouché.
2. Étiqueter le flacon en indiquant le nom du réactif (solution de bleu de méthylène) et les dates de préparation et d'expiration.

**N.B.** Le colorant de contraste peut se conserver à température ambiante pendant 12 mois.

La *Figure 28* montre une coloration ZN d'un frottis sur lequel les BAAR apparaissent sous forme de bâtonnets rouges sur fond bleu.

**FIGURE 28. COLORATION ZIEHL-NEELSEN D'UN FROTTIS D'UNE LÉSION D'UN ULCÈRE DE BURULI**



Les BAAR extracellulaires apparaissent en rouge sur fond bleu. (Avec l'aimable autorisation de Marcus Beissner)

### 4.2.2 MÉTHODE

Préparer un frottis (ni trop épais ni trop fin) à partir de la suspension obtenue après avoir préparé l'échantillon de la manière indiquée à l'*Annexe 3*. Un frottis qui convient signifie que l'on doit pouvoir lire un texte imprimé à travers le frottis non coloré placé à une certaine distance du texte.

1. Placer des lots de lames étiquetées sur des portoirs à coloration, avec au maximum 12 lames par lot. Veiller à ce que les lames ne se touchent pas.
2. Recouvrir tout le frottis avec la fuchsine phéniquée filtrée ; le plus simple pour ce faire est de verser le colorant sur la lame au moyen d'un entonnoir muni d'un papier-filtre.
3. Chauffer doucement chaque lame jusqu'à ce que des vapeurs s'en dégagent ; chauffer pendant 15 minutes. Le colorant ne doit ni sécher, ni bouillir à aucun moment.
4. Rincer doucement à l'eau courante jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de colorant libre sur la lame.
5. Verser sur la lame la solution de décoloration et laisser 3 minutes en contact.
6. Rincer soigneusement la lame à l'eau. Éliminer l'excès d'eau sur la lame.
7. Recommencer les étapes 5 et 6 si le frottis est resté trop rouge.
8. Verser le colorant de contraste sur la lame.
9. Laisser agir ; en général la coloration de contraste prend au maximum 60 secondes.
10. Rincer soigneusement les lames à l'eau. Éliminer l'excès d'eau sur les lames.

11. Laisser les frottis sécher à l'air. Ne pas employer de buvard. Garder les lames à l'abri de la lumière solaire directe. Les examiner le plus rapidement possible à l'oculaire x8 ou x10 et l'objectif x100 d'un microscope optique et à immersion d'huile (grossissement x800 ou x1000).
12. Après lecture des lames, enlever l'huile à immersion en la laissant imprégner un mouchoir en tissu ou du papier toilette. Conserver les lames dans des boîtes.

#### 4.2.3 ÉCHELLE DE COTATION POUR LA COLORATION ZIEHL–NEELSEN EN MICROSCOPIE

Nombre de BAAR observés en moyenne	Nombre de champs à examiner	Résultat
0 pour 100 champs à immersion	100	Aucun BAAR observé
11-9 pour 100 champs à immersion <sup>a</sup>	100	Noter le nombre exact
10-99 pour 100 champs à immersion	100	+
1-10 par champ à immersion	50	++
> 10 par champ à immersion <sup>b</sup>	20	+++

BAAR, bacilles acido-alcoolo résistants

<sup>a</sup> Un résultat inférieur à 3 bacilles pour 100 champs risque de ne pas être suivi de la positivité de la culture, mais doit être signalé.

<sup>b</sup> *Mycobacterium ulcerans* forme souvent des amas de BAAR très denses qui sont trop nombreux pour être dénombrés avec exactitude. Quand on observe des BAAR en nombres très élevés, le résultat à noter est « +++ ».

### 4.3 COLORATION AU FLUOROCHROME

Certains laboratoires utilisent la microscopie à fluorescence avec l'auramine O pour diagnostiquer la tuberculose. La microscopie à fluorescence est indiquée lorsque le nombre d'échantillons journaliers à analyser dépasse les 30 échantillons par technicien de laboratoire. Il a été démontré que les colorants Ziehl–Neelsen ou auramine O permettent d'obtenir des résultats équivalents pour détecter *M. ulcerans* (13).

#### 4.3.1 RÉACTIFS

Les étapes permettant de préparer les réactifs sont données ci-dessous.

##### 4.3.1.1 Solution de coloration

###### *Auramine O (solution 1)*

Auramine en poudre	0,1 g
Éthanol à 95 % (qualité technique)	10 ml

Dissoudre l'auramine dans l'éthanol.

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

###### *Phénol (solution 2)*

Phénol en cristaux	3,0 g
Eau distillée	87 ml

Dissoudre les cristaux de phénol dans l'eau.

1. Mélanger ensemble la **solution 1** et la **solution 2**.
2. Conserver dans un flacon en verre teinté et hermétiquement bouché, à l'abri de la chaleur et de la lumière.
3. Étiqueter le flacon en indiquant le nom du réactif (auramine O) et les dates de préparation et d'expiration.

**N.B.** La solution peut se conserver à température ambiante dans une armoire fermée pendant un maximum de 3 mois.

**N.B.** On observe habituellement la formation d'un précipité qui n'est cependant pas un signe de dégradation ; il faut néanmoins filtrer la solution avant de l'employer pour les colorations.

#### 4.3.1.2 Solution de décoloration

Éthanol à 70 % (qualité technique)	100 ml
HCl concentré	0,5 ml

1. Ajouter avec précaution l'acide chlorhydrique concentré à l'éthanol à 70 %.
2. Il faut toujours verser doucement l'acide dans l'alcool et non l'inverse.
3. Conserver dans un flacon en verre teinté.
4. Étiqueter le flacon en indiquant le nom du réactif (solution de décoloration ou acide-alcool) et la date de préparation.

**N.B.** La solution de décoloration se conserve sans limitation de durée.

#### 4.3.1.3 Colorant de contraste

Permanganate de potassium ( $\text{KMnO}_4$ )	0,5 g
Eau distillée	100 ml

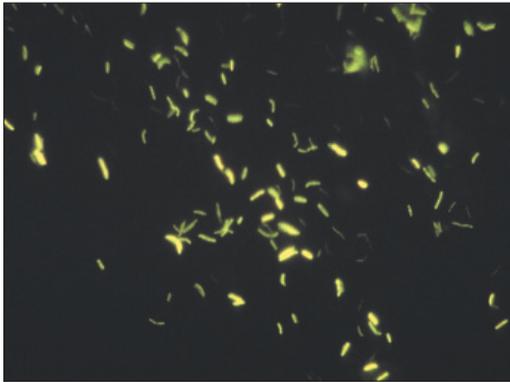
1. Dissoudre le permanganate de potassium ( $\text{KMnO}_4$ ) dans l'eau distillée dans un flacon en verre teinté et hermétiquement bouché.
2. Étiqueter le flacon en indiquant le nom du réactif (permanganate de potassium) et les dates de préparation et d'expiration.

**N.B.** La solution peut se conserver à température ambiante pendant un maximum de 3 mois.

**N.B.** La solution de  $\text{KMnO}_4$  à 0,5 % donne un fond très sombre, ce qui rend difficile la mise au point sur le frottis. À des concentrations plus faibles, elle n'est pas aussi sombre, mais ces solutions plus faibles sont alors instables et peu de laboratoires les utilisent.

La *Figure 29* est une coloration d'un frottis avec un fluorochrome (auramine O) ; les BAAR apparaissent sous forme de bâtonnets jaune vif sur fond sombre.

FIGURE 29. COLORATION D'UN FROTTIS AVEC UN FLUOROCHROME [AURAMINE O]



Les BAAR apparaissent sous forme de bâtonnets jaune vif sur fond sombre. (Avec l'aimable autorisation de Alfred Michael Emmerson)

#### 4.3.2 MÉTHODE

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

1. Placer les frottis étiquetés sur un portoir à coloration (par lots de 12 au maximum). Veiller à ce que les lames ne se touchent pas.
2. Verser le colorant sur les lames, à l'aide d'un entonnoir muni d'un papier-filtre Whatman n° 1. Faire en sorte que tout le frottis soit recouvert d'auramine O.
3. Laisser en contact 15 minutes en veillant à ce que la solution de coloration reste bien sur les frottis. **N.B.** Ne pas chauffer les lames.
4. Rincer à l'eau puis éliminer le liquide. On recommande habituellement l'eau distillée, mais il risque souvent de ne pas y en avoir sur le terrain. L'expérience de certains laboratoires a montré que l'eau du robinet donnait toujours satisfaction. L'eau déchlorée (par exposition à l'air libre pendant 24 heures) représente une autre possibilité.
5. Décolorer pendant 2 minutes avec la solution d'acide-alcool à 0,5 %.
6. Rincer à l'eau puis éliminer le liquide.
7. Recouvrir les frottis de colorant de contraste pendant 2 minutes. Il est essentiel de respecter ce temps, car un contact plus long risque d'altérer la fluorescence des BAAR.
8. Rincer à l'eau puis éliminer le liquide.
9. Laisser les frottis sécher à l'air. Ne pas employer de buvard. Examiner les lames le plus rapidement possible à un grossissement x200-250 (oculaire x20 ou x25 et objectif x10).
10. Après les avoir lues, conserver les lames dans l'obscurité (c'est-à-dire dans une boîte à lames fermée).

### 4.3.3 ÉCHELLE DE COTATION POUR LA MICROSCOPIE À FLUORESCENCE

Le nombre de BAAR indique l'infectiosité du patient. Il est donc important de noter exactement ce que vous observez.

Ce que vous observez (x200)	Ce que vous observez (x400)	Ce qu'il faut noter
Aucun BAAR sur une longueur	Aucun BAAR sur une longueur	Aucun BAAR observé
1-4 BAAR sur une longueur	1-2 BAAR sur une longueur	Confirmation requise*
5-49 BAAR sur une longueur	3-24 BAAR sur une longueur	Rare
3-24 BAAR dans un champ	1-6 BAAR dans un champ	+
25-250 BAAR dans un champ	7-60 BAAR dans un champ	++
> 250 BAAR dans un champ	> 60 BAAR dans un champ	+++

\*Confirmation par un autre technicien requise ou préparation d'un autre frottis, à colorer et lire.

## ANNEXE 5 : CULTURE IN VITRO DE *MYCOBACTERIUM ULCERANS*

La culture in vitro de *M. ulcerans* comporte quatre étapes :

1. la préparation de l'échantillon ;
2. la décontamination de l'échantillon (pour éliminer les micro-organismes contaminants) ;
3. l'ensemencement et l'incubation sur du milieu de Löwenstein–Jensen, de Brown et Buckle ou milieu d'Ogawa ;
4. l'identification de *M. ulcerans*.

### 5.1 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Utiliser les suspensions préparées de la manière indiquée dans l'*Annexe 3*.

### 5.2 DÉCONTAMINATION DES ÉCHANTILLONS

Le choix de la méthode de décontamination, parmi toutes celles existantes, revient au laboratoire et dépendra du degré de contamination des cultures au laboratoire.

#### 5.2.1 MÉTHODE À L'ACIDE OXALIQUE

##### 5.2.1.1 Réactifs

*Solution de digestion (solution de NaOH à 4 %)*

Pastilles de NaOH (pour analyse)	20 g
Eau distillée	500 ml

1. Peser 20 g de pastilles de NaOH.
2. Dissoudre dans 500 ml d'eau distillée dans une bouteille de 500 ml.
3. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes avec un bouchon à vis desserré.
4. Une fois la solution refroidie, revisser le bouchon.

**N.B.** La solution de digestion peut se conserver à 2-8 °C pendant un maximum de 6 mois.

*Solution de tampon phosphate (PBS)*

Tampon phosphate	1 comprimé
Eau distillée	100 ml

1. Dissoudre 1 comprimé de tampon phosphate dans 100 ml d'eau distillée.
2. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes avec un bouchon à vis desserré.
3. Une fois la solution refroidie, revisser le bouchon.

**N.B.** La solution de tampon phosphate peut se conserver à 2-8 °C pendant un maximum de 12 mois.

**Solution de vert malachite à 0,2 %**

Vert malachite	200 mg
Eau distillée	100 ml

1. Dissoudre 200 mg de vert malachite dans 100 ml d'eau distillée.
2. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes avec un bouchon à vis desserré.
3. Une fois la solution refroidie, revisser le bouchon.

**N.B.** Cette solution peut se conserver à 2-8 °C pendant un maximum de 12 mois.

**Solution d'acide oxalique à 5 %**

Acide oxalique	5 g
Eau distillée	100 ml

1. Dissoudre 5 g d'acide oxalique dans 100 ml d'eau distillée.
2. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes avec un bouchon à vis desserré.
3. Une fois la solution refroidie, revisser le bouchon.

**N.B.** Cette solution peut se conserver à 2-8 °C pendant un maximum de 12 mois.

**Solution de cycloheximide (actidione) à 0,8 %**

Cycloheximide	0,4 g
Eau distillée	50 ml

1. Peser 0,4 g de cycloheximide.
2. Dissoudre le cycloheximide dans 50 ml d'eau distillée.
3. Stériliser à l'autoclave avec un bouchon à vis desserré.
4. Une fois la solution refroidie, revisser le bouchon.

**N.B.** Cette solution peut se conserver à 2-8 °C pendant un maximum de 12 mois.

**5.2.1.2 Méthode**

**N.B.** Il faut effectuer toutes les manipulations dans des conditions stériles afin d'éviter la contamination des réactifs et des échantillons.

**N.B.** Mettre des gants, et travailler dans une enceinte de sécurité biologique.

1. Placer du papier absorbant sur la surface de travail de l'enceinte de sécurité et imbiber le papier avec une solution désinfectante appropriée, telle qu'une solution de désinfectant à base de phénol à 10 % (par ex., Dettol). **N.B.** Toutes les manipulations de matériel contaminé doivent être effectuées sur ce papier pour éviter les éclaboussures de gouttes, et pour pouvoir essuyer et désinfecter immédiatement tout liquide renversé.

2. Mettre l'échantillon dans un récipient de 50 ml, tel qu'un tube Falcon (par exemple des tubes commercialisés par Greiner Bio-One ou Becton Dickinson), et ajouter les réactifs suivants en faisant attention à ne pas toucher le tube si la même pipette doit servir pour plus d'un tube.
  - a. 5 ml de solution de vert malachite à 0,2 %
  - b. 5 ml de solution de digestion de NaOH 1 N
  - c. 1 ml de solution de cycloheximide à 0,8 %.
3. Mélanger au Vortex, puis laisser 30 minutes à température ambiante.
4. Centrifuger pendant 15 minutes à température ambiante à 3500 x g.
5. Éliminer le surnageant dans un récipient à déchets liquides.
6. Ajouter 10 ml de solution d'acide oxalique à 5 % au produit sédimenté.
7. Laisser 20 minutes à température ambiante.
8. Centrifuger pendant 15 minutes à température ambiante à 3500 x g.
9. Éliminer le surnageant dans un récipient à déchets liquides.
10. Remettre en suspension le culot obtenu après décontamination, en y versant quelques gouttes d'eau distillée stérile, et en mélangeant manuellement à la pipette ou au Vortex si nécessaire.
11. Ensemencer immédiatement le milieu de culture.

## 5.2.2 MÉTHODE À L'HYDROXYDE DE SODIUM (MÉTHODE DE PETROFF MODIFIÉE)

### 5.2.2.1 Préparation

#### *Solution de NaOH à 4 %*

Pastilles de NaOH (pour analyse)	4 g
Eau distillée	50 ml

1. Dissoudre la soude dans l'eau distillée en chauffant.
2. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

**N.B.** Cette solution se conserve très longtemps et on peut la garder au réfrigérateur, mais ce n'est pas obligatoire.

#### *Eau physiologique stérile*

Pastilles de chlorure de sodium (NaCl) (pour analyse)	0,85 g
Eau distillée stérile	100 ml

1. Dissoudre le chlorure de sodium dans l'eau distillée.
2. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
3. Conserver la solution au réfrigérateur.

**N.B.** Cette solution se conserve très longtemps.

### 5.2.2.2 Méthode

1. Pour 2 ml de suspension préparée à partir de l'échantillon (obtenu à partir d'écouvillon, d'AAF ou de tissu homogénéisé) ajouter 2 ml de solution de NaOH à 4 %.
2. Boucher hermétiquement le récipient et agiter pour la digestion.
3. Laisser reposer 15 minutes à température ambiante ; agiter de temps en temps.
4. Centrifuger à 3000 x g pendant 15 minutes.
5. Éliminer le surnageant.
6. Ajouter 15 ml d'eau physiologique ou distillée stérile, et remettre en suspension le sédiment.
7. Centrifuger à 3000 x g pendant 15 minutes.
8. Éliminer le surnageant. Remettre en suspension le culot obtenu après décontamination, en y versant quelques gouttes d'eau distillée stérile, et en mélangeant manuellement à la pipette ou au Vortex si nécessaire.
9. Ensemencer le milieu de culture.

### 5.2.3 MÉTHODE À LA N-ACÉTYL-L-CYSTÉINE

#### 5.2.3.1 Préparation

*Pour 100 ml de solution de N-acétyl-L-cystéine/NaOH*

Solution de NaOH à 4 % stérile (voir section 5.2.2)	50 ml
Solution de citrate de sodium dihydraté à 2,9 % stérile	50 ml
N-acétyl-L-cystéine	0,5 g

1. Ajouter la solution de citrate de sodium à la solution de soude.
2. Répartir dans des flacons à bouchon à vis.
3. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 20 minutes.
4. Le jour de l'utilisation, ajouter de la N-acétyl-L-cystéine à 1 % dans le flacon, et bien mélanger.

**N.B.** Le réactif final doit être employé dans les 24 heures car la N-acétyl-L-cystéine perd son activité mucolytique si elle est conservée trop longtemps.

*Pour 1 litre de tampon phosphate*

Hydrogénophosphate disodique ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (anhydre)	4,74 g
Dihydrogénophosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (anhydre)	4,54 g
Eau distillée	1000 ml

1. Dissoudre 4,74 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et 4,54 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dans 1000 ml d'eau distillée.
2. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

**N.B.** Le tampon phosphate peut se conserver à température ambiante ou dans un réfrigérateur ; il est stable pendant 6 mois. Le tampon phosphate peut aussi être préparé en utilisant un comprimé de tampon phosphate prêt à l'usage comme décrit dans le point 5.2.1.1.

*Solution de Tween 80 à 5 %*

Le Tween 80 est disponible sous forme de préparation prête à l'emploi.

### 5.2.3.2 Méthode

1. Pour 1 ml de suspension préparée (jusqu'à 10 ml) à partir de l'échantillon (obtenu à partir d'écouvillon, d'AAF, ou de tissu homogénéisé dans un récipient de 50 ml), ajouter la même quantité de solution de N-acétyl-L-cystéine/NaOH.
2. Incuber en agitant à vitesse moyenne pendant 15 minutes à température ambiante.
3. Ajouter 10 ml de tampon phosphate (PBS) stérile.
4. Ajouter 2 gouttes de Tween 80 à 5 %.
5. Centrifuger à 3000 x g pendant 20 minutes.
6. Éliminer le surnageant.
7. Ajouter 1 ml de tampon phosphate stérile et remettre en suspension le sédiment.
8. Ensemencer le milieu de culture.

## 5.3 ENSEMENCEMENT DES MILIEUX DE CULTURE

### 5.3.1 PRÉPARATION DU MILIEU DE LÖWENSTEIN–JENSEN

#### 5.3.1.1 Composants

Le milieu de Löwenstein–Jensen est constitué de trois composants, qui sont préparés séparément puis additionnés pour donner le milieu :

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

#### *La solution de sels minéraux*

[ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ]	2,40 g
Sulfate de magnésium [ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ]	0,24 g
Citrate de magnésium	0,60 g
Asparagine	3,60 g
Fécule de pomme de terre	30,00 g
Glycérol (qualité réactif)	12 ml
Eau distillée	600 ml

1. Dissoudre les ingrédients dans l'ordre indiqué dans le tableau ci-dessus, en les chauffant dans l'eau distillée.
2. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 30 minutes.
3. Laisser refroidir à température ambiante.

**N.B.** Cette solution se conserve très longtemps et doit être gardée au réfrigérateur.

#### *La solution de vert malachite à 2 %*

Colorant vert malachite	2 g
Eau distillée stérile	100 ml

Dans des conditions d'asepsie, dissoudre le colorant dans l'eau distillée stérile en mettant la solution dans une étuve pendant 1 à 2 heures.

**N.B.** Cette solution peut se conserver pendant un maximum de 12 mois, et peut précipiter ou voir sa couleur s'atténuer. Dans les deux cas, jeter la solution et préparer une nouvelle solution.

#### *Les œufs entiers homogénéisés*

1. Nettoyer des œufs de poule frais de moins de sept jours, en les brossant soigneusement à l'eau chaude avec un savon alcalin.
2. Laisser tremper les œufs 30 minutes dans la solution savonneuse.
3. Les rincer soigneusement, puis les immerger 15 minutes dans de l'éthanol à 70 %.

**N.B.** Ne pas oublier de se laver les mains avant de manipuler les œufs propres et secs.

4. Casser les œufs avec une lame stérile dans un récipient stérile, puis les battre avec un fouet ou un mixeur stérile.

**N.B.** Il arrive parfois que les œufs contiennent des antibiotiques inhibant la croissance des mycobactéries. Il faut donc en connaître l'origine pour s'assurer de leur qualité.

#### 5.3.1.2 Préparation du milieu final

Solution de sels minéraux	600 ml
Solution de vert malachite	20 ml
Œufs homogénéisés ( 20-25 œufs )	1000 ml

**N.B.** Un agitateur magnétique stérile peut s'avérer utile pour mélanger les composants.

1. Répartir 6-8 ml du milieu complet avec les œufs dans des flacons de McCartney de 14 ou 28 ml ; ou en variante, répartir des volumes de 20 ml de ce même milieu dans des tubes à essai à bouchon à vis de 20 x 150 mm qui sont ensuite hermétiquement fermés.
2. Mettre le milieu à coaguler (voir instructions ci-dessous) dans les 15 minutes qui suivent la répartition dans les tubes ou les flacons, de façon à éviter la sédimentation des éléments les plus lourds.

#### *Épaississement (coagulation du milieu)*

1. Préchauffer l'appareil à coaguler à 80 °C de façon à faire monter plus vite la température avant d'y mettre les flacons.
2. Mettre les flacons en position inclinée dans l'appareil et laisser coaguler le milieu à 80-85 °C pendant 45 minutes. Il ne faut pas chauffer de nouveau le milieu.
3. La qualité des milieux à l'œuf se dégrade si la coagulation est réalisée à une température trop élevée ou dure trop longtemps. La décoloration éventuelle du milieu coagulé peut être le résultat d'une température excessive. L'apparition de trous ou de bulles en surface indique également des problèmes dans le processus de coagulation.
4. Éliminer les milieux de mauvaise qualité.

#### *Vérification de la stérilité*

Après coagulation et pour vérifier la stérilité, l'ensemble du lot ou un échantillon représentatif de flacons ou de tubes de culture est mis à incuber à 35-37 °C pendant 2 semaines. Une souche de référence peut également être ensemencée dans le milieu pour vérifier qu'elle présente une croissance satisfaisante.

### Conservation

Le milieu doit être daté, puis il peut être conservé au réfrigérateur pendant plusieurs semaines, dans des flacons ou des tubes hermétiquement bouchés de façon à éviter la dessiccation.

**N.B.** On obtient un résultat optimal pour l'isolement des mycobactéries avec un milieu qui n'a pas été gardé à 2-8 °C plus de 6 mois.

### 5.3.2 PRÉPARATION DU MILIEU DE BROWN ET BUCKLE

Selon le volume de milieu préparé, on peut obtenir avec cette méthode environ 600 flacons (6,5 litres) ou 150 flacons de milieux de culture en pente (1,625 litres).

#### 5.3.2.1 Matériel

On a besoin du matériel suivant :

- 2 éprouvettes graduées de 1 litre stériles ;
- 3 boîtes de flacons de 30 ml en plastique à bouchon à vis et à fond conique stériles ;
- 6 portoirs pour 100 flacons ;
- un tuyau stérile pour la pompe péristaltique.

#### 5.3.2.2 Réactifs

Réactifs	Pour 6,5 litres	Pour 1,625 litres
Hydrogène-orthophosphate dipotassique anhydre (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	36 g	9 g
Dihydrogène-orthophosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	12 g	3 g
Gélose n° 3 (Oxoid LPO013)	68 g	17 g
Glycérol à 50 %	100 ml	25 ml
Eau distillée	4,8 l	1,2 l
<b>Additifs</b>		
Jaunes d'œufs stériles (entre 90 et 95 œufs) <sup>a</sup>	1,6 l	400 ml
Solution de vert malachite à 2 % (filtrée et stérilisée) <sup>a</sup>	64 ml	16 ml

<sup>a</sup>Voir ci-dessous pour les instructions de préparation

#### Jaunes d'œufs stériles

1. Mettre les œufs dans un récipient en acier inoxydable muni d'un couvercle, et ajouter de l'alcool à 70 % pour recouvrir les œufs. **N.B.** L'alcool à 70 % versé peut être réutilisé pendant 1 mois sauf si les œufs se sont cassés et que l'alcool est devenu trouble.
2. Laisser en contact 30 minutes.
3. Sortir les œufs avec des pinces stériles, et poser ceux-ci sur une serviette stérile ; les laisser sécher à l'air sous une hotte à flux laminaire.
4. Enfiler des gants chirurgicaux stériles, puis casser chaque œuf dans des conditions d'asepsie sur le bord d'un bécher stérile ; récupérer le jaune en filtrant l'œuf sur une main gantée ou à l'aide d'un séparateur de blanc et jaune d'œuf stérile.
5. Verser le jaune d'œuf dans une éprouvette graduée de 1 litre stérile et jeter le blanc.
6. Lorsque l'éprouvette est remplie jusqu'au repère voulu (c'est-à-dire, 400 ml ou 800 ml selon le volume de milieu préparé), agiter doucement avec un pilon stérile pour homogénéiser les jaunes.

**N.B.** Il est possible d'effectuer cette opération un jour à l'avance, et les jaunes peuvent être gardés à 4 °C pendant une nuit avant d'être utilisés le lendemain au plus tard. Il faut amener les jaunes à température ambiante avant de les utiliser.

**Solution de vert malachite à 2 %**

1. Peser 10 g de vert malachite.
2. Dissoudre le vert malachite dans 500 ml d'eau distillée.
3. Poser le tout sur un agitateur pendant 1 heure.
4. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
5. Laisser refroidir jusqu'à 50 °C.
6. Filtrer sur un filtre Sartorius P20 Plus (numéro au catalogue : 18056 D) ou équivalent à l'aide d'une pompe péristaltique et d'un tuyau stérile.
7. Conserver dans un flacon stérile.

**N.B.** Le vert malachite va garder des particules insolubles s'il n'est pas passé en autoclave puis filtré.

**5.3.2.3 Méthode (préparation des milieux)**

Au moyen d'un automate de préparation de milieux de culture :

1. Mesurer 4,8 litres d'eau distillée et 100 ml de glycérol à 50 % et mettre ces deux solutions dans la cuve d'un automate de préparation de milieux (tel que l'autopréparateur S8000 d'AES Chemunex, ou équivalent) ;
2. Peser les sels et la gélose ; les introduire dans la cuve ;
3. Mélanger et laisser s'imprégner 10 minutes ;
4. Mesurer le pH et noter sa valeur ;
5. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes ;
6. Laisser refroidir jusqu'à 56 °C pendant au moins 45 minutes pour parvenir à refroidir le haut de l'autopréparateur ;
7. Ajouter dans des conditions d'asepsie les jaunes d'œufs stériles et le vert malachite dans l'autopréparateur et laisser le mélange se faire ;
8. Modifier la température de coulée et la régler sur 60 °C, et distribuer dans des conditions d'asepsie 9 ml de milieu dans des tubes à l'aide d'une pompe péristaltique et d'un tuyau stérile ;
9. Mettre les flacons encore chauds en position inclinée dans des portoirs qui contiennent 100 flacons, et laisser solidifier ;
10. Rincer le tuyau à l'eau chaude immédiatement après emploi pour éviter la solidification de la gélose ;
11. Mesurer et noter le pH. Le pH doit être compris entre 6,8 et 7,0. Si le pH n'est pas correct, jeter les milieux de culture ;
12. Etiqueter et dater les flacons ;
13. Prélever le nombre requis de milieux de culture pour les tests de contrôle de la qualité.

**N.B.** Le milieu doit être de couleur vert olive pâle.

**N.B.** La durée de conservation du milieu de Brown et Buckle est de 6 mois à température ambiante.

**5.3.2.4 Contrôle de la qualité**

Avant d'utiliser le milieu, un échantillon représentatif des flacons de culture est mis à incuber à 35-37 °C pendant 2 semaines pour vérifier leur stérilité.

### 5.3.3 PRÉPARATION DU MILIEU D'OGAWA

Le milieu d'Ogawa est appelé milieu d'Ogawa « 1 % », « 2 % » ou « 3 % » selon la concentration de phosphate monopotassique ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) dans la solution de sels minéraux. Pour le diagnostic de l'ulcère de Buruli au laboratoire ou d'autres infections à mycobactéries non tuberculeuses, on utilise le milieu d'Ogawa 2 %.

#### 5.3.3.1 Matériel

On a besoin du matériel suivant :

- 2 éprouvettes graduées de 200 ml stériles et 2 erlenmeyers de 500 ml stériles ;
- 2 entonnoirs stériles et 3 morceaux (30 x 30 cm) de gaze de coton stérile ;
- un agitateur magnétique stérile, un bécher stérile et 2 cuillères en acier inoxydable stériles ;
- 40-45 tubes à essai à bouchon à vis stériles (18 x 180 mm).

#### 5.3.3.2 Composants

Le milieu d'Ogawa est constitué de trois composants, qui sont préparés séparément puis additionnés pour donner le milieu :

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

**N.B.** La solution de sels minéraux et la solution de vert malachite sont préparées séparément, et peuvent se conserver longtemps au réfrigérateur. La solution d'œufs entiers est préparée au besoin.

#### *La solution de sels minéraux*

Phosphate monopotassique ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2,0 g
Glutamate monosodique	0,5 g
Citrate de magnésium	0,1 g
Amidon soluble (qualité réactif)	3,0 g
Pyruvate de sodium	0,2 g
Eau distillée	100 ml

1. Dissoudre tous les composants indiqués dans le tableau ci-dessus.
2. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 30 minutes.
3. Laisser refroidir à température ambiante.

#### *La solution de vert malachite à 2 %*

Oxalate de vert malachite	1 g
Eau distillée	50 ml

Préparer la solution de vert malachite comme décrit ci-dessus (voir 5.3.2.2).

**N.B.** Cette solution n'a pas besoin d'être complètement dissoute ; elle sera ajoutée à la solution d'œufs entiers à l'aide d'une pipette à bout large qui permettra de transvaser la poudre insoluble.

*Les œufs entiers homogénéisés*

1. Faire tremper les œufs pendant 10 minutes dans de l'éthanol à 70 % ; les laisser sécher à l'air sous une hotte à flux laminaire.
2. Casser les œufs dans un bécher stérile à l'aide d'une cuillère en acier inoxydable stérile, puis les mélanger en utilisant une autre cuillère en acier inoxydable stérile.
3. Filtrer la solution d'œufs entiers sur de la gaze de coton stérile pliée en deux épaisseurs dans un entonnoir stérile qui est placé sur une éprouvette stérile de 200 ml.

## 5.3.3.3 Méthode (préparation du milieu)

Solution de sels minéraux	100 ml
Glycérol (qualité réactif)	4 ml
Solution de vert malachite	4 ml
Œufs homogénéisés (5 à 6 œufs)	200 ml

1. Mélanger tous les réactifs dans un erlenmeyer de 500 ml stérile avec un agitateur magnétique stérile, et filtrer sur de la gaze de coton stérile pliée en deux épaisseurs dans un entonnoir stérile.
2. Répartir 7 ml du milieu complet avec les œufs dans des tubes à essai à bouchon à vis stériles (18x180 mm), puis boucher les tubes (sans trop serrer).
3. Contrôler les milieux avant la coagulation. Enlever la mousse des milieux en crevant les bulles avec une aiguille chauffée ou en aspirant les bulles avec une pipette stérile. Il est possible de conserver les tubes dans cet état pendant une nuit.
4. Mettre à chauffer l'appareil à coaguler à 70 °C.
5. Mettre les tubes en position inclinée dans l'appareil et laisser coaguler les milieux à 90 °C pendant 60 minutes.
6. Faire refroidir les milieux dans un bain d'eau immédiatement après la coagulation.
7. Éliminer les milieux de mauvaise qualité.

*Vérification de la stérilité*

Après coagulation et pour vérifier la stérilité, l'ensemble du lot ou un échantillon représentatif de flacons ou de tubes de culture est mis à incuber à 35-37 °C pendant 2 semaines. Une souche de référence peut également êtreensemencée sur le milieu pour vérifier qu'elle présente une croissance satisfaisante.

*Conservation*

Le milieu doit être daté, puis il peut être conservé au réfrigérateur pendant plusieurs semaines, dans des flacons ou des tubes hermétiquement bouchés de façon à éviter la dessiccation.

**5.4 ENSEMENCEMENT ET INCUBATION DES MILIEUX DE CULTURE**

1. Ensemencer environ 0,2 ml de l'échantillon sur chaque tube de milieu de Löwenstein–Jensen, de Brown et Buckle ou Ogawa.
2. Disperser la suspension ensemencée sur tout le milieu en remuant doucement les tubes.
3. Laisser les tubes en position inclinée pendant une nuit dans un endroit où ils seront à l'abri de la lumière.
4. On peut les laisser en position inclinée sur la paille à température ambiante ou dans une étuve.

5. Incuber le milieu ainsi ensemencé dans une étuve à 33 °C (30-35 °C) pendant 6 mois (jusqu'à 9 mois parfois pour certains échantillons).
6. Au bout de 1 semaine d'incubation, examiner les tubes pour voir s'il y a eu développement ; à l'aide d'une lampe, rechercher la présence d'une éventuelle contamination ou croissance trop précoce. Une croissance douteuse peut être contrôlée au microscope pour vérifier sa pureté. Les tubes contaminés devront être jetés (après enregistrement).
7. On peut repiquer les colonies mycobactériennes afin d'obtenir une croissance abondante, ou les identifier directement.
8. Les tubes dans lesquels on n'observe aucun développement peuvent être incubés plus longtemps.
9. Au cours des 6 mois qui suivent, observer les cultures toutes les 1 à 2 semaines de la manière décrite ci-dessus. Le temps d'incubation maximum pour l'isolement primaire (ou primoculture) de *M. ulcerans* est de 12 mois. Après cette période, on considère que tous les tubes dans lesquels rien ne s'est développé sont négatifs.

## 5.5 IDENTIFICATION DE *M. ULGERANS*

*M. ulcerans* appartient au groupe des mycobactéries à croissance lente. Les cultures primaires deviennent en général positives après 6 à 12 semaines d'incubation, et les repiquages deviennent en général positifs après 3-4 semaines d'incubation à 29-33 °C sur du milieu de Löwenstein-Jensen, de Brown et Buckle ou Ogawa. Les colonies évoquant *M. ulcerans* apparaissent jaunâtres, rugueuses et à bords bien démarqués. Les souches africaines et japonaises sont plus jaunâtres que les australiennes (*Figure 1*), qui ont une couleur crème.

L'identification de *M. ulcerans* se fait par PCR. La séquence cible la plus fréquemment utilisée pour la confirmation par PCR de l'ulcère de Buruli est la séquence d'insertion IS2404. L'ADN issu des cultures primaires ou des repiquages est extrait par mise en suspension de quelques colonies dans du tampon TE (Tris chlorhydrate 10 mM plus EDTA 1 mM, pH 8,0), et chauffage pour les inactiver à 100 °C pendant 8-10 minutes.

Les procédures permettant d'extraire l'ADN des cultures et de détecter l'ADN de *M. ulcerans* par PCR sont décrites à l'*Annexe 6* ci-après.

## ANNEXE 6: PROTOCOLES DE L'AMPLIFICATION GÉNIQUE (PCR)

### 6.1 ÉVITER LES FAUX-POSITIFS : LE PRINCIPE DES TROIS SALLES

Le risque de résultats faux-positifs au cours des réactions PCR est bien réel. Lors de la réalisation de la PCR, il est crucial d'éviter les faux-positifs dus à des contaminations. Afin de minimiser le risque de résultats faux-positifs, il faut respecter des règles strictes pour ce qui concerne les vêtements, les échantillons, les réactifs, le matériel d'écriture, et la préparation des échantillons. Il est important d'effectuer l'extraction d'ADN des cultures et des échantillons cliniques en utilisant des réactifs et du matériel réservés à cet usage.

Il convient de suivre le principe des trois salles.

#### *Salle 1 :*

- strictement pas d'extraits d'ADN, de matrices ou d'amplicons ;
- salle réservée à la préparation du mélange réactif pour la PCR.

#### *Salle 2 :*

- salle à faible niveau d'ADN (pas d'amplicons PCR) ;
- préparation des échantillons de tissu et des écouvillons pour la PCR ;
- travail effectué dans une enceinte de sécurité biologique de classe II ou une enceinte pour PCR.

#### *Salle 3 :*

- salle à haut niveau d'ADN (amplicons PCR présents en nombres de copies élevés) ;
- salle où ont lieu l'amplification génique et les manipulations après la réaction PCR ;
- manipulation des gels d'agarose.

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

#### *Méthodes générales*

- Le port de la blouse et des gants de laboratoire est obligatoire dans chaque salle ; de plus, les blouses doivent rester affectées à des salles bien précises – autrement dit, les blouses de laboratoire pour la salle 1 ne doivent être portées que dans la salle 1.
- Les désinfectants, de même que les rayons UV, dégradent l'ADN et l'ARN. La désinfection et le traitement des surfaces de travail aux UV peuvent donc réduire le risque de contaminer les échantillons par de l'ADN ou de l'ARN.
  - À la fin de toute manipulation, les paillasses situées dans la zone d'extraction de l'ADN doivent être nettoyées avec une solution désinfectante et traitées aux UV.
  - Les salles réservées à l'extraction d'ADN doivent être nettoyées toutes les semaines avec une solution d'eau de javel à 0,5-1 % ; les plans de travail doivent être nettoyés avec une solution d'éthanol à 50 %.

**N.B.** L'eau distillée doit être changée tous les mois.

## 6.2 VUE GÉNÉRALE DU PROTOCOLE DE DIAGNOSTIC PAR PCR

Le protocole de la PCR pour le diagnostic de la maladie causée par *M. ulcerans* comporte quatre étapes :

1. la préparation de l'échantillon ;
2. l'extraction de l'ADN ;
3. l'amplification génique par PCR (PCR en gel traditionnelle ou PCR en temps réel) ;
4. l'assurance de la qualité.

## 6.3 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Pour l'analyse par PCR, on peut utiliser des suspensions préparées en vue d'analyses bactériologiques, telles que décrites à l'*Annexe 3*, ou des échantillons mis dans l'alcool, dans un tampon phosphate salin ou dans un tampon TE (10mM TRIS chlorhydrate plus 1mM EDTA à pH 8,0) ou une solution de lyse cellulaire.

**N.B.** Si on utilise comme tampon de transport une solution de lyse cellulaire (par exemple commercialisée par Qiagen), on peut soumettre les échantillons à une inactivation directe par la chaleur, et la faire suivre d'une extraction d'ADN à l'aide de la procédure Genra Puregene de Qiagen (voir 6.4.2).

**N.B.** Il faut toujours inclure dans l'ensemble de la procédure un témoin négatif dans du tampon phosphate (pour l'extraction Qiagen dans une solution de lyse cellulaire respectivement).

La procédure pour les échantillons préparés comme indiqué dans l'*Annexe 3* est la suivante :

### AAF

1. Transvaser 0,5 ml d'échantillon dans un tube à microcentrifugation de 1,5 ml.
2. Laver (voir ci-dessous).

### Écouvillons et échantillons de tissu

1. Transvaser 1 ml d'échantillon dans un tube à microcentrifugation de 1,5 ml.
2. Laver (voir ci-dessous).

### Lavage

1. Passer le tube de 1,5 ml à la microcentrifugeuse pendant 10 minutes à grande vitesse.
2. Éliminer avec précaution le tampon phosphate.
3. Laver le culot avec 1 ml de tampon phosphate, puis centrifuger pendant 10 minutes.
4. Éliminer avec précaution le tampon phosphate et remettre en suspension le culot dans 180 ml d'eau distillée.

**N.B.** L'eau distillée doit être conservée dans une bouteille en Téflon et changée tous les mois.

### Blocs de paraffine

1. Transférer des coupes de tissu incluses dans la paraffine d'au moins 6 x 20 µm d'épaisseur (découpées à l'aide d'un microtome stérile, ou prélevées avec précaution dans le bloc à l'aide d'une lame de bistouri stérile) dans un tube à bouchon à vis de 1,5 ml.
2. Ajouter 1 ml d'Histolène ou de xylène et incubé à température ambiante jusqu'à ce que la paraffine se soit dissoute (1-5 minutes). **N.B.** il faut inclure un tube témoin de réactif, donc ne contenant pas de coupes de paraffine.
3. Centrifuger les tubes à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse pendant 5 minutes pour obtenir un culot de tissu.

4. Éliminer le surnageant avec une pipette de transfert à pointe fine, en faisant attention à ne pas toucher le culot.
5. Jeter le surnageant dans un récipient prévu pour les solvants volatils.
6. Remettre en suspension le culot dans 1 ml d'éthanol absolu et incubé pendant 5 minutes à température ambiante.
7. Centrifuger à vitesse maximale pendant 5 minutes.
8. Éliminer le surnageant avec une pipette de transfert à pointe fine, en faisant attention à ne pas toucher le culot ; laisser rapidement sécher à l'air.
9. Extraire l'ADN du tissu en utilisant la méthode de Maxwell ou la procédure Genra Puregene comme décrit ci-dessous.

#### 6.4 MÉTHODES D'EXTRACTION DE L'ADN

L'extraction d'ADN a pour but :

- d'inactiver les agents infectieux ;
- de purifier et de concentrer l'ADN mycobactérien dans les échantillons cliniques en vue d'une analyse par PCR.

**N.B.** L'ADN issu des cultures est extrait par mise en suspension de quelques colonies dans du tampon TE (Tris chlorhydrate 10 mM plus EDTA 1 mM, pH 8,0), et chauffage pour les inactiver à 100 °C pendant 8-10 minutes.

##### 6.4.1. MÉTHODE DE MAXWELL

###### 6.4.1.1 Préparation

###### *Tampon de lyse*

Chlorhydrate de trisaminométhane (Tris HCl) 1 M, pH 7,5	0,5 ml
NaCl (5 M)	100 µl
EDTA (0.5 M)	1 ml
Dodécylsulfate de sodium à 10 %	2,5 ml
Eau distillée	46,9 ml

Mélanger ensemble les solutions ci-dessus, dans l'ordre indiqué.

**N.B.** Le tampon de lyse peut se conserver à 4 °C pendant 6 mois.

###### *Protéinase K (20 mg/ml)*

Proteinase K	1000 mg
Eau distillée	50 ml

1. Dissoudre la protéinase K dans l'eau.
2. Aliquoter 1 ml par tube.

**N.B.** La protéinase K peut se conserver à -20 °C pendant un maximum de 2 ans.

### 6.4.1.2 Méthode

1. Ajouter 50 µl de protéinase K à 200 µl de tampon de lyse.
2. Ajouter 250 µl de ce mélange (tampon de lyse plus protéinase K) à 200 µl de suspension d'échantillon.
3. Chauffer à 62 °C et agiter régulièrement pendant au moins 3 heures (de préférence pendant toute une nuit).
4. Utiliser 400 µl du mélange avec la trousse de purification d'ADN à partir de tissu « Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit » (commercialisée par Promega, Leiden, Pays-Bas) et l'appareil « Maxwell 16 » (également commercialisé par Promega) en suivant les instructions du fabricant.

**N.B.** Le volume final de l'extrait d'ADN est de 300 µl. Conserver l'extrait d'ADN à une température inférieure ou égale à 18 °C, ou à une température comprise entre 2 et 8 °C s'il est prévu des analyses supplémentaires qui seront achevées dans les 2 jours qui suivent.

### 6.4.2 MÉTHODE GENTRA PUREGENE

La méthode d'extraction « Gentra Puregene Cell Kit » de Qiagen peut être utilisée pour tous les types d'échantillons cliniques et de matériel de culture.

#### 6.4.2.1 Réactifs

- La trousse d'extraction d'ADN « Puregene » contient :
  - une solution de lyse cellulaire, qui peut également être utilisée comme tampon de transport ;
  - une solution d'hydratation d'ADN ;
  - une solution de précipitation des protéines ;
  - du lysozyme (10 mg/ml) ;
  - de la protéinase K (20 mg/ml).
- Les alcools suivants sont également requis :
  - éthanol à 70 % ;
  - isopropanol (2-propanol).

#### 6.4.2.2 Préparation

1. Préparer un tube réactionnel destiné à servir de témoin d'extraction négatif, en ajoutant 700 µl de solution tampon de lyse cellulaire dans un tube à microcentrifugation de 2.0 ml. Ce témoin sera traité de la même façon que les échantillons cliniques mais ne doit contenir aucun matériel de diagnostic.
2. Pour extraire l'ADN de *M. ulcerans* des échantillons cliniques, mettre les écouvillons et les biopsies de 3 mm dans 700 µl de solution de lyse cellulaire, et les échantillons d'AAF (le contenu de la seringue) dans 300 µl de solution de lyse cellulaire.
3. Pour extraire l'ADN de *M. ulcerans* à partir des cultures, prélever du matériel de culture à l'aide d'une seule anse à ensemercer, et ajouter cette anse dans 700 µl de solution de lyse cellulaire.
4. Chauffer pour inactiver les échantillons cliniques, en les incubant à 95 °C pendant 20 minutes.

#### 6.4.2.3 Mode opératoire

Les étapes doivent se dérouler dans l'ordre indiqué ci-dessous.

## Étape A. Lyse cellulaire

### *Pour les AAF, biopsies à l'emporte-pièce et échantillons de tissu*

1. Ajouter 10 µl de protéinase K (c'est-à-dire, 20 mg/ml) à chaque échantillon et incuber dans le Thermomixer à 55 °C à vitesse moyenne pendant une nuit jusqu'à la lyse complète du tissu.
2. Inactiver la protéinase K par incubation dans le Thermomixer à 80 °C pendant 20 minutes.
3. Laisser refroidir à température ambiante.
4. Ajouter 15 µl de lysozyme (c'est-à-dire, 10 mg/ml) et incuber dans le Thermomixer à 37 °C à vitesse moyenne pendant 1 heure.

### *Pour les prélèvements par écouvillon et le matériel de culture*

1. Ajouter 15 µl de lysozyme (c'est-à-dire, 10 mg/ml) aux échantillons et incuber dans le Thermomixer à 37 °C à vitesse moyenne pendant 1 heure.
2. Ajouter 10 µl de protéinase K (c'est-à-dire, 20 mg/ml) aux échantillons et incuber dans le Thermomixer à 55 °C à vitesse moyenne pendant 4 heures (ou une nuit) jusqu'à la lyse complète.
3. La protéinase K est inactivée par incubation à 80 °C pendant 20 minutes.

## Étape B. Précipitation des protéines

1. Mettre les échantillons dans un bain de glace pendant 5 minutes.
2. Ajouter 230 µl de solution de précipitation de protéines.
3. Agiter vigoureusement au Vortex à vitesse élevée pendant 20 secondes pour obtenir un mélange homogène.
4. Mettre les échantillons dans un bain de glace pendant 5 minutes.
5. Centrifuger à 13000 x g pendant 5 minutes. Les protéines précipitées vont former un culot dense. Si le culot n'est pas dense, recommencer les étapes 3 à 5.
6. Préparer le nombre approprié de nouveaux tubes à microcentrifugation de 2 ml contenant 700 µl d'isopropanol.

## Étape C. Précipitation de l'ADN

1. Verser le surnageant contenant de l'ADN dans un tube à microcentrifugation de 2 ml propre contenant 700 µl d'isopropanol (laisser de côté le culot de protéines précipitées).
2. Mélanger en retournant doucement le tube 10 fois.
3. Centrifuger à 13000 x g pendant 5 minutes.
4. Éliminer le surnageant.
5. Ajouter 700 µl d'éthanol à 70 %, et retourner les tubes pour laver les culots d'ADN.
6. Centrifuger à 13000 x g pendant 5 minutes. Éliminer soigneusement l'éthanol. Le culot peut se détacher, donc il faut verser l'éthanol lentement tout en surveillant le culot.
7. Retourner et vider le tube sur un papier absorbant propre (poser chaque tube à un endroit différent), et laisser sécher à l'air, ou faire sécher dans le Thermomixer à 65 °C jusqu'à ce que le tube soit complètement sec (environ 20 minutes). **N.B.** L'éthanol doit impérativement être complètement évaporé, sinon il se peut qu'il inhibe la PCR.

## Étape D. Hydratation de l'ADN

1. Ajouter 200 µl de solution d'hydratation d'ADN (ou 50 µl pour les échantillons obtenus par AAF) à chaque échantillon.
2. Réhydrater l'ADN par pipetage soigneux de haut en bas et inversement environ 20 fois.
3. Incuber dans le Thermomixer à 65 °C pendant 30 minutes.

## 6.5 AMPLIFICATION GÉNÉRIQUE PAR PCR

La PCR amplifie de manière exponentielle l'ADN cible. Cette amplification se fait par une réaction cyclique entre différentes étapes conduites à différentes températures. Les températures sont propres à chaque étape et à chaque réaction PCR, et dépendent essentiellement de la séquence nucléotidique des amorces :

- dénaturation : forme l'ADN simple brin (généralement effectuée à 94 °C) ;
- hybridation : permet aux amorces de s'hybrider (généralement effectuée à 50-70 °C) ;
- extension : prolonge la chaîne d'ADN complémentaire (généralement effectuée à 72 °C).

La réaction PCR nécessite également l'utilisation de tampons corrects et la présence de l'ADN cible, de désoxynucléotides triphosphates (dNTP) et d'une enzyme, le plus souvent la *Taq* polymérase, une enzyme thermostable provenant de *Thermus aquaticus*.

On considère que la réaction PCR a fonctionné seulement si le témoin de PCR positif et le témoin de PCR négatif donnent le résultat voulu.

L'ADN peut être amplifié par la PCR traditionnelle en gel ou par la PCR en temps réel.

### 6.5.1 PCR TRADITIONNELLE EN GEL

On réalise une simple détection visuelle des amplicons au moyen d'une électrophorèse en gel d'agarose suivie d'une coloration au bromure d'éthidium.

**N.B.** Le bromure d'éthidium est un agent mutagène très puissant qui doit donc être manipulé avec précaution.

#### 6.5.1.1 PCR en un seul cycle

La PCR en un seul cycle comporte quatre étapes qui consistent à :

1. préparer le mélange réactionnel (« master-mix ») ;
2. ajouter l'ADN matrice (tel que préparé dans la section 2 de cette annexe) ;
3. faire l'amplification ;
4. visualiser le produit d'amplification.

**Étape A. Préparer le mélange réactionnel** (au moyen, par exemple, de réactifs fournis par Promega)

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

Réactif (concentration de départ)	Quantité à ajouter (en µl)
Eau distillée	9
Tampon Thermo (10 x)	2
Chlorure de magnésium (MgCl <sub>2</sub> ) (25 mM)	1,2
dNTPs (2 mM)	2
Amorce 1 de <i>M. ulcerans</i> <sup>a</sup> (20 µM)	1
Amorce 2 de <i>M. ulcerans</i> <sup>b</sup> (20 µM)	1
<i>Taq</i> polymérase (5 unités/µl)	0,2

dNTP, désoxynucléotides triphosphates.

<sup>a</sup> *M. ulcerans* 1 GAT CAA GCG TTC ACG AGT GA.

<sup>b</sup> *M. ulcerans* 2 GGC AGT TAC TTC ACT GCA CA.

Ces quantités permettront d'obtenir 16,4 µl de mélange réactionnel; produit habituellement en volumes de 164 µl ou plus, on le répartit ensuite en parts aliquotes dans plusieurs tubes.

#### Étape B. Ajouter l'ADN matrice dans les tubes contenant le mélange réactionnel

1. Mettre 15 µl de mélange réactionnel dans chaque tube de PCR.
2. Ajouter 5 µl d'ADN à tester ; on obtient alors dans chaque tube un volume total de 20 µl.
3. Dans chaque essai, il faut toujours inclure des témoins positifs et des témoins négatifs pour la PCR.
4. Vérifier la présence éventuelle d'inhibiteurs de la PCR dans chaque échantillon.

#### Étape C. Faire l'amplification

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

- |   |   |                        |
|---|---|------------------------|
| 94 °C pendant 4 minutes   | } | 35 cycles <sup>a</sup> |
| 94 °C pendant 40 secondes   |   |                        |
| 60 °C pendant 40 secondes   |   |                        |
| 72 °C pendant 40 secondes   |   |                        |
| 72 °C pendant 5 minutes   |   |                        |
| 4 °C – maintenir l'échantillon à cette température jusqu'à ce qu'il soit prêt pour l'électrophorèse en gel d'agarose. |   |                        |

<sup>a</sup> Un cycle comprend les trois phases (ou températures) indiquées par l'accolade.

#### Étape D. Visualiser le produit d'amplification

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

**N.B.** Pour préparer le tampon d'échantillon :

1. Dissoudre 250 mg de bleu de bromophénol dans 33 ml de Tris 150 mM (pH 7,6) ;
2. Ajouter 60 ml de glycérol et 7 ml d'eau distillée ;
3. Conserver à température ambiante.

**N.B.** Le bromure d'éthidium est un agent mutagène très puissant qui doit donc être manipulé avec précaution.

## 6.5.1.2 PCR à base de réactifs secs

**Réactifs**

On aura besoin des réactifs suivants :

- Billes pour PCR « PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads » (GE Healthcare Life Sciences) ;
- amorces lyophilisées MU5 et MU6 (voir note ci-dessous) ;
- eau distillée purifiée, qualité biologie moléculaire ;
- agarose à électroendosmose faible (agarose standard) ;
- tampon 10 x préparé avec du Tris/borate 1 M plus EDTA 10 mM, pH 8,3 (également connu sous le nom de tampon TBE) ;
- GelRed (Biotium) ;
- solution tampon de colorant de charge 10 x (tel que BlueJuice, commercialisé par Invitrogen) ;
- marqueurs de taille d'ADN (échelle 100 pb) (tels que ceux commercialisés par Invitrogen).

**N.B.** En suivant les recommandations du fabricant pour le concentrateur sous vide utilisé, 2,5 µl d'amorce (10 µM MU5 (5' AGC GAC CCC AGT GGA TTG GT '3) et MU6 (5' CGG TGA TCA AGC GTT CAC GA '3) sont lyophilisés par lots successifs dans des tubes de réaction PCR de 0,2 ml.

**Préparation des tubes de réaction PCR**

1. Ajouter une bille de « PuReTaq Ready-To-Go-PCR Bead » (contenant du tampon PCR, MgCl<sub>2</sub> et des dNTP) dans chaque tube de réaction PCR contenant les amorces lyophilisées MU5 et MU6.
2. Ajouter 22,5 µl d'eau distillée pour dissoudre complètement les billes.

**Ajout d'ADN matrice**

- Échantillons de diagnostic
  - Chaque échantillon de diagnostic (extrait d'ADN) est testé non dilué et à une dilution de 10<sup>-1</sup>.
  - Mettre 2,5 µl d'extrait d'ADN initial ou d'extrait dilué dans les tubes de réaction PCR.

**Réalisation de l'amplification**

On place les tubes dans le thermocycleur. L'amplification est programmée pendant 1 heure et 30 minutes comme suit.

Étapes	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95 °C	10 minutes	1
Dénaturation	95 °C	10 secondes	} 35 <sup>a</sup>
Hybridation des amorces	58 °C	10 secondes	
Extension	72 °C	30 secondes	
Extension finale	72 °C	10 minutes	1
Maintien	15 °C	Aussi longtemps que nécessaire	

<sup>a</sup> Pour la dénaturation, l'hybridation des amorces et l'extension, un cycle comprend les trois phases (ou températures) indiquées par l'accolade.

### 6.5.1.3 Contrôle interne de la qualité

- Témoins d'inhibition
  - On doit traiter en parallèle les témoins d'inhibition (dilués et non dilués) et tous les échantillons de diagnostic, afin d'éviter les faux-négatifs causés par le phénomène d'inhibition.
  - Pour la réaction témoin d'inhibition, mettre 1,25 µl d'ADN de diagnostic (inconnu) pur ou dilué plus 1,25 µl d'ADN témoin positif, dans chaque tube respectif.
- Témoins positifs et négatifs

En plus des échantillons de diagnostic et des témoins d'inhibition, on doit également traiter les témoins suivants.

Type de témoin	Objectif	Contenu de la réaction
Témoin d'extraction négatif	Témoin négatif du processus d'extraction utilisé pour exclure une contamination survenant pendant l'extraction	2,5 µl du témoin d'extraction négatif
Témoin sans matrice	Témoin négatif de PCR utilisé pour exclure une contamination des réactifs	2,5 µl d'eau distillée sans aucun ADN
Témoin de PCR positif	Témoin positif (témoin d'essai) de PCR destiné à établir l'amplification spécifique	2,5 µl d'ADN positif <sup>a</sup>

PCR, réaction d'amplification en chaîne par polymérase.

<sup>a</sup> Pour le témoin positif, on peut prendre soit l'ADN extrait d'un patient qui a déjà été testé positif, soit de l'ADN extrait de matériel de culture.

**N.B.** Pour préparer un échantillon positif d'ADN de *M. ulcerans* (épreuve d'inhibition et témoin positif) :

1. extraire l'ADN de *M. ulcerans* en mettant en suspension quelques colonies dans du tampon TE (Tris chlorhydrate 10 mM plus EDTA 1 mM, pH 8,0) ;
2. chauffer pour inactiver (100 °C pendant 8 à 10 minutes) ;
3. prendre un volume de 1 µl pour la réaction PCR.

### 6.5.1.4 Analyse des amplicons obtenus par PCR et interprétation des résultats

#### Réalisation d'une électrophorèse en gel d'agarose

Pour préparer la concentration de travail du tampon comprenant du Tris borate 1 M plus EDTA 10 mM à pH 8,3 (également nommée tampon TBE), diluer 50 ml de tampon TBE concentré 10x dans 950 ml d'eau désionisée (dilution 5 %).

1. Pour préparer un gel d'agarose à 1,5 %, chauffer 1,5 g d'agarose et 100 ml de tampon 0,5x dans un erlemeyer en plastique pendant 3 minutes à 600 watts dans un four à micro-ondes. **N.B.** Les bulles indiquent que la température est correcte.
2. Après chauffage, laisser refroidir le fluide jusqu'à environ 50 °C. Par exemple en maintenant la fiole sous l'eau courante. Agiter la fiole pour être sûr que le liquide refroidit de manière uniforme.
3. Après refroidissement, ajouter 10 µl de GelRed et agiter doucement la fiole.
4. Boucher la cuve d'électrophorèse et verser le liquide dans la cuve d'électrophorèse en gel d'agarose. Éliminer soigneusement les bulles à l'aide d'un embout de pipette. Placer ensuite le(s) peigne(s) à l'endroit correct dans la cuve. Laisser le gel d'agarose refroidir à température ambiante, puis retirer le(s) peigne(s) avec précaution.

5. Mettre le gel figé dans la chambre d'électrophorèse en gel d'agarose, qui doit être remplie de tampon 0,5x (jusqu'au trait de remplissage).
6. Pour charger le gel, mélanger 15 µl d'amplicon PCR à base de réactifs secs avec 3 µl de colorant de charge pour gel disponible dans le commerce (par ex., Bluejuice 10x) ; en variante, on peut préparer 1 ml de colorant en mélangeant 500 µl de glycérol avec 497,5 µl d'eau distillée et 2,5 µl de bleu de bromophénol.
7. Déposer 10 µl de la solution de marqueurs de taille d'ADN (échelle 100 pb), en vérifiant qu'on utilise bien la solution de travail, dans 1 puits à échantillon par piste.
8. Appliquer la tension correcte, et réaliser l'électrophorèse de la manière décrite ci-dessous.

Dimensions du gel	Tension	Nombre de peignes	Durée de l'électrophorèse en gel
12 x 12 cm	100 volts	2	55 minutes

#### Analyse et interprétation de l'électrophorèse en gel d'agarose

- Une fois l'électrophorèse terminée, les amplicons sont visualisés sous UV (302 nm) à l'aide d'un transilluminateur.
- Une réaction positive produit une bande de 492 pb de longueur avec les amorces Mu5 + Mu6 (PCR à base de réactifs secs) et de 515 pb avec les amorces Mu1 + Mu2 (PCR en un seul cycle) ; en cas de réaction négative, il n'y a pas de bande.
- Les résultats des échantillons de diagnostic doivent être interprétés en fonction des résultats des témoins d'inhibition.

Les résultats possibles sont indiqués ci-dessous.

Résultat de l'échantillon	Résultat du témoin d'inhibition	Interprétation des résultats
Négatif	Positif	Échantillon négatif
Positif	Positif	Échantillon positif
Négatif	Négatif	Échantillon inhibé <sup>a</sup>
Positif	Négatif	Échantillon positif

<sup>a</sup> Si l'on obtient ce résultat, il faut tester les échantillons à une dilution plus élevée

On considère que la réaction PCR à base de réactifs secs a fonctionné seulement si le témoin positif donne un résultat positif et si le témoin négatif donne un résultat négatif.

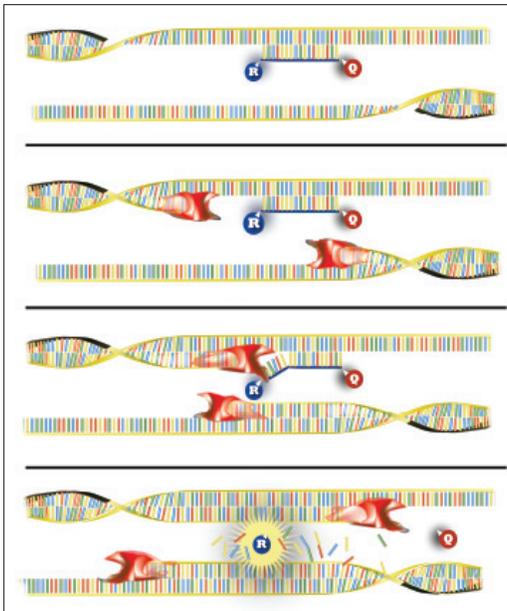
## 6.5.2 PROTOCOLE DE LA PCR QUANTITATIVE EN TEMPS RÉEL

### 6.5.2.1 Généralités

L'analyse PCR en temps réel décrite ci-dessous a été mise au point par Fyfe et coll.<sup>1</sup> et décrite en détail dans l'article de Lavender et Fyfe<sup>2</sup> ; elle utilise une sonde TaqMan qui est un ligand du petit sillon. Les sondes TaqMan sont des sondes d'hydrolyse conçues pour accroître la spécificité de la PCR en temps réel. La chimie de la sonde d'hydrolyse ou TaqMan repose sur l'activité 5'-3'-exonucléasique de la *Taq* polymérase, capable de dégrader une sonde d'ADN hybridée (non extensible) au cours de l'étape d'extension de la réaction PCR.

Cette sonde est conçue pour s'hybrider à une région située à l'intérieur de l'amplicon, et comporte un double marquage (fluorophore émetteur ou « rapporteur », et molécule suppresseur ou « quencher »). La proximité étroite du quencher inhibe la fluorescence du fluorophore rapporteur. À mesure que l'activité exonucléasique de la *Taq* polymérase dégrade la sonde, la fluorescence du rapporteur augmente, à une vitesse qui est proportionnelle à la quantité de matrice présente, ce qui permet de quantifier l'ADN dans le matériel de départ (Figure 30). Cependant, dans un contexte de diagnostic, la quantification n'est généralement pas nécessaire.

FIGURE 30. PCR EN TEMPS RÉEL AVEC LA TECHNOLOGIE D'AMPLIFICATION GÉNÉRIQUE TAQMAN



(Avec l'aimable autorisation de Koen Vandelanoot)

Les sondes d'hydrolyse permettent de détecter plusieurs séquences cibles en une seule et même réaction parce qu'elles utilisent des sondes spécifiques portant des marqueurs colorés différents (technique connue sous le nom de multiplexage). Dans ce test, la sonde qui est conçue pour détecter une région située dans IS2404 (IS2404 TP) est marquée par le colorant fluorescent 6-carboxyfluorescéine (FAM) à l'extrémité 5', et par un quencher non fluorescent qui se lie au petit sillon (désigné sous l'appellation MGBNFQ) à l'extrémité 3'.

<sup>1</sup> Fyfe J et al. Development and application of two multiplex real-time PCR assays for the detection of *Mycobacterium ulcerans* in clinical and environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73:4733–4740.

<sup>2</sup> Lavender CJ, Fyfe JA. Direct detection of *Mycobacterium ulcerans* in clinical specimens and environmental samples. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 943:201–216.

Un témoin positif interne exogène pour TaqMan, disponible dans le commerce, est incorporé dans chaque réaction pour s'assurer qu'un résultat négatif pour un échantillon particulier est un vrai négatif pour IS2404 et ne résulte pas de la présence d'inhibiteurs de la PCR. La sonde pour le témoin positif interne comporte un fluorophore VIC fixé à son extrémité 5' et un quencher non fluorescent se liant au grand sillon fixé à son extrémité 3'.

L'amplification et la détection de la séquence sont réalisées à l'aide d'un appareil de PCR en temps réel, tel que les systèmes de détection « ABI Prism 7000 Sequence Detector », « Eppendorf Mastercycler Realplex », ou équivalent.

### 6.5.2.2 Matériels

Pour la mise en œuvre de la PCR quantitative en temps réel, on a besoin du matériel suivant :

- mélange réactif pour PCR TaqMan (par exemple, fourni par Applied Biosystems ou équivalent) ;
- amorces IS2404 TF et IS2404 TR (voir ci-dessous) ;
- sonde IS2404 TP (voir ci-dessous) ;
- réactifs pour témoin positif interne exogène (« Exogenous Internal Positive Control Reagents », commercialisés par Applied Biosystems) ;
- eau exempte de nucléases ;
- plaque de réaction à 96 puits transparente (par exemple, fournie par Applied Biosystems ou équivalent) ;
- film adhésif transparent (par exemple, fourni par Applied Biosystems ou équivalent).

### 6.5.2.3 Mode opératoire

Les étapes doivent se dérouler dans l'ordre indiqué ci-dessous.

#### Étape A. Préparation du mélange réactif

Les mélanges pour PCR en temps réel visant à détecter IS2404 et renfermant un témoin positif interne contiennent des concentrations de 0,9 µM de chaque amorce, une concentration de 0,25 µM de la sonde, le mélange réactif pour PCR TaqMan (1x), et des réactifs pour témoin positif interne TaqMan (1x), dans un volume total de 24 µl.

Amorce ou sonde	Séquence (5'-3')
IS2404 TF	AAAGCACCCACGCAGCATCT
IS2404 TR	AGCGACCCCAGTGGATTG
IS2404 TP	6 FAM-CGTCCAACGCGATC-MGBNFQ

On prépare le mélange réactif dans un tube de 1,5 ml ou 2,0 ml. En règle générale, toutes les douze réactions, on prévoit une réaction supplémentaire en rajoutant un treizième tube réactionnel. Les 24 µl du mélange sont ensuite répartis dans chaque puits de la plaque de réaction.

Les réactifs nécessaires et les quantités nécessaires pour chaque réaction sont indiqués ci-dessous.

Réactif (concentration de départ)	Quantité à ajouter (en µl) pour 1 réaction
Mélange réactionnel pour PCR TaqMan (2x)	12,5
IS2404 TF (18 µM)	1,25
IS2404 TR (18 µM)	1,25
IS2404 TP (5 µM)	1,25
ADN exogène pour témoin positif interne (50x)	0,5
Mélange exogène pour témoin positif interne (10x)	2,5
Eau exempte de nucléases	4,75
<b>Total</b>	<b>24</b>

#### Étape B. Ajout de l'ADN matrice dans les tubes contenant le mélange réactionnel

Mettre dans les puits 1 µl d'ADN matrice. Inclure dans chaque essai trois puits témoins : un témoin sans matrice (1 µl d'eau exempte de nucléases à la place de l'ADN matrice), un témoin positif (1 µl d'une solution diluée d'ADN génomique de *M. ulcerans*) et un témoin négatif (1 µl d'un extrait préparé pour contenir seulement les réactifs utilisés pour l'extraction de l'ADN des échantillons). Sceller les plaques de réaction avec des couvercles adhésifs transparents à l'aide d'un applicateur ; puis déposer les plaques hermétiquement scellées dans l'appareil de PCR en temps réel, avec ou sans tapis de compression (selon le modèle de machine PCR).

**N.B.** Il est important de souligner qu'un thermocycleur normal ne peut pas être utilisé pour la PCR en temps réel. Il est indispensable d'utiliser un appareil capable simultanément d'amplifier et de détecter les signaux de fluorescence.

**N.B.** La dilution de l'ADN génomique choisie dépendra de la concentration initiale de la préparation. Cette dilution sera déterminée de manière empirique. Il est possible de choisir une dilution de la préparation de  $10^{-6}$ , qui donne un Ct (cycle seuil) de 25-30 dans l'essai. Plus la préparation est diluée, moins il y a de risques d'introduire une contamination, mais si elle est trop diluée, le risque d'échec augmente.

#### Étape C. Amplification et détection

On lance l'amplification et la détection dans un appareil de PCR en temps réel en programmant les paramètres suivants :

- 1 cycle à 95 °C pendant 10 minutes (pour activer l'enzyme *Taq*) ;
- 40 cycles à 95 °C pendant 15 secondes (fusion) ; et
- 1 minute à 60 °C (pour l'hybridation et l'extension).

**N.B.** Jeter les plaques de réaction immédiatement après chaque épreuve sans ouvrir le joint scellé thermique afin de réduire le risque de contamination par les amplicons.

#### Étape D. Analyse et interprétation des résultats

Une fois l'épreuve terminée, analyser d'abord les résultats pour le détecteur FAM pour IS2404. Si nécessaire, déplacer manuellement la ligne de seuil pour qu'elle soit au-dessus du niveau du bruit de fond.

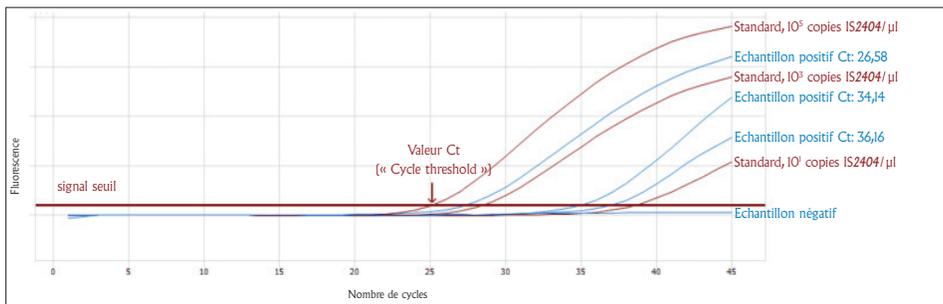
Répéter la procédure pour le détecteur VIC pour le témoin positif interne. En présence d'un signal FAM de forte intensité pour le dépistage de IS2404, une assignation négative ou un signal négatif, ou les deux, peuvent être obtenus pour le détecteur VIC pour le témoin positif interne. C'est la conséquence des concentrations d'amorces limitantes utilisées dans le test témoin interne.

On interprète donc les résultats pour chaque échantillon de la manière suivante.

Si le détecteur FAM pour IS2404 est	Et si le détecteur VIC pour le témoin positif interne est	Alors le résultat pour IS2404 est
+	+ / -	+
-	+	-
-	-	Possible inhibition

Pour les échantillons positifs pour IS2404, la valeur du cycle seuil pour le détecteur FAM représente le cycle auquel la courbe d'amplification franchit la ligne de seuil ; ceci donne une indication de la concentration d'ADN de *M. ulcerans* dans l'échantillon. La valeur du cycle seuil est inversement proportionnelle à la concentration d'ADN dans l'échantillon (autrement dit, une valeur de cycle seuil élevée indique une concentration d'ADN faible ; une valeur de cycle seuil faible indique une concentration d'ADN élevée). La *Figure 31* illustre les courbes d'amplification de la PCR quantitative en temps réel.

FIGURE 31. COURBES D'AMPLIFICATION POUR LA PCR QUANTITATIVE EN TEMPS RÉEL



(Avec l'aimable autorisation de Pieter Bomans, Miriam Eddyani et Koen Vandelanooote)

## 6.6 ASSURANCE DE LA QUALITÉ

Il est capital de respecter toutes les pratiques d'assurance de la qualité décrites à l'*Annexe 8* si l'on veut éviter les problèmes de contamination et les faux-positifs. Le diagnostic de l'ulcère de Buruli ne devra pas se faire par PCR si le laboratoire ne peut pas s'engager à prendre ces mesures de garantie de la qualité.

## ANNEXE 7: TECHNIQUES DE COLORATION EN HISTOPATHOLOGIE

### 7.1 LE FIXATEUR

Des détails sur les procédures de fixation sont donnés dans la section 4.6.2 du manuel.

Le fixateur connu sous le nom solution à 10 % de formol neutre tamponné est en réalité une solution de formaldéhyde à 4 % tamponnée : ce n'est pas une solution de formaldéhyde à 10 %. Historiquement, il était préparé en solution à 10 % obtenue à partir d'une solution-mère de formaldéhyde à 37-40 %. On peut se le procurer dans le commerce sous une forme prête à l'emploi, le « formol à 10 % tamponné », ou le préparer extemporanément à partir de para-formaldéhyde cristallin.

**N.B.** Le para-formaldéhyde est un produit dangereux. Un masque de protection, une paire de lunettes, des gants et une hotte **doivent** être utilisés pour le manipuler. C'est la raison pour laquelle on recommande l'achat de formol à 10 %, neutre tamponné.

### 7.2 MÉTHODE DE HARRIS À L'HÉMATOXYLINE-ÉOSINE (H & E) (SANS MERCURE)

**N.B.** On obtient avec cette méthode une coloration des éléments tissulaires et des bactéries bien plus intense qu'avec toute autre méthode H & E. De plus, l'utilisation de permanganate de potassium ( $\text{KMnO}_4$ ) à la place des sels de mercure est beaucoup moins dangereuse aussi bien pour l'environnement que pour la personne.

Cette méthode est employée pour les échantillons fixés dans une solution à 10 % de formol neutre tamponné, et pour des coupes de tissu de 4 à 6  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Le tissu témoin doit renfermer des noyaux, des structures cytoplasmiques, du tissu conjonctif et, si possible, des bactéries.

#### 7.2.1 SOLUTIONS

##### 7.2.1.1 Hématoxyline de Harris

Alun de potassium ou d'ammonium	100 g
Eau distillée	500 ml

Dissoudre à la chaleur.

Dans un récipient séparé, mélanger :

Hématoxyline en cristaux	5 g
Éthanol absolu	50 ml
Eau distillée	250 ml

Dissoudre (éventuellement à la chaleur).

Puis ajouter :

0.25% à $\text{KMnO}_4$	250 ml
-------------------------	--------

1. Agiter pendant au moins 3 minutes (jusqu'à dissolution complète).
2. Mélanger cette solution avec la solution d'alun.
3. Refroidir à l'eau courante.
4. Ajouter 20 ml d'acide acétique glacial (à 100 %).
5. Filtrer avant usage.

### 7.2.1.2 Solution de phloxine-éosine

#### *Acide-alcool à 1 %*

Éthanol à 95 %	736 ml
Eau désionisée	263,2 ml
HCl concentré	10 ml

**Mise en garde :** l'acide chlorhydrique (HCl) est un produit irritant et doit être manipulé avec précaution.

1. Ajouter l'eau désionisée dans l'alcool à 95 %.
2. Ajouter avec précaution l'acide chlorhydrique concentré dans la solution d'eau-éthanol, et non l'inverse.

**N.B.** Cette solution peut être gardée à température ambiante pendant très longtemps.

#### *Eau ammoniacquée*

Eau désionisée	1000 ml
Hydroxyde d'ammonium à 28 %	4 ml

**N.B.** Cette solution peut être gardée à température ambiante pendant très longtemps.

#### *Solution-mère d'éosine à 1 %*

Éosine Y (hydrosoluble)	1 g
Eau désionisée	100 ml

**N.B.** Cette solution peut être gardée à température ambiante pendant très longtemps.

#### *Solution-mère de phloxine à 1 %*

Phloxine B	1 g
Eau désionisée	100 ml

**N.B.** Cette solution peut être gardée à température ambiante pendant très longtemps.

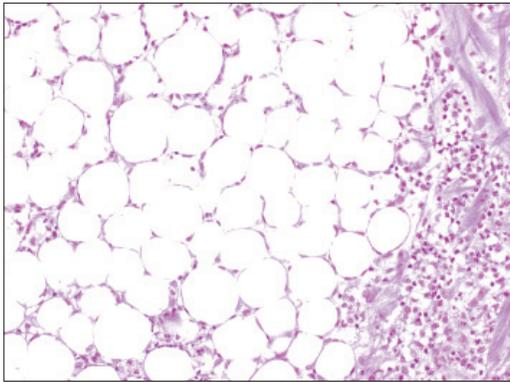
Pour préparer la solution de phloxine-éosine, mélanger :

Solution-mère d'éosine	100 ml
Solution-mère de phloxine	10 ml
Éthanol à 95 %	780 ml
Acide acétique glacial (à 100 %)	4 ml

**N.B.** Cette solution peut être gardée à température ambiante et se conserve environ 1 semaine.

La *Figure 32* montre une panniculite visible sur une coupe de tissu prélevé sur un ulcère de Buruli et coloré selon la méthode de Harris à l'hématoxyline-éosine.

**FIGURE 32. COUPE COLORÉE SELON LA MÉTHODE DE HARRIS À L'HÉMATOXYLINE-ÉOSINE METTANT EN ÉVIDENCE UNE PANNICULITE CHEZ UN CAS D'ULCÈRE DE BURULI**



Les noyaux des cellules apparaissent en bleu et le tissu conjonctif en rose. (Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

### 7.2.2 MODE OPÉRATOIRE POUR LA COLORATION

1. Déparaffiner les lames et les hydrater à l'eau.
2. Colorer pendant 10 minutes avec la solution de Harris à l'hématoxyline fraîchement filtrée.
3. Laver à l'eau chaude du robinet pendant 5 minutes.
4. Tremper deux fois dans l'acide-alcool à 1 % pour obtenir la différenciation.
5. Stopper la différenciation en trempant la lame dans de l'eau chaude du robinet puis dans une eau faiblement ammoniacquée ou saturée en carbonate de lithium jusqu'à ce que la coupe de tissu commence à prendre une teinte d'un bleu éclatant.
6. Laver à l'eau chaude du robinet pendant 10 minutes. **N.B.** Si la coloration du noyau est trop pâle, recommencer les étapes 2 à 6. Si le fond n'est pas clair, recommencer l'étape 4 mais en ne trempant la lame qu'une seule fois et rapidement dans la solution d'acide-éthanol. Puis recommencer les étapes 5 et 6.
7. Appliquer le colorant de fond de phloxine-éosine pendant 2 minutes.
8. Déshydrater la lame.
9. Éclaircir les lames en les plongeant successivement dans de l'éthanol à 95 % (deux fois, à chaque fois pendant 2 minutes), dans de l'éthanol à 100 % (deux fois, à chaque fois pendant 2 minutes), et dans du xylène (deux fois, à chaque fois pendant 2 minutes).
10. Monter à la résine.

### 7.3 MÉTHODE DE ZIEHL-NEELSEN POUR LES GERMES ACIDO-ALCOOLO RÉSISTANTS

**N.B.** On met en œuvre cette méthode pour établir la présence de micro-organismes acido-alcoolo résistants autres que *Nocardia* spp. ou le bacille de la lèpre.

Cette méthode est employée pour les échantillons fixés dans une solution à 10 % de formol neutre tamponné, et pour des coupes de tissu de 4 à 6  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les échantillons témoins devraient être des coupes contenant *M. tuberculosis* ou *M. ulcerans*.

### 7.3.1 SOLUTIONS

#### 7.3.1.1 Solution de fuchsine phéniquée de Ziehl–Neelsen

Phénol (cristaux fondus)	25 ml
Éthanol absolu	50 ml
Fuchsine basique	5 g
Eau désionisée	500 ml

**N.B.** Conserver dans un endroit chaud dans une pièce ou sur une étagère pour garder la solution à l'état liquide. Des réactifs bien préparés peuvent se conserver au moins 6 mois.

#### 7.3.1.2 Acide-alcool

Éthanol à 70 %	100 ml
HCl concentré	1 ml

**Mise en garde :** l'acide chlorhydrique (HCl) est un produit irritant et doit être manipulé avec précaution.

1. Ajouter avec précaution l'acide chlorhydrique concentré à l'éthanol à 70 %.
2. Il faut toujours verser doucement l'acide dans l'alcool et non l'inverse.
3. Conserver dans un flacon en verre teinté.

**N.B.** Cette solution peut être gardée à température ambiante pendant très longtemps.

#### 7.3.1.3 Solution de travail de bleu de méthylène

Cristaux de bleu de méthylène	3 g
Eau désionisée	600 ml

1. Dissoudre le chlorure de bleu de méthylène dans l'eau désionisée dans un flacon en verre teinté et hermétiquement bouché.
2. Étiqueter le flacon en indiquant le nom du réactif (solution de bleu de méthylène) et les dates de préparation et d'expiration.

**N.B.** La solution de bleu de méthylène peut se conserver à température ambiante pendant 12 mois.

### 7.3.2 MODE OPÉRATOIRE POUR LA COLORATION

1. Déparaffiner les lames et les hydrater avec de l'eau désionisée.
2. Appliquer la solution de fuchsine phéniquée pendant 30 minutes. **N.B.** Si les germes ne prennent pas la coloration, préparer une nouvelle solution de colorant.
3. Laver à l'eau froide pendant 10 minutes. **N.B.** Si l'eau est chlorée, laver moins longtemps. Rincer jusqu'à ce que l'eau soit claire.

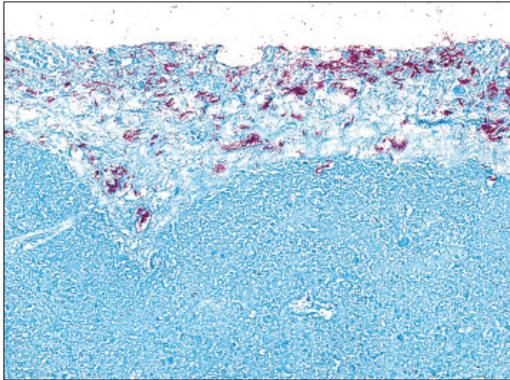
4. Différencier les lames individuellement à l'acide-alcool.
5. Laver les lames à l'eau courante pendant 3 minutes.
6. Procéder à la coloration du fond en trempant séparément chaque lame dans la solution de travail de bleu de méthylène, puis rincer à l'eau.
7. Déshydrater la lame.
8. Éclaircir les lames en les plongeant successivement dans de l'éthanol à 95 % (deux fois, à chaque fois pendant 2 minutes), dans de l'éthanol à 100 % (deux fois, à chaque fois pendant 2 minutes), et dans du xylène (deux fois, à chaque fois pendant 2 minutes).
9. Monter à la résine.

### 7.3.2.1 Résultats de la coloration

BAAR	Rouge
Fond	Bleu

La **Figure 33** montre une coupe d'un ganglion lymphatique provenant d'un patient atteint de l'ulcère de Buruli, colorée selon la méthode de Ziehl-Neelsen.

**FIGURE 33. COUPE DE GANGLION LYMPHATIQUE COLORÉ SELON LA MÉTHODE DE ZIEHL-NEELENSEN ET PROVENANT D'UN CAS D'ULCÈRE DE BURULI**



Les BAAR apparaissent en rouge et le fond tissulaire en bleu. (Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

## 7.4 MÉTHODE DE GROCOTT À LA MÉTHÉNAMINE ARGENTIQUE POUR LES CHAMPIGNONS

**N.B.** On met en œuvre cette méthode pour établir la présence de toutes sortes de champignons ; toutefois, *Histoplasma capsulatum* et *Nocardia asteroides* peuvent demander une exposition prolongée à la solution de méthénamine argentique.

Cette méthode est employée pour les échantillons fixés dans une solution à 10 % de formol neutre tamponné, et pour des coupes de tissu de 4 à 6 µm d'épaisseur. Le tissu témoin doit provenir d'une mycose connue et renfermer des éléments fongiques : il ne faut se servir d'un tissu provenant d'une histoplasmosse ou d'une nocardiose.

### 7.4.1 SOLUTIONS

#### 4% chromic acid

Trioxyde de chrome	4 g
Eau distillée	100 ml

**Mise en garde :** le trioxyde de chrome est un produit irritant.

**N.B.** Cette solution peut être gardée à température ambiante pendant très longtemps.

*Nitrate d'argent à 5 %*

Nitrate d'argent	5 g
Eau distillée	100 ml

**N.B.** Cette solution peut être gardée à température ambiante pendant très longtemps.

*Méthénamine à 3 % (également nommée hexaméthylènetétramine, hexamine, hexaméthylénamine)*

Méthénamine	30 g
Eau distillée	1000 ml

*Métabisulfite de sodium à 1 %*

Métabisulfite de sodium	1 g
Eau distillée	100 ml

*Chlorure d'or à 1 %*

Chlorure d'or jaune	5 g
Eau stérile	500 ml

*Chlorure d'or à 0,1 %*

Chlorure d'or à 1,0 %	10 ml
Eau stérile	90 ml

*Thiosulfate de sodium à 2 %*

Thiosulfate de sodium	2 g
Eau stérile	100 ml

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

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

**N.B.** On observe la formation immédiate d'un précipité blanc qui se dissout en remuant.

La solution limpide est stable pendant plusieurs mois si on la garde à 4 °C. Elle doit être conservée au réfrigérateur.

*Borate de sodium à 5 %*

Borate de soude (décahydraté)	50 g
Eau distillée	1000 ml

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

Solution-mère de méthénamine-nitrate d'argent	25 ml
Eau distillée	25 ml
Solution de borate de soude à 5 %	2 ml

N.B. Cette solution doit être préparée extemporanément pour chaque lot d'échantillons de tissu.

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

Vert lumière J (également connu sous l'appellation Cl n° 42095)	0,2 g
Eau distillée	100 ml
Acide acétique glacial (à 100 %)	0,2 ml

*Solution de travail de vert lumière J*

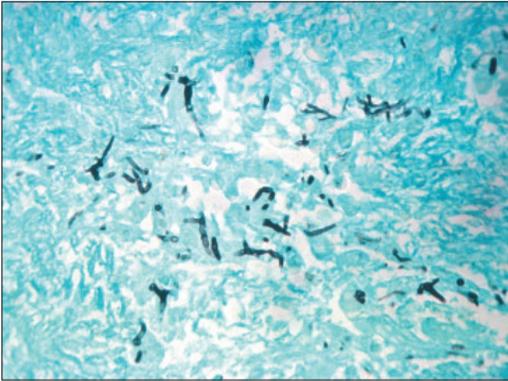
Solution-mère de vert lumière J	10 ml
Eau distillée	50 ml

## 7.4.2 MODE OPÉRATOIRE POUR LA COLORATION

1. Déparaffiner les lames et les hydrater à l'eau distillée.
2. Oxyder dans la solution d'acide chromique à 4 % pendant une heure.
3. Laver à l'eau pendant au moins 20 minutes. Les lames doivent être incolores.
4. Procéder à une réduction avec le métabisulfite de sodium à 1 % pendant 1 minute pour éliminer les chromates résiduels.
5. Laver à l'eau pendant au moins 5 minutes.
6. Rincer dans six bains successifs d'eau distillée.
7. Mettre dans la solution de méthénamine-nitrate d'argent préparée extemporanément et à l'étuve à 60 °C pendant 60 à 70 minutes ou jusqu'à ce que les coupes deviennent brunes (de la couleur du pain grillé). Vérifier au microscope afin de stopper la réaction avant que les lames ne soient trop colorées.
8. Rincer dans six bains successifs d'eau stérile.
9. Appliquer la solution de chlorure d'or à 0,1 % pendant 1 à 5 minutes. Vérifier au microscope : les champignons doivent apparaître noirs sur fond rose à gris.
10. Rincer à l'eau distillée.
11. Éliminer l'argent qui n'a pas réagi en mettant les lames 2 à 5 minutes dans la solution de thiosulfate de sodium à 2 %.
12. Laver soigneusement à l'eau.
13. Colorer le fond avec la solution-mère de vert lumière J à 0,2 % pendant 4 minutes.
14. Rincer à l'eau distillée.
15. Déshydrater.
16. Éclaircir les lames en les plongeant successivement dans de l'éthanol à 95 % (deux fois, à chaque fois pendant 2 minutes), dans de l'éthanol à 100 % (deux fois, à chaque fois pendant 2 minutes), et dans du xylène (deux fois, à chaque fois pendant 2 minutes).
17. Monter à la résine.

La **Figure 34** montre une coupe histologique d'un kyste phaeomycotique, imprégnée à la méthénamine argentique selon la méthode de Grocott.

**FIGURE 34. COUPE HISTOLOGIQUE D'UN KYSTE PHAEOMYCOTIQUE, IMPRÉGNÉE À LA MÉTHÉNAMINE ARGENTIQUE SELON LA MÉTHODE DE GROCOTT**



On observe des filaments noirs produits par l'agent causal, *Phialophora repens*. (Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

## 7.5 MÉTHODES DE BROWN-HOPPS POUR LES BACTÉRIES À GRAM POSITIF ET À GRAM NÉGATIF

**N.B.** Cette méthode permet de mettre en évidence de nombreuses bactéries à Gram positif et la plupart des bactéries à Gram négatif.

Cette méthode est employée pour les échantillons fixés dans une solution à 10 % de formol neutre tamponné, et pour des coupes de tissu de 4 à 6  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les tissus témoins doivent renfermer des germes à Gram positif et des germes à Gram négatif, et les meilleurs proviennent souvent des appendicites.

### 7.5.1 SOLUTIONS

#### *Cristal violet*

Cristal violet	1 g
Eau désionisée	100 ml

**N.B.** Cette solution peut être gardée à température ambiante pendant très longtemps.

#### *Solution d'iode de Gram*

Iode (cristaux)	1 g
Iodure de potassium	2 g
Eau désionisée	5 ml + 295 ml

Après dissolution complète de l'iode et de l'iodure de potassium dans 5 ml d'eau désionisée, rajouter 295 ml d'eau désionisée.

#### *Fuchsine basique à 1 %*

Fuchsine basique	1 g
Eau désionisée	100 ml

*Solution de Gallego*

Eau désionisée	100 ml
Formol concentré (à 37-40 %)	2 ml
Acide acétique glacial (à 100 %)	1 ml

*Acide picrique-acétone*

Acide picrique (sec, voir ci-dessous)	0,05 g
Acétone (déshydratée)	500 ml

Pour sécher l'acide picrique :

1. placer une couche d'acide picrique humide (plus que la quantité nécessaire) de moins de 2 mm d'épaisseur entre quatre grandes feuilles de papier filtre (deux en dessous et deux au-dessus) ;
2. exprimer autant d'eau que possible en faisant rouler une bouteille ou tout autre objet rond sur le papier filtre ;
3. après cette évacuation d'eau, peser la quantité voulue d'acide picrique ;
4. remettre le reste dans le flacon d'origine ;
5. utiliser immédiatement l'acide qui vient d'être pesé ;
6. avant de le jeter, rincer le papier filtre à l'eau courante jusqu'à ce que toute trace de couleur jaune ait disparu.

**N.B.** Il faut toujours garder les cristaux d'acide picrique dans l'eau pour éviter une explosion.

*Acétone-xylène*

Acétone	100 ml
Xylène	100 ml

## 7.5.2 MODE OPÉRATOIRE POUR LA COLORATION

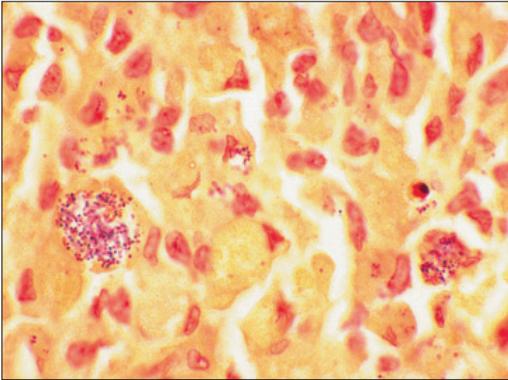
**N.B.** Utiliser un portoir horizontal pour les étapes 2 à 8 et des bacs de coloration pour toutes les autres étapes.

1. Déparaffiner les lames et les hydrater avec de l'éthanol à 95 %.
2. Déposer 15 à 20 gouttes de solution de cristal violet à 1 % sur chaque lame. Laisser en contact 1 à 2 minutes, et remuer doucement.
3. Rincer à l'eau.
4. Mettre les lames dans la solution d'iode de Gram pendant 1 minute.
5. Rincer à l'eau.
6. Décolorer les lames à l'acétone jusqu'à ce que les derniers vestiges de coloration au cristal violet commencent à disparaître.
7. Laver immédiatement et soigneusement les lames à l'eau.
8. Verser de la fuchsine basique à 1 % sur les lames et la laisser en contact 5 minutes.
9. Rincer les lames à l'eau.
10. Mettre les lames dans la solution de Gallego pendant 60 secondes et agiter vigoureusement. Recommencer une fois.
11. Rincer les lames à l'eau.
12. Mettre les lames dans l'acétone pendant 30 secondes.

13. Mettre les lames dans la solution d'acide picrique-acétone pendant 2 à 3 minutes.
14. Mettre les lames dans la solution d'acétone-xylène pendant 30 secondes. Recommencer une fois.
15. Éclaircir les lames en les plongeant dans du xylène (deux fois, à chaque fois pendant 2 minutes).
16. Monter à la résine.

La *Figure 35* montre un tissu infecté par des *Rhodococcus* spp., après coloration de Gram selon Brown-Hopps.

FIGURE 35. COLORATION DE GRAM SELON BROWN-HOPPS D'UN TISSU INFECTÉ PAR *RHODOCOCCUS* SPP.



À noter plusieurs groupes de bactéries colorées en bleu (à Gram positif). (Avec l'aimable autorisation de Wayne Meyers)

## 7.6 COLORATION À L'ACIDE PERIODIQUE-SCHIFF (PAS) POUR LES CHAMPIGNONS

**N.B.** Cette méthode est employée pour mettre en évidence le glycogène et les champignons ; elle est également utile pour le diagnostic différentiel de l'ulcère cutané.

### 7.6.1 SOLUTION

#### Acide periodique à 0,5 %

Acide periodique	0,5 g
Eau distillée	100 ml

#### Eau sulfureuse

Eau distillée	180 ml
1N HCl	10 ml
Métabisulfite de sodium à 10 %	10 ml

#### Bisulfite de sodium à 10 %

Métabisulfite de sodium	1 g
Eau distillée	10 ml

*Réactif de Schiff*

Fuchsine basique	1 g
Eau distillée (bouillante)	200 ml

*HCl 1 N 20 ml*

Métabisulfite de sodium	1 g
Charbon activé déshydraté	2 g

1. Agiter ensemble les deux premiers éléments vigoureusement.
2. Refroidir jusqu'à 50 °C.
3. Filtrer.
4. Ajouter 20 ml de HCl 1 N au réactif de Schiff.
5. Refroidir jusqu'à 25 °C.
6. Ajouter 1 g de métabisulfite de sodium dans la solution.
7. Laisser au repos à l'obscurité pendant 24 heures dans un flacon propre et hermétiquement bouché.
8. Ajouter à la solution 2 g de charbon activé déshydraté.
9. Agiter 3 minutes.
10. Filtrer.
11. La solution doit être limpide.
12. Conserver à 4 °C dans une bouteille recouverte de papier d'aluminium.

*Eau ammoniacuée*

Eau désionisée	1000 ml
Hydroxyde d'ammonium à 28 %	5 ml

*Éthanol-formol*

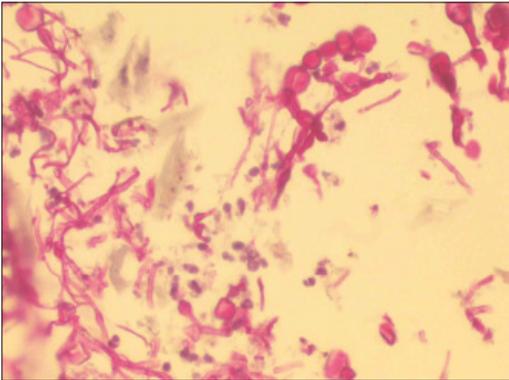
Éthanol à 100 %	40 ml
Formol à 4 %	160 ml

La *Figure 36* montre des éléments fongiques dans un ulcère cutané coloré selon la méthode de l'acide periodique-Schiff.

**7.6.2 MODE OPÉRATOIRE POUR LA COLORATION**

1. Déparaffiner les lames et les hydrater :
  - 1.a. au toluène pendant 5 minutes (trois bains successifs de 5 minutes chacun) ;
  - 1.b. à l'alcool à 80 % pendant 5 minutes ;
  - 1.c. à l'éthanol-formol pendant 5 minutes ;
  - 1.d. à l'eau courante.
2. Oxyder avec l'acide periodique à 0,5 % pendant 15 minutes.
3. Rincer à l'eau courante.

FIGURE 36. ÉLÉMENTS FONGIQUES DANS UN ULCÈRE CUTANÉ COLORÉ À L'ACIDE PERIODIQUE-SCHIFF (PAS) ET EXAMINÉ À FORT GROSSISSEMENT



(Avec l'aimable autorisation de Jean-Jacques Roux)

4. Colorer avec le réactif de Schiff pendant 15 minutes, puis rincer à l'eau chaude (environ 60 °C) pendant environ 10 minutes pour développer la couleur rose.
5. Plonger la lame dans une solution d'eau sulfureuse pendant 10 secondes (trois bains successifs de 10 secondes chacun).
6. Laver à l'eau courante pendant 5 minutes.
7. Appliquer le colorant de fond d'hématoxyline de Mayer pendant 5 minutes (l'hématoxyline de Mayer peut s'acheter sous forme de réactif prêt à l'emploi).
8. Laver à l'eau courante.
9. Plonger la lame dans de l'eau ammoniaquée diluée à 0,5 % pendant 1 minute.
10. Laver à l'eau courante.
11. Déshydrater dans l'éthanol à 100 % pendant 1 minute (trois bains successifs de 1 minute chacun).
12. Passer dans le toluène (deux bains de 1 minute chacun).
13. Monter à la résine.

### 7.6.3 RÉSULTATS DE LA COLORATION

Noyaux	Bleu
Champignons	Rouge
Fond	Rose or pourpre

## 7.7 IMMUNOHISTOCHIMIE

**N.B.** Cette technique est employée pour colorer des antigènes spécifiques grâce à une interaction anticorps-antigène spécifique.

Cette méthode est employée pour les échantillons qui ont été fixés pendant 24 heures dans une solution à 10 % de formol neutre tamponné, et pour des coupes de tissu de 4 à 6 µm d'épaisseur.

## 7.7.1 SOLUTIONS

*Solution de tampon phosphate (PBS)*

Chlorure de sodium (NaCl)	8 g
Chlorure de potassium (KCl)	0,2 g
Phosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,2 g
Hydrogénophosphate disodique dihydraté (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	1,42 g
Eau distillée	1000 ml

Ajuster le pH à 7,2.

**N.B.** Préparer une nouvelle solution à chaque fois.

**Tampon de prétraitement : EDTA***EDTA working solution*

Solution du sel disodique de l'acide éthylènediaminetétraacétique 0.5M	1,4 ml
Eau distillée	700 ml

Ajuster le pH à 8.

**N.B.** Préparer une nouvelle solution à chaque fois.

**Tampon de prétraitement : citrate***Solution-mère d'acide citrique 0,1 M*

Acide citrique	19,2 g
Eau distillée	1000 ml

**N.B.** Cette solution peut se conserver à 4 °C pendant 6 mois.

*Solution-mère de citrate de sodium 0,1 M*

Citrate de sodium dihydraté	29,4 g
Eau distillée	1000 ml

**N.B.** Cette solution peut se conserver à 4 °C pendant 6 mois.

*Solution de travail*

Solution-mère d'acide citrique 0,1 M	14 ml
Solution-mère de citrate de sodium 0,1 M	56 ml
Eau distillée	630 ml

Ajuster le pH à 6.

**N.B.** Préparer une nouvelle solution de travail à chaque fois.

**Tampon de prétraitement : trypsine***Solution-mère de tampon trypsine*

NaCl	0,44 g
Chlorhydrate de trisaminométhane	0,4 g
Chlorure de calcium	0,05 g
Eau distillée	50 ml

Ajuster le pH à 7,8.

N.B. Cette solution peut se conserver à 4 °C pendant 6 mois.

*Solution-mère de trypsine à 2 %*

Trypsine bovine	0,02 g
Solution-mère de tampon trypsine	1 ml

N.B. Préparer la solution, et la fractionner rapidement en aliquotes de 50 µl à conserver à -20 °C pour éviter l'auto-digestion.

*Solution de travail*

Solution-mère de trypsine à 2 % (à -20 °C)	50 µl
Solution-mère de tampon trypsine	950 µl

N.B. Préparer immédiatement avant usage.

*Peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 0,3 %*

Peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) à 30 %	2 ml
Eau distillée	200 ml

N.B. Préparer une nouvelle solution à chaque fois, et utiliser immédiatement.

*Solution de blocage*

Sérum animal	15 µl
Solution de tampon phosphate	1 ml

Utiliser du sérum de l'animal qui a servi à produire l'anticorps secondaire.

N.B. Préparer une nouvelle solution à chaque fois.

*Solution-mère de tampon de dilution de l'anticorps 1°*

Tween-20	100 µl
Solution de tampon phosphate	1 ml

**N.B.** Cette solution peut se conserver à 4 °C pendant 6 mois.

Solution de travail

*Tampon de dilution de l'anticorps 1°*

Solution-mère de tampon de dilution de l'anticorps 1°	10 µl
Solution de tampon phosphate	1 ml

**N.B.** Préparer une nouvelle solution à chaque fois.

*Tampon de dilution de l'anticorps 2°*

Sérum animal	15 µl
Solution de tampon phosphate	1 ml

Utiliser du sérum de l'animal qui a servi à produire l'anticorps secondaire.

**N.B.** Préparer une nouvelle solution à chaque fois.

*Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories, numéro au catalogue : PK-6100)*

Solution de tampon phosphate	2,5 ml
Réactif A	1 goutte
Réactif B	1 goutte

**N.B.** Préparer la solution ABC 30 minutes avant usage.

*Vector NovaRED Peroxidase Substrate Kit (Vector Laboratories, numéro au catalogue : SK-4800)*

Eau distillée	5 ml
Réactif 1	3 gouttes
Réactif 2	2 gouttes
Réactif 3	2 gouttes
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (included in the kit)	2 gouttes

**N.B.** Préparer la solution de coloration NovaRED immédiatement avant usage.

*Hématoxyline de Mayer*

Sulfate de potassium et d'aluminium (alun de potassium)	50g
Eau distillée	1000 ml
Hématoxyline	1 g
Iodate de sodium	0,2 g
Acide acétique glacial (à 100 %)	20 ml

N.B. Après dissolution complète de l'hématoxyline, ajouter l'iodate de sodium et l'acide acétique.

N.B. Porter brièvement la solution à ébullition. Filtrer si nécessaire.

N.B. La solution d'hématoxyline de Mayer peut être réutilisée au moins 10 fois.

## 7.7.2 MODE OPÉRATOIRE POUR LA COLORATION

N.B. Utiliser une chambre humide pour le prétraitement à la trypsine, et pour les étapes 6 à 12.

1. Déparaffiner les lames et les hydrater à l'eau.
2. Étape de prétraitement : la détection de nombreux antigènes peut être améliorée grâce à des techniques de prétraitement qui démasquent des sites antigéniques normalement cachés. De ce fait, il sera nécessaire de comparer les résultats de différentes procédures de démasquage antigénique s'il s'avère que la coloration avec une combinaison particulière d'antigène et d'anticorps n'est pas satisfaisante sans prétraitement.
  - a. Pas de prétraitement
    - i. Passer à l'étape 3.
  - b. Prétraitement à l'EDTA
    - i. Chauffer les lames mises dans le tampon EDTA dans un four à micro-ondes jusqu'à ce que le liquide commence à bouillir.
    - ii. Arrêter le chauffage et attendre 5 minutes, en laissant les lames dans le four.
    - iii. Recommencer les étapes i et ii trois fois au total.
    - iv. Laisser les lames refroidir pendant 20 minutes dans le tampon EDTA.
    - v. Refroidir lentement les lames en ajoutant de l'eau distillée sur une durée de 5 minutes.
    - vi. Passer à l'étape 3.
  - c. Prétraitement au tampon citrate
    - i. Chauffer les lames mises dans le tampon citrate dans un four à micro-ondes jusqu'à ce que le liquide commence à bouillir.
    - ii. Arrêter le chauffage et attendre 5 minutes, en laissant les lames dans le four.
    - iii. Recommencer les étapes i et ii deux fois au total.
    - iv. Laisser les lames refroidir pendant 20 minutes dans le tampon citrate.
    - v. Refroidir lentement les lames en ajoutant de l'eau distillée sur une durée de 5 minutes.
    - vi. Passer à l'étape 3.
  - d. Prétraitement à la trypsine
    - i. Recouvrir la coupe tissulaire entière en ajoutant une grosse goutte de solution de travail de trypsine sur chaque lame de tissu dans une chambre humide.
    - ii. Incuber pendant 30 minutes.
    - iii. Passer à l'étape 3.
3. Laver les lames dans du tampon phosphate pendant 1 minute ; effectuer cette opération trois fois au total.

4. Bloquer la peroxydase endogène en mettant les lames dans de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 0,3 % pendant 20 minutes.
5. Laver les lames dans du tampon phosphate pendant 1 minute ; effectuer cette opération trois fois au total.
6. Recouvrir la coupe tissulaire entière en ajoutant une grosse goutte de solution de blocage sur chaque lame ; attendre 30 minutes. **N.B.** Habituellement, un volume de 100 µl de solution est suffisant pour 1 coupe tissulaire. Un stylo spécial bloquant les liquides doit être appliqué autour des coupes de tissu.
7. Éliminer l'excès de solution de blocage avec un mouchoir en tissu.
8. Ajouter la dilution appropriée de l'anticorps primaire dilué dans du tampon de dilution de l'anticorps 1° ; incuber pendant 1 heure à température ambiante ou aussi longtemps qu'une nuit entière à 1 °C, selon l'anticorps utilisé.
9. Laver les lames dans du tampon phosphate pendant 1 minute ; recommencer cette étape de lavage trois fois au total.
10. Ajouter l'anticorps secondaire biotinylé dilué dans du tampon de dilution de l'anticorps 2° ; incuber pendant 30 minutes.
11. Laver les lames dans du tampon phosphate pendant 1 minute ; recommencer cette étape de lavage trois fois au total.
12. Ajouter la solution ABC prémélangée ; incuber pendant 30 minutes. **N.B.** Préparer la solution ABC 30 minutes avant usage.
13. Laver les lames dans du tampon phosphate pendant 1 minute ; recommencer cette étape de lavage deux fois au total.
14. Laver les lames à l'eau distillée pendant 1 minute.
15. Ajouter la solution de coloration NovaRED préparée extemporanément, et suivre au microscope l'apparition d'un précipité rouge-brun. **N.B.** L'apparition du précipité peut prendre de 30 secondes à 10 minutes selon l'anticorps utilisé.
16. Arrêter la réaction en rinçant les lames à l'eau distillée.
17. Colorer le fond en appliquant la solution d'hématoxyline de Mayer pendant 17 secondes.
18. Incuber les lames 3 minutes dans de l'eau du robinet (et non dans l'eau distillée) pour développer la couleur.
19. Rincer rapidement à l'eau distillée.
20. Sécher les lames.
21. Monter à la résine.

## 7.8 RECOMMANDATIONS POUR LA CONSERVATION DES BLOCS DE PARAFFINE ET DES LAMES

Pour permettre l'utilisation des blocs de paraffine et des lames dans les analyses de contrôle de la qualité ou dans des études complémentaires, il est important de bien organiser leur stockage. Un numéro d'identification, commun avec celui du dossier du patient et avec celui des échantillons sur les blocs et les lames, permettra d'identifier facilement chaque spécimen.

### 7.8.1 CONSERVATION DES BLOCS DE PARAFFINE

Les blocs de paraffine doivent être conservés de façon organisée ; par exemple, on peut les classer et les stocker dans un ordre chronologique, d'après leur date de réception. Les systèmes de stockage doivent permettre de les retrouver facilement ; ces systèmes peuvent par exemple comporter des étagères clairement étiquetées ou des boîtes bien rangées et étiquetées.

La température de la zone de stockage doit être suffisamment basse pour éviter que la paraffine ne fonde (donc inférieure à 45 °C). La durée de stockage doit être conforme aux recommandations nationales (par exemple, en France la durée de stockage imposée pour les blocs est de 30 ans).

## 7.8.2 CONSERVATION DES LAMES

Les lames également peuvent être archivées par ordre chronologique pour pouvoir être retrouvées facilement. Les différentes lames d'un même patient peuvent être rangées ensemble. Les lames peuvent être stockées au même endroit que les blocs de paraffine. Toutefois, au bout de 10 ans, on considère que les lames ont perdu leur coloration et doivent être détruites ; de nouvelles lames préparées à partir du bloc de paraffine pourront être utilisées.

## ANNEXE 8 : ASSURANCE DE LA QUALITÉ

### 8.1. CONTRÔLE INTERNE DE LA QUALITÉ

Le contrôle de la qualité (ou CQ) est un ensemble de procédures qui contribue à garantir l'exactitude, la fiabilité et la reproductibilité des résultats obtenus par un laboratoire. Les démarches du contrôle de la qualité doivent être effectuées périodiquement et, pour être efficace, le processus doit être pratique et intégré d'emblée dans les pratiques de notification normalisées de chaque laboratoire. Tous les techniciens de laboratoire sont responsables de l'exécution, de l'enregistrement et de la notification des résultats des analyses du contrôle de la qualité.

De nombreux éléments du CQ font partie des procédures pratiques de routine, ou s'inscrivent dans le cadre de la gestion normale du laboratoire.

Les analyses du contrôle de la qualité se concentrent généralement sur six grands domaines :

- l'aménagement et l'administration du laboratoire ;
- le matériel de laboratoire ;
- les échantillons et formulaires de demande ;
- les réactifs ;
- les analyses de laboratoire ;
- l'enregistrement et la notification des résultats.

#### 8.1.1 AMÉNAGEMENT ET ADMINISTRATION DU LABORATOIRE

Tous les laboratoires doivent prendre en compte les points suivants lorsqu'il s'agit d'évaluer l'efficacité de leurs aménagements et de leur fonctionnement administratif.

- Veiller à ce que toutes les portes du laboratoire soient toujours fermées. Les espaces de travail, le matériel et les fournitures doivent être organisés de manière à faciliter la planification et l'exécution des tâches dans un ordre logique et efficace.
- Les zones de travail doivent être exemptes de poussières. Les paillasse doivent être nettoyées au moins une fois par jour avec une solution désinfectante appropriée.
- Les procédures de laboratoire doivent se conformer aux lignes directrices appropriées.
- Chaque procédure exécutée dans le laboratoire doit être menée conformément aux modes opératoires normalisés correspondants.
- Des copies écrites des modes opératoires normalisés doivent être conservées au laboratoire, et tout le personnel autorisé doit y avoir accès facilement.
- Le responsable du laboratoire doit signer et écrire la date de tout changement apporté aux modes opératoires.
- Les membres du personnel doivent posséder la formation nécessaire, et leur performance doit être surveillée périodiquement.
- Dans un laboratoire qui pratique la PCR, les procédures d'extraction, les procédures pré-PCR, les procédures de PCR et les activités post-PCR doivent être conduites dans des zones strictement séparées (pour plus de détails, se reporter à la discussion du principe des trois salles exposé à l'*Annexe 6*, section 6.1).

#### 8.1.2 MATÉRIEL DE LABORATOIRE

En ce qui concerne le matériel de laboratoire, il faut prendre en compte les points suivants.

- Les manuels d'utilisation et les instructions de nettoyage pour tous les équipements doivent être faciles d'accès ; ce qui inclut les instructions et les manuels pour les appareils suivants : microscope, balance, hotte à flux laminaire, thermocycleur, centrifugeuse, incubateur ou étuve, réfrigérateur et congélateur.

- Il faut tenir à jour un registre contenant les dates de mise en service et d'entretien de tous les équipements.
- Le matériel doit être régulièrement inspecté pour s'assurer de la régularité de ses performances.

### 8.1.3 ÉCHANTILLONS ET FORMULAIRES DE DEMANDE

En ce qui concerne la manipulation des échantillons au laboratoire et la gestion des formulaires de demande, il faut prendre en compte les points suivants :

- Les analyses ne doivent être effectuées que sur demande écrite d'une personne autorisée.
- Il ne faut pas lancer une analyse si elle a été demandée verbalement, sauf si cette demande verbale s'accompagne d'un formulaire de demande dûment rempli.
- Le personnel doit insister pour que les formulaires de demande soient convenablement remplis et pour que les échantillons soient correctement étiquetés. Cette démarche permet de garantir l'association correcte de chaque échantillon au patient correspondant.
- Veiller à ce que les échantillons soient rejetés s'ils ne peuvent pas être convenablement identifiés, s'ils fuient, ou s'ils se présentent dans des récipients cassés. Dans ce cas, demander à ce que le prélèvement soit refait (nouvel échantillon).
- Veiller à ce que le personnel enregistre la date à laquelle les échantillons arrivent au laboratoire. Le personnel doit également noter sur le formulaire de demande tout retard de livraison des échantillons.
- Il revient au personnel d'évaluer la qualité des échantillons reçus. Il doit également enregistrer et surveiller le nombre d'échantillons reçus par le laboratoire.

### 8.1.4 RÉACTIFS

En ce qui concerne la manipulation des réactifs au laboratoire, il faut prendre en compte les points suivants :

- Étiqueter tous les réactifs en indiquant leur nom, leur date de préparation, et leur date de première ouverture ou utilisation.
- Si les réactifs ont été préparés dans un autre laboratoire, indiquer la date à laquelle ils ont été reçus.
- Tout produit qui s'avère non satisfaisant doit être enregistré. Retirer ce produit du laboratoire immédiatement pour qu'il ne soit pas utilisé.
- Garder un stock de produits pour 6 mois seulement. Faire tourner le stock pour être sûr d'utiliser en premier le produit le plus ancien.

### 8.1.5 ANALYSES DE LABORATOIRE

Les analyses de contrôle interne de la qualité doivent faire partie intégrante du fonctionnement normal du laboratoire ; elles sont utilisées pour surveiller la performance de tous les tests.

#### 8.1.5.1. Examen direct des frottis

- Veiller à inclure à la fois des témoins positifs et des témoins négatifs au moins une fois par semaine dans les examens de microscopie.
- Écarter comme témoins les types de lames suivants :
  - les lames où le témoin positif n'est pas coloré en rouge ;
  - les lames où le témoin négatif reste rouge après décoloration ;
  - les lames où le fond ne s'est pas correctement décoloré.
- Faire en sorte que les problèmes apparus sur les frottis témoins soient résolus avant de notifier les résultats des frottis des patients.

- Les résultats de la microscopie doivent être comparés aux résultats de la PCR. Les échantillons de PCR négatifs ne donnent quasiment jamais de frottis positifs à cause des différences de sensibilité de ces tests. Un échantillon qui est négatif d'après la PCR mais positif à l'examen du frottis peut être le résultat d'une PCR faussement négative, d'un frottis faussement positif ou, rarement, d'une lésion due à une mycobactérie autre que *M. ulcerans* (telle que *M. tuberculosis*, *M. chelonae*, *M. marinum*, *M. haemophilum*).

### 8.1.5.2 Amplification génique (PCR)

- Veiller à inclure à la fois des témoins d'extraction positifs (contenant une suspension bactérienne très diluée dans de l'eau de qualité biologie moléculaire) et des témoins d'extraction négatifs (contenant seulement de l'eau de qualité biologie moléculaire) dans chaque lot d'extraction d'ADN.
- Veiller à inclure des témoins de PCR positifs (contenant une solution diluée d'ADN génomique de *M. ulcerans*, qui dans une réaction PCR en gel donnerait une bande faible, ou dans une réaction PCR en temps réel donnerait une valeur de Ct de 25-30) et des témoins de PCR négatifs (contenant seulement de l'eau de qualité biologie moléculaire) dans chaque essai de PCR.
- Si n'importe lequel des témoins produit un résultat incorrect, c'est le lot entier d'extraction ou de PCR qui doit être jeté et l'essai recommencé.
- Les résultats suivants sont considérés comme inacceptables pour les témoins :
  - si le témoin d'extraction positif est négatif, il se peut alors qu'il y ait un problème avec l'extraction d'ADN ou la PCR ;
  - si le témoin d'extraction négatif est positif, cela veut dire qu'il y a eu contamination pendant l'extraction d'ADN ou la PCR ;
  - si le témoin de PCR positif est négatif, cela veut dire qu'il y a eu un problème pendant la PCR ;
  - si le témoin de PCR négatif est positif, cela veut dire qu'il y a eu contamination pendant la PCR.
- Les problèmes apparus avec les témoins d'extraction d'ADN ou les témoins de PCR doivent impérativement être résolus avant d'analyser les échantillons des patients et de notifier leurs résultats.
- Veiller à comparer les résultats de la PCR aux résultats de la microscopie et de la culture. Un échantillon qui est négatif d'après la PCR mais positif d'après l'examen du frottis ou la culture pourrait être un faux-négatif de PCR ou un faux-positif de frottis ou de culture. Il se peut également que les cultures ou frottis positifs découlent de la présence d'une autre espèce mycobactérienne dans la lésion (telle que *M. tuberculosis*, *M. chelonae*, *M. marinum*, *M. haemophilum*).
- Veiller à exclure les résultats faux-négatifs causés par l'inhibition de la réaction PCR, en réalisant chaque réaction PCR traditionnelle en double. Dans ce système, le premier tube contient seulement l'échantillon. Le second tube contient l'échantillon auquel de l'ADN purifié de *M. ulcerans* a été ajouté. Si le tube contenant le rajout d'ADN purifié (tube témoin d'inhibition) est négatif, cela veut dire que la réaction PCR a été inhibée. Dans la PCR en temps réel, un témoin positif interne exogène pour TaqMan, disponible dans le commerce, est incorporé dans chaque réaction pour garantir qu'un résultat négatif pour un échantillon particulier est vraiment négatif pour IS2404 et n'est pas causé par des inhibiteurs de la PCR. On peut souvent surmonter cette difficulté pour les échantillons cliniques en recommençant la PCR avec une dilution au 1/10 (ou 1/100) de l'échantillon d'ADN extrait.
- Faire en sorte que toute contamination dans le laboratoire soit rapidement suivie de mesures correctrices. La surveillance du problème de contamination dans les laboratoires pratiquant la PCR passe par l'utilisation systématique de témoins négatifs pour tous les travaux de PCR, et par l'analyse, une fois par an, d'échantillons exposés à l'environnement. Pour ce faire, six microtubes contenant chacun 400 µl de tampon Tris 1x plus EDTA sont placés ouverts dans les enceintes de sécurité biologique de la salle pré-PCR (salle 1), la salle 2 et sur le plan de travail de la pièce contenant le thermocycleur (salle 3) pendant environ 24 heures ; autrement dit :
  - deux tubes sont placés dans l'enceinte de préparation du mélange réactif de PCR (salle 1) ;
  - deux tubes sont placés dans l'enceinte d'extraction d'ADN (salle 2) ;
  - deux tubes sont placés dans la pièce contenant le thermocycleur (salle 3) ;
  - un volume de 5 µl de chacun de ces six tubes est analysé par PCR.

### 8.1.5.3 Cultures

- Les taux de contamination doivent être vérifiés une fois par mois. S'ils sont supérieurs à 5 %, la stérilité des réactifs, des milieux et de la hotte à flux laminaire doit être contrôlée. La qualité des spécimens reçus peut également influencer les taux de contamination, de même que la méthode de décontamination utilisée (par exemple, les méthodes à l'acide oxalique donnent moins de contamination que la méthode de Petroff modifiée).
- Comparer les résultats des cultures aux résultats de la PCR. Les échantillons positifs d'après la culture mais négatifs d'après la PCR laissent à penser que les cultures sont des faux-positifs, que les résultats de la PCR sont des faux-négatifs, ou qu'une mycobactérie autre que *M. ulcerans* a été cultivée.

### 8.1.5.4 Histopathologie

- Des témoins doivent être inclus pour vérifier l'efficacité de tous les réactifs de coloration. Les tissus témoins particuliers à utiliser sont détaillés à l'*Annexe 7*.

## 8.1.6 ENREGISTREMENT ET NOTIFICATION DES RÉSULTATS

- Veiller à ce que les résultats soient transmis dès qu'ils ont été validés. Surveiller les éventuels retards dans le traitement des échantillons ou dans l'obtention des résultats, et noter ces retards sur la fiche de compte-rendu.
- Analyser les résultats tous les mois pour détecter d'éventuels changements qui pourraient révéler l'existence d'un problème.
- Tous les résultats doivent être enregistrés selon un format normalisé dans un registre de laboratoire.
- Tous les enregistrements et les dossiers doivent être conservés pendant au moins 2 ans.

## 8.2 ÉVALUATION EXTERNE DE LA QUALITÉ

Le but d'une évaluation externe de la qualité (ou EEQ) est d'aider les laboratoires à identifier leurs erreurs et à améliorer leurs pratiques pour qu'ils deviennent plus performants. Participer à une évaluation externe de la qualité ne doit pas être considéré comme une menace, mais plutôt comme l'occasion de relever le niveau des prestations. La plupart des techniciens de laboratoire ont la volonté de réaliser des analyses exactes. Si le laboratoire remplit bien ses tâches pendant une évaluation externe de la qualité, le personnel sera alors assuré de contribuer efficacement au diagnostic de l'ulcère de Buruli et à la lutte contre cette maladie.

Trois méthodes peuvent être utilisées pour évaluer la performance d'un laboratoire :

- une évaluation sur site ;
- l'analyse d'un panel d'échantillons, également désigné sous le terme de « panel testing » ;
- un réexamen à l'aveugle des échantillons (révérification des résultats).

Il existe des évaluations externes de la qualité en microscopie organisées par des programmes nationaux de lutte contre la tuberculose ; les programmes de lutte contre l'ulcère de Buruli devront collaborer avec ces programmes pour s'assurer que le diagnostic de l'ulcère de Buruli respecte les normes en matière de microscopie.

En ce qui concerne la PCR, l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (Belgique), un centre collaborateur de l'OMS, organise régulièrement des évaluations externes de la qualité comprenant des essais d'aptitude qui font appel à un panel d'échantillons codés. Cette démarche consiste à envoyer aux laboratoires nationaux toute une série d'échantillons négatifs et positifs à analyser. L'EEQ par analyse de panels d'échantillons est l'occasion pour les laboratoires de comparer leurs performances, et peut rassurer les techniciens quant à leur capacité à obtenir les mêmes résultats que leurs autres collègues techniciens.

ANNEXE 9 :  
FORMULAIRES UTILES

## 9.1. BU 01: FICHE CLINIQUE ET THÉRAPEUTIQUE POUR L'ULCÈRE DE BURULI – NOUVEAU CAS

## Fiche clinique et thérapeutique pour l'ulcère de Buruli – Nouveaux cas

UB 01

Nom de rétablissement de soins : _____		Date du diagnostic clinique <b>ou</b> de l'admission (jj/mm/aa) : ____/____/____																																	
Nom de l'agent responsable des soins : _____		Date de cicatrisation complète (jj/mm/aa) : ____/____/____																																	
Nom du patient : _____		Age (en années) : _____ Sexe : <input type="checkbox"/> Masculin <input type="checkbox"/> Féminin																																	
Adresse (village ou quartier) : _____		N° de dossier : _____																																	
Province/Région/Département : _____		District : _____																																	
		Pays : _____																																	
		Poids (en kg) : _____ Profession : _____																																	
<b>HISTORIQUE CLINIQUE DE LA MALADIE</b>		<b>FORMES CLINIQUES</b>																																	
Durée de la maladie avant la consultation (en semaines) : _____		<input type="checkbox"/> Nodule (N) <input type="checkbox"/> Plaque (Q)																																	
Recours à la médecine traditionnelle : <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		<input type="checkbox"/> Ancien patient <input type="checkbox"/> Ulcère (U)																																	
Existence d'une limitation de mouvements articulaires : <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		<input type="checkbox"/> Enseignant <input type="checkbox"/> Ulcère (U)																																	
Traitement antérieur à la streptomycine : <input type="checkbox"/> Oui (nombre de jours : _____) <input type="checkbox"/> Non		<input type="checkbox"/> Autre (préciser) : _____																																	
		<input type="checkbox"/> Relais communautaire																																	
<b>CATEGORIES</b>		<input type="checkbox"/> <b>Catégorie III</b> : lésion unique > 15 cm de diamètre, lésions multiples, lésions aux localisations délicates et ostéomyélites																																	
<input type="checkbox"/> <b>Catégorie I</b> : lésion unique ≤ 5 cm de diamètre		<b>LOCALISATIONS DELICATES</b>																																	
<input type="checkbox"/> Membre supérieur (MS) <input type="checkbox"/> Abdomen (AB) <input type="checkbox"/> Fesses et périnée (FE)		<input type="checkbox"/> Œil <input type="checkbox"/> Seins <input type="checkbox"/> Organes génitaux externes																																	
<input type="checkbox"/> Membre inférieur (MI) <input type="checkbox"/> Dos (DO) <input type="checkbox"/> Thorax (TH) <input type="checkbox"/> Tête et cou (TC)																																			
<b>CONFIRMATION BIOLOGIQUE</b>																																			
Prélèvement(s) fait(s) : <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non — Date du(des) premier(s) prélèvement(s) : ____/____/____		<b>Résultats</b>																																	
Type(s) de prélèvement(s) : <input type="checkbox"/> Ecouvillon <input type="checkbox"/> Aspiration par aiguille fine (AAF) <input type="checkbox"/> Biopsie		<input type="checkbox"/> ZN : <input type="checkbox"/> Positif <input type="checkbox"/> Négatif <input type="checkbox"/> Positif <input type="checkbox"/> Négatif																																	
		<input type="checkbox"/> PCR : <input type="checkbox"/> Positif <input type="checkbox"/> Négatif <input type="checkbox"/> Positif <input type="checkbox"/> Négatif																																	
		<input type="checkbox"/> Histo : <input type="checkbox"/> Positif <input type="checkbox"/> Négatif <input type="checkbox"/> Positif <input type="checkbox"/> Négatif																																	
<b>TYPE DE TRAITEMENT</b> (Cocher si applicable) : <input type="checkbox"/> Pansements <input type="checkbox"/> Antibiotiques <input type="checkbox"/> Chirurgie (date: ____/____/____) <input type="checkbox"/> Prévention des incapacités																																			
<b>DOSAGES</b>		<b>Streptomycine : _____ (g) Autre (préciser) : _____ (mg)</b>																																	
Cocher chaque jour d'une croix (X) après administration des antibiotiques ; si les antibiotiques n'ont pas été administrés, remplir la case avec le symbole Ø																																			
Jour	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	Total des doses			
Mois																																			
<b>RESULTATS DU TRAITEMENT</b>																																			
<input type="checkbox"/> 1a : Traitement antibiotique terminé <input type="checkbox"/> 2a : Cicatrisé sans chirurgie <input type="checkbox"/> 3a : Cicatrisé sans limitation de mouvements articulaires <input type="checkbox"/> 4 : Référé pour meilleur traitement																																			
<input type="checkbox"/> 1b : Traitement antibiotique non <input type="checkbox"/> 2b : Cicatrisé avec chirurgie <input type="checkbox"/> 3b : Cicatrisé avec limitation de mouvements articulaires <input type="checkbox"/> 5 : Perdu de vue <input type="checkbox"/> Décédé																																			

## 9.2. UB 03: DEMANDE DE CONFIRMATION EN LABORATOIRE D'UN CAS D'ULCÈRE DE BURULI

## UB 03

DEMANDE DE CONFIRMATION EN LABORATOIRE  
D'UN CAS D'ULCERE DE BURULI

## I. INFORMATIONS GENERALES

Nom de l'établissement de soins : \_\_\_\_\_  
 Nom de l'agent de santé ayant fait la demande d'analyse : \_\_\_\_\_  
 Nom du patient : \_\_\_\_\_ N° de dossier : \_\_\_\_\_  
 Age (ans) : \_\_\_\_\_ Sexe :  M  F  
 Adresse (village ou quartier) : \_\_\_\_\_ District : \_\_\_\_\_  
 Classification :  Nouveau  Rechute  
 Forme clinique :  Nodule (N)  Plaque (Q)  Œdème (E)  Ulcère (U)  Ostéomyélite (O)  
 Date du prélèvement (jj/mm/aa) : \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 Type of prélèvement :  Ecouvillon  Aspiration par aiguille fine (AAF)  Biopsie

## II. RAISONS DE LA DEMANDE D'ANALYSE DE LABORATOIRE

Nature de(s) l'analyse(s)	<input type="checkbox"/> ZN	<input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Culture	<input type="checkbox"/> Histopathologie
---------------------------	-----------------------------	------------------------------	----------------------------------	--

## Raisons

- Diagnostic d'un nouveau cas  
 \*Suivi d'un patient pendant le traitement antibiotique (\_\_\_ semaines de traitement antibiotique)  
 Diagnostic d'un cas de rechute (date du dernier traitement antibiotique - date ou mois : \_\_\_\_\_)  
 Suivi d'un patient après le traitement antibiotique

## III. RESULTATS

Examens	ZN	PCR	Culture	Histopathologie
Date (jj/mm/aa) : ___/___/___				
Date (jj/mm/aa) : ___/___/___				

Commentaires : \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Nom de la personne donnant les résultats : \_\_\_\_\_

Nom du laboratoire : \_\_\_\_\_

Date : \_\_\_\_\_

\* peut inclure un patient ne répondant pas au traitement comme souhaité

**ANNEXE 10 :****GUIDE DES TECHNIQUES DE PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS POUR LA CONFIRMATION EN LABORATOIRE DE L'ULCÈRE DE BURULI (MALADIE CAUSÉE PAR *MYCOBACTERIUM ULCERANS*)****GÉNÉRALITÉS**

Grâce aux progrès de la prise en charge clinique de la maladie causée par *Mycobacterium ulcerans* (ulcère de Buruli), les options thérapeutiques ont évolué de la chirurgie au traitement par une association d'antibiotiques. Le traitement avec la rifampicine et la streptomycine, ou avec la rifampicine et d'autres schémas thérapeutiques par voie orale, a permis une décentralisation par rapport à l'époque où le traitement chirurgical en hôpital était la seule option à disposition. Grâce à ces progrès, le nombre des interventions chirurgicales a diminué (en 2012, environ 40 % des patients ont été traités sans geste chirurgical) et les rechutes ont presque totalement disparu.

La confirmation des cas à l'aide de méthodes de laboratoire, telles que l'amplification génique (PCR) et l'examen direct des frottis, est devenue un aspect essentiel dans la prise en charge globale de la maladie. Bien que les cultures ne soient pas indispensables pour le diagnostic de l'infection ou la prise en charge clinique immédiate des patients, l'identification des échecs thérapeutiques et des rechutes de l'infection peut nécessiter la détection de bacilles viables. Les cultures peuvent également s'avérer nécessaires en cas d'apparition de souches de *M. ulcerans* résistantes aux médicaments.

Dans de nombreux pays où l'ulcère de Buruli est endémique, 70 à 100 % des patients se présentent avec des lésions ulcérées et 0 à 30 % avec des lésions non ulcérées. Depuis 2007, on a fait d'excellents progrès dans la technique d'aspiration à l'aiguille fine (AAF) pour prélever des échantillons sur des cas ayant eu un diagnostic clinique d'ulcère de Buruli mais qui présentent des lésions non ulcérées. Jusqu'alors, la biopsie classique, à l'emporte-pièce, était préférée à la biopsie chirurgicale, plus invasive, pour obtenir des échantillons à partir de ce type de lésions. Elle reste utilisée dans quelques pays, principalement pour la recherche. Aujourd'hui, un certain nombre de pays ont recours à la biopsie par aspiration à l'aiguille fine pour prélever les échantillons en vue de la confirmation de l'infection par le laboratoire. La biopsie à l'emporte-pièce n'est plus la technique de choix, mais on peut y avoir recours dans des circonstances spéciales, précisées ci-après.

Bien que les interventions chirurgicales soient moins fréquentes de nos jours, il faudrait toujours profiter de chaque cas passant en chirurgie pour se procurer des échantillons pour les analyses de laboratoire.

## MÉTHODES UTILISÉES POUR LE DIAGNOSTIC

Les laboratoires font couramment appel à quatre méthodes pour confirmer la maladie causée par *M. ulcerans* : examen direct de frottis, amplification génique (PCR), culture et histopathologie. Nous allons résumer ci-dessous les avantages et les inconvénients de chacune de ces méthodes.

## MÉTHODES DE DIAGNOSTIC

Méthode	Avantages	Inconvénients
Examen direct de frottis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facile à exécuter au niveau local</li> <li>• Pas besoin de matériel ni d'équipement coûteux</li> <li>• Résultats obtenus rapidement</li> <li>• Peut être effectué à partir d'échantillons prélevés par écouvillon, AAF ou biopsie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Faible sensibilité (&lt; 60 %)</li> <li>• Nécessite un personnel qualifié</li> <li>• Ne fait pas la distinction entre organismes viables et non viables</li> <li>• Nécessite un système d'assurance externe de la qualité</li> </ul>
Amplification génique (PCR) pour IS2404	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Résultats obtenus assez rapidement</li> <li>• Peut être effectué à partir d'échantillons prélevés par écouvillon, AAF ou biopsie</li> <li>• Grande sensibilité et spécificité (&gt; 90 %)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nécessite un laboratoire bien équipé</li> <li>• Exécution coûteuse</li> <li>• Nécessite un personnel qualifié</li> <li>• Nécessite un contrôle rigoureux de la qualité</li> </ul>
Culture de <i>M. ulcerans</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peut être effectuée à partir d'échantillons prélevés par écouvillon, AAF ou biopsie</li> <li>• Seule méthode qui peut faire la distinction entre organismes viables et non viables.</li> <li>• Méthode utilisable pour surveiller la réponse des patients au traitement antimycobactérien</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nécessite un laboratoire bien équipé</li> <li>• Nécessite un personnel qualifié</li> <li>• Résultats obtenus en 6 à 12 semaines au minimum</li> <li>• Faible sensibilité (20-60 %)</li> <li>• Pas utile pour la prise en charge immédiate des patients</li> </ul>
Histopathologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensibilité de 90 % environ</li> <li>• Résultats obtenus assez rapidement</li> <li>• Utile pour poser un diagnostic différentiel et surveiller les réactions inattendues au traitement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nécessite un laboratoire bien équipé</li> <li>• Exécution coûteuse</li> <li>• Nécessite un personnel qualifié</li> <li>• Nécessite une procédure invasive (biopsie)</li> </ul>

## TECHNIQUES DE PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

On utilise trois techniques : écouvillonnage, aspiration à l'aiguille fine et biopsie (à l'emporte-pièce ou chirurgicale). On peut utiliser les échantillons obtenus pour le dépistage de routine et la prise en charge clinique des patients, ainsi que pour la recherche.

### 1. PRISE EN CHARGE CLINIQUE (EN ROUTINE) ET DÉPISTAGE DES CAS

L'écouvillonnage et l'aspiration par aiguille fine sont des procédures simples, pouvant être faites à n'importe quel niveau des soins (centres communautaires, centres de santé, hôpitaux), au cours de la prise en charge en routine ou pendant la recherche des cas.

#### 1.1 ÉCOUVILLONS

Les échantillons obtenus par écouvillonnage doivent être prélevés après diagnostic clinique sur les bords creusés d'un ulcère de Buruli. Cette technique peut être exécutée par des médecins ou des agents de santé expérimentés. En général, la plupart des patients se présentent avec des ulcères, de sorte que l'écouvillonnage peut être utilisé dans la plupart des situations. Il faut néanmoins s'efforcer de limiter le plus possible les douleurs et les saignements pouvant apparaître au cours de l'intervention ; les agents de santé qui exécuteront cette technique devront être suffisamment formés.

#### 1.2 ASPIRATION À L'AIGUILLE FINE (AAF)

Elle est principalement utilisée pour prélever, après le diagnostic clinique, des échantillons à partir de lésions non ulcérées (telles que nodules, plaques ou œdèmes). Selon l'endroit, cette technique est nécessaire pour une proportion de patients allant jusqu'à 30 % et elle est suffisamment simple pour pouvoir être employée largement sur le terrain. On peut également avoir recours à l'AAF pour certaines lésions ulcérées, lorsqu'il est difficile de prélever des écouvillons à cause de la cicatrisation des bords. Seuls des médecins expérimentés ou des agents de santé expérimentés devraient pratiquer l'AAF ; les agents de santé doivent être suffisamment formés (formation continue) et encadrés pour pouvoir améliorer leurs compétences.

Il faut faire extrêmement attention lorsqu'on effectue une AAF dans la région de la tête ou du cou (en particulier autour des yeux), ainsi qu'au niveau des organes génitaux. Si nécessaire, un clinicien expert exécutera cette technique pour réduire le plus possible le risque de lésions involontaires à des structures ou organes importants.

L'OMS recommande de prélever au maximum deux écouvillons ou deux aspirations à l'aiguille fine sur chaque lésion, en fonction de l'expérience de la personne procédant aux prélèvements.

Il arrivera qu'un nouveau prélèvement soit nécessaire si les résultats de la PCR sont négatifs, malgré un diagnostic clinique reposant sur des bases solides.

#### 1.3 BIOPSIE (À L'EMPORTE-PIÈCE OU CHIRURGICALE)

Les échantillons prélevés par écouvillonnage ou aspiration à l'aiguille fine suffisent dans la plupart des cas. On aura recours aux autres formes de biopsie (à l'emporte-pièce ou chirurgicale) si le diagnostic est dans l'intérêt direct du patient (par exemple, si on a essayé sans succès ou abandonné les écouvillons ou l'AAF). On préférera la biopsie chirurgicale lorsque l'on doit prélever de grands échantillons de diagnostic pour l'analyse histopathologique (en cas de suspicion d'évolution cancéreuse, ou de suspicion de maladies autres que l'ulcère de Buruli).

## INDICATIONS ET TECHNIQUES DE PRÉLÈVEMENT PRÉCONISÉES

Indication	Technique de prélèvement préconisée
1. Poser le diagnostic différentiel de l'ulcère de Buruli	Biopsie chirurgicale ou à l'emporte-pièce
2. Chercher la cause d'une réaction paradoxale (voir section 4.7.7 dans le manuel pour plus d'informations)	Biopsie chirurgicale ou à l'emporte-pièce
3. Déterminer s'il y a échec thérapeutique malgré une administration réussie d'antibiotiques de grande qualité	Biopsie chirurgicale ou à l'emporte-pièce
4. Établir l'éventualité d'une évolution cancéreuse	Biopsie chirurgicale ou à l'emporte-pièce
5. Reconfirmer, dans des essais cliniques, le diagnostic clinique par au moins deux méthodes de laboratoire, et évaluer le processus pathogène et l'efficacité thérapeutique	Biopsie chirurgicale ou à l'emporte-pièce

## Recueil des échantillons

Les biopsies seront prélevées par un médecin qualifié ou un agent de santé expérimenté qui a examiné le patient et qui a décidé que la biopsie était la seule option pour obtenir un échantillon.

- Les échantillons pour les analyses histopathologiques (ou microbiologiques) doivent être prélevés à partir d'une biopsie unique, plutôt qu'à partir de multiples biopsies à l'emporte-pièce.
- Il ne faut pas prélever de biopsies sur des lésions faciales (pour des raisons esthétiques) ou sur d'autres sites délicats (tête, cou ou à proximité des organes génitaux par exemple).
- Les biopsies à l'emporte-pièce ne doivent être réalisées que dans des structures où le risque infectieux est aussi réduit que possible et où il existe des équipements pour prendre en charge les hémorragies profuses.
- Il faut prendre toutes les mesures nécessaires pour que les patients éprouvent le moins de douleur et d'inconfort possible.

## 2. RECHERCHE

Nombre des techniques décrites ci-avant et des conditions dans lesquelles on choisira de les utiliser sont également valables pour la recherche. Dans des cas exceptionnels, ou lorsque des justifications sur des bases éthiques solides ont été données (par exemple les raisons pour lesquelles des échantillons ou des procédures en routine ne peuvent pas être utilisées, ou la nécessité de répondre à des questions essentielles de recherche), le protocole de recherche devra fournir des explications détaillées. Les patients devront également recevoir des informations (sur la procédure et l'usage que l'on entend faire des échantillons) qui figureront sur le formulaire de consentement. Seuls des cliniciens expérimentés pourront prélever des biopsies. Pour des sites tels que le visage, le cou et les organes génitaux, les biopsies à l'emporte-pièce sont exclues.

La protection des patients participant aux travaux de recherche est décrite dans des normes internationales qui ne doivent pas varier d'un pays à l'autre. Il est donc essentiel que les personnes travaillant sur l'ulcère de Buruli mettent au point leur propre code d'éthique pour garantir ces normes de la pratique médicale dans le cadre de leurs travaux de recherche.

Il est toujours possible d'avoir des échantillons pour la recherche. Les chercheurs devraient être sûrs que les possibilités de se procurer des échantillons provenant de patients pour la conduite de leurs travaux existent ou sont recherchées.

### Histopathologie (et microbiologie)

Le parage des ulcères nécrosés ou des lésions, ou l'excision limitée de tissus pendant ou après le traitement antibiotique, donnent l'occasion de se procurer des échantillons pour la recherche.

### Cultures

Il est possible de faire des cultures satisfaisantes, même à partir des écouvillons prélevés sur les lésions ulcéreuses, observées chez 70 à 100 % des patients. De nouveaux travaux sont nécessaires pour déterminer le nombre de cultures qu'on peut obtenir à partir des échantillons prélevés par AAF. Il n'est pas nécessaire d'obtenir des cultures pour chaque patient ou lésion tant que rien n'indique l'apparition de souches de *M. ulcerans* résistantes aux antibiotiques.



