



Année 2014-2015

Mémoire N° :408

L'intradermoréaction à la tuberculine : pertinence de la réduction du seuil de positivité diagnostique de 10 mm à 5 mm chez les co-infectés TB/VIH.

MEMOIRE

Master de Microbiologie Fondamentale et Appliquée

Présenté et soutenu publiquement par :

Micheline Julie Sossi Hounnoug

Le 07 Novembre 2015

Jury

Président :	M.	Cheikh Saad Bouh	BOYE	Professeur
Membres :	Mme	Coumba Touré	KANE	Professeur
	Mme	Halimatou Diop	NDIAYE	Maitre de Conférences agrégé
Directeur de mémoire :	M.	Sévérin	ANAGONOU	Maitre de Conférences agrégé
Co-directeur de mémoire :	M.	Prudence Ablo	WACHINO	Docteur

DEDICACE

Nous dédions ce mémoire à :

A mon père AMOUSSOU HOUNNOUGA Michel, vous nous avez donné de bons exemples. Que ce travail soit l'expression de la rigueur avec laquelle vous avez conduit notre éducation.

A ma mère KUASSI Emma, vous êtes l'expression vivante de la combativité et de la patience. Les conseils réguliers n'ont jamais cessé de guider nos pas.

A mon tendre époux Arsène KPANGON, tu es le modèle de mari dont j'ai toujours rêvé. Ton intelligence et ton soutien indéfectible m'ont permis d'achever cette formation. Que ce travail soit l'expression de ton désir incessant, du meilleur pour ton épouse et qu'il ravive notre amour l'un pour l'autre.

A mes enfants Marie-Miracle, Bénito Gracias et Emmanuel Florescence KPANGON : que l'enthousiasme qui vous a pris du fait de mes longues heures de travail à table à écrire, puisse continuer en vous insufflant l'excellence que j'ai toujours souhaitée pour vous.

REMERCIEMENTS

A notre Directeur de mémoire Professeur Sévérin ANAGONOU

Plus que notre Professeur, vous êtes pour nous un Père. Vous nous avez offert des faveurs extraordinaires dans le cadre de notre progression scientifique. Recevez par ces remerciements le témoignage de notre vive reconnaissance.

A notre Co-directeur de mémoire Docteur Ablo Prudence WACHINOU

Vous n'avez ménagé aucun effort pour vous rendre disponible malgré vos nombreuses occupations. Nous vous remercions infiniment pour tout.

A tout le personnel de la Coopération Technique Belge

Sincères remerciements pour nous avoir octroyé notre bourse de formation.

Au Coordonateur du Master Microbiologie Fondamentale et Appliquée Pr Cheikh Bouh BOYE

Vous nous impressionnez par vos qualités Scientifiques et la pluridisciplinarité de vos connaissances. Votre humilité extraordinaire contraste avec votre rigueur scientifique sans pareil. Chaleureux remerciements à vous.

Au Professeur Ndèye Coumba Toure-Kane

Très chère Mme Kane, les mots ne suffisent pas pour décrire votre gentillesse. Vos qualités exceptionnelles d'enseignant et votre rigueur scientifique n'altèrent en rien vos qualités humaines. Les mots ne suffisent pas pour vous témoigner toute notre gratitude. Soyez Assurée Mme KANE de notre reconnaissance et de notre dévouement.

Au Professeur Halimatou Diop Ndiaye

La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail nous a beaucoup touchée. Nous vous en sommes reconnaissants et vous prions d'accepter nos sincères remerciements.

***A tous les enseignants du Master Microbiologie Fondamentale Appliquée, en particulier Dr
Abdoulaye SECK***

Sincères remerciements pour votre disponibilité et vos conseils.

***Au Responsable du Laboratoire de Référence des Mycobactéries
Pr Dissou AFFOLABI***

Votre approche simplifiée de la recherche opérationnelle m'a toujours séduite. Vous avez contribué à entretenir cette passion pour la recherche depuis ma prise de fonction. Je vous en serai éternellement reconnaissante.

A tout le personnel du Laboratoire de Référence des Mycobactéries

Vous avez contribué activement à la réalisation de ce travail par vos conseils et votre sollicitude lors des différentes phases. Recevez à travers la présentation de ce mémoire, la marque de toute la gratitude que je vous voue.

A tous les patients qui ont accepté participer à notre étude

Sincères remerciements.

A mes frères et sœurs

Ce travail n'aurait pas été possible sans votre soutien permanent. Qu'il soit pour nous le symbole du désir permanent du meilleur et de l'excellence.

A ma belle-mère Virginie KIKI KPANGON

Vous m'avez accompagné et soutenu tout au long de cette formation. Sans votre appui, cette formation aurait pu être plus difficile.

A Gambe Geneviève ALI

Vous avez consacré votre temps et amour à s'occuper de mes enfants. Toute ma reconnaissance et mes remerciements.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ARN	:	Acide ribonucléique
ARNm	:	Acide ribonucléique messager
ARV	:	Antirétroviral
BAAR	:	Bacille acido-alcool résistant
BCG	:	Vaccin Bilié de Calmette et Guérin
CCR5	:	C-C chimiokine récepteur de type 5
CXCR4	:	C-X-C chimiokine récepteur de type 4
CD4	:	Clusters de Différenciation 4
CMH	:	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNHUPP	:	Centre National Hospitalier Universitaire de Pneumo-Phtisiologie
DPP	:	Dérivé Protéinique Purifié
EDTA	:	Acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique
ELISA	:	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
GM-CSF	:	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
Gp	:	Glycoprotéines
HIV	:	Human Immunodeficiency Virus
IDR	:	Intra Dermo Reaction
IFN γ	:	Interferon Gamma
Ig	:	Immunoglobuline
IGRA	:	Interferon Gamma Releasing Assay
IL 12	:	Interleukine 12
INH	:	Isoniazide
ITL	:	Infection tuberculeuse latente
LED	:	Light-Emitting Diode
LRM	:	Laboratoire de Référence des Mycobactéries
LT	:	Lymphocyte T
ml	:	Millilitre
mm	:	Millimètre
mn	:	Minute
μ l	:	Microlitre

NK	:	Natural Killer
OMS	:	Organisation Mondiale Santé
ONU	:	Organisation des Nations Unies
OR	:	Odds ratio
PA	:	Phosphatase alcaline
PEV	:	Programme Élargie de Vaccination
PIT	:	Primo Infection Tuberculeuse
PITUVI	:	Prévalence de l'Infection à <i>Mycobacterium tuberculosis</i> chez les Personnes Vivant avec le VIH
PNT	:	Programme National contre la Tuberculose
PPD	:	Purified Protein Derivative
PVVIH	:	Personnes Vivant avec le VIH
SIDA	:	Syndrome de l'Immuno Déficience Acquise
SSI	:	Statens Serum Institute
TB	:	Tuberculose
TBL	:	Tuberculose Latente
TEP	:	Tuberculose Extra Pulmonaire
Th	:	T helper
TNF α	:	Facteur de Nécrose Tumorale Alpha
TPM+	:	Tuberculose Pulmonaire à Microscopie positive
TPM-	:	Tuberculose Pulmonaire à Microscopie Négative
VIH	:	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VPP	:	Valeur Prédicative Positive
ZN	:	Ziehl-Neelsen

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure du VIH (10).....	4
Figure 2 : Diagramme montrant l'évolution des lymphocytes T CD4.....	6
Figure 3: Physiopathologie de la tuberculose (13).....	11
Figure 4: Réaction d'hypersensibilité retardée à la tuberculine.....	13

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Caractéristiques socio-démographiques et immuno-cliniques de l'échantillon.....	30
Tableau II: Sensibilité de l>IDR pour le diagnostic de tuberculose avec les seuils variés de 5mm, 10 mm, et 15mm avec la bacilloscopie comme le gold standard.....	31
Tableau III: Association entre la numération des lymphocytes CD4 et l'Induration obtenue après IDR pour un seuil diagnostique de l>IDR à la tuberculine ≤ 5 mm	32
Tableau IV: Association entre la numération des lymphocytes CD4 et l'Induration obtenue après IDR pour un seuil diagnostique de l>IDR à la tuberculine ≥ 10 mm	32

SOMMAIRE

DEDICACE	i
REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES ABREVIATIONS	iv
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	vi
INTRODUCTION.....	1
1. GENERALITES	3
1.1- Généralité sur l'infection à VIH.....	3
1.1.1- Epidémiologie du VIH	3
1.1.2- Agent pathogène	3
1.1.2.1- La structure du VIH.....	3
1.1.2.2- Les cellules cibles.....	4
1.1.2.3- Le cycle de réplication virale	4
1.1.2.4- Les différentes phases de l'infection VIH	5
1.1.2.5- Transmission du VIH.....	6
1.1.2.6- Diagnostic biologique.....	7
1.2 Généralités sur la tuberculose	7
1.2.1- Epidémiologie de la tuberculose.....	7
1.2.2- Caractères bactériologiques de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
1.2.3- Physiopathologie :.....	9
1.2.3.1- Pathogénie.....	9
1.2.3.2- Immunité.....	10
1.2.4. Infection tuberculeuse latente	11
1.2.4.1 Définition	11
1.2.4.2 Intradermoréaction à la tuberculine	12
1.2.4.2.1 Historique.....	12
1.2.4.2.2 Immunologie	12
1.2.4.3 Les tests de détection de l'interféron γ :	12
1.2.5 Diagnostic bactériologique de la tuberculose pulmonaire:	13
1.2.5.1 Examen direct.....	13
1.2.5.2 Le GeneXpert MTB/RIF	14
1.2.5.3 Culture.....	14

1.3-Généralité sur la co-infection TB/VIH.....	14
1.3.1-Epidémiologie de la co-infection TB/VIH.....	14
1.3.2- Rôle du VIH dans la co-infection	15
1.3. 3-Physiopathologie de la co-infection.....	15
1.4 Revue de la littérature	16
2. CADRE ET METHODE D'ETUDE	17
2.1. Cadre d'étude	17
2.2. Méthode d'étude.....	18
2.2.1. Nature et durée de l'étude.....	18
2.2.2. Population d'étude	18
2.2.2.1. Critères d'inclusion.....	18
2.2.2.2. Critères d'exclusion	18
2.2.2.3. Taille de l'échantillon	18
2.2.2.3.1 Les outils et la technique de collecte.....	18
2.2.2.3.2 Le déroulement de l'étude	19
2.2.2.3.3 Procédure de traitement des échantillons	19
2.2.3 Examens biologiques	20
2.2.3.1 Matériels	20
2.2.3.2 Techniques et résultats	22
2.2.3.2.1 Microscopie.....	22
2.2.3.2.2 Sérologie VIH	22
2.2.3.2.3 Intradermoréaction à la tuberculine.....	25
2.2.3.2.4 Comptage des lymphocytes TCD4.....	26
2.2.4 Définitions de variables.....	27
2.2.5 Traitement et analyse des données.....	27
2.2.6 Considérations éthiques.....	28
2.2.7 Biais et limites de l'étude	28
3. RESULTATS	29
3.1 Description de la population étudiée	29
3.1.1 les caractéristiques socio-démographiques.....	29
3.1.2 Les caractéristiques immuno-cliniques	29
3.1.3 la sensibilité de l'IDR selon les différents seuils de positivité de l'IDR.....	31

3.2 Phase analytique : Etude de l'association entre le diamètre de l'induration de l'IDR et la numération des CD4	32
4. DISCUSSION.....	33
4.1 La validité méthodologique.....	33
4.2 La discussion des principaux résultats.....	33
CONCLUSION	36
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	37

INTRODUCTION

La tuberculose (TB) demeure un problème de santé publique avec les 9 millions de cas enregistrés en 2013, et 1,5 millions de décès dont 360.000 co-infectés par le VIH enregistrés de par le monde (1). La TB est l'infection opportuniste la plus mortelle chez les personnes vivant avec le VIH (2) avec près de 25% des causes de mortalité chez ces personnes.

Pour réduire la mortalité liée à la TB chez les Personnes Vivant avec le VIH (PVVIH), l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a donc recommandé un diagnostic de la TB latente chez les PVVIH en vue d'une chimioprophylaxie à l'isoniazide (INH) (3). Cette chimioprophylaxie à l'INH a la propriété de ralentir la progression vers la TB maladie et les complications associées (4). La chimioprophylaxie à l'INH réduit de 33%-64% le risque de développer la TB chez les PVVIH ayant une intradermoréaction (IDR) positive et de 33% chez ceux ayant une IDR négative (5).

Pour réduire le nombre de faux négatifs dans la détection de la TB latente (TBL) par l'IDR chez les PVVIH il a été proposé la réduction du seuil de positivité réel de l'IDR qui était de 10 mm à 5 mm chez les PVVIH à cause de leur immunodépression à médiation cellulaire (6).

Certains auteurs comme Gobelens *et al.* trouvent que la réduction du seuil de positivité de 10 mm à 5 mm a un effet limité dans la réduction des faux négatifs pour la TBL (7). Il apparaît ainsi important d'étudier la performance de l'IDR surtout dans ce contexte où la chimioprophylaxie à l'INH rencontre quelques problèmes de mise en œuvre dus à la sensibilité et la spécificité de l'IDR dans le diagnostic de la TB latente.

Dans notre étude nous nous proposons de revoir la performance de l'IDR comparativement aux résultats de la bacilloscopie positive chez les tuberculeux pulmonaires co-infectés au VIH ou non.

Question de recherche : La réduction du seuil de positivité de l'IDR de 10 mm, à 5 mm chez les PVVIH améliore-t-elle la performance de l'IDR à la tuberculine dans le diagnostic de l'infection tuberculeuse latente?

Objectif général

Évaluer la contribution de l'IDR à la détection de l'infection tuberculeuse latente.

Objectifs spécifiques

- Déterminer la performance de l'IDR en cas d'infection tuberculeuse latente chez les PVVIH à des seuils variables de 5 mm, 10 mm, et 15 mm.
- Décrire l'association entre le nombre de lymphocytes T CD4 et le diamètre de l'induration après IDR à la tuberculine à des seuils de positivité diagnostique de 5 mm et 10 mm.

1. GENERALITES

1.1- Généralité sur l'infection à VIH

1.1.1- Epidémiologie du VIH

L'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) reste un problème majeur de santé publique dans le monde. Le nombre de personnes vivant avec le VIH en Juillet 2015 était estimé à 37 millions. Bien qu'en 2014 le nombre des nouvelles infections reste à son niveau le plus bas dans le monde soit 2 millions [1,9-2,2], la tuberculose continue d'être la principale cause de décès parmi les personnes infectées par le VIH. L'infection par le VIH serait responsable de 1,2 millions[980.000-1.600.000] (8).

Au BENIN, pays à épidémie mixte, le premier cas de Sida a été enregistré en 1985 (9). En 2013, la prévalence globale du VIH était de 2% et celle du VIH chez les tuberculeux était à 17% chez les tuberculeux toutes formes confondues (9).

1.1.2- Agent pathogène

1.1.2.1- La structure du VIH (10)

Le Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH) est un virus à ARN faisant partie du sous-groupe des lentivirus. D'aspect globalement sphérique, son diamètre varie de 90 à 120 nanomètres. Il dispose d'une enveloppe composée des restes de la membrane de la cellule infectée. Cette enveloppe est recouverte de deux types de glycoprotéines (gp) : la gp41 et la gp120. À l'intérieur de cette enveloppe se trouvent une matrice protéique (p17) et la capsid (p24). Le génome du VIH contenu dans la capsid est constitué d'un simple brin d'ARN en double exemplaire accompagné d'enzymes qui sont les principales cibles du traitement antirétroviral (ARV). La nucléocapsid est composée quant à elle de protéines p6 et p7.

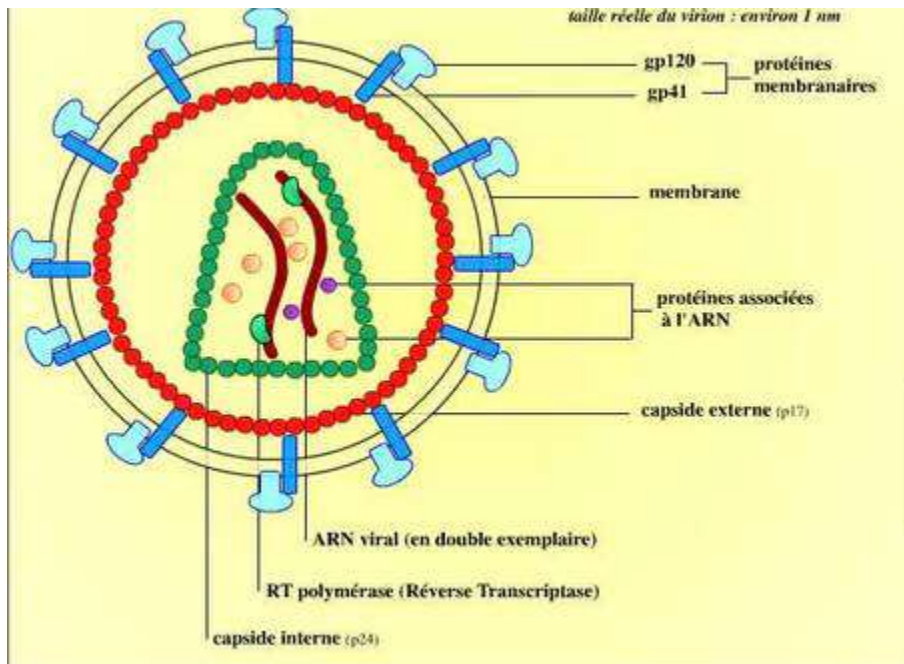


Figure 1: Structure du VIH (10)

1.1.2.2-Les cellules cibles

Les cellules cibles du virus sont les cellules porteuses à leur surface de la molécule CD4 et l'un des corécepteurs CCR5 ou CXCR4, ayant une haute affinité avec la glycoprotéine d'enveloppe du VIH, la gp120. On retrouve parmi elles les lymphocytes T CD4+ (35-55%), les monocytes-macrophages, les cellules folliculaires dendritiques, les cellules de Langerhans cutanées et les cellules microgliales cérébrales (10).

1.1.2.3-Le cycle de réplication virale

Le cycle de réplication du virus se déroule dans les ganglions lymphatiques, l'intestin, le thymus, le cerveau, les muscles et les liquides biologiques (sang, sécrétions sexuelles). La réplication virale est constante avec un renouvellement rapide et permanent de nouveaux virions circulants d'environ 10^9 virions par jour.

Les étapes du cycle de réplication du VIH sont :

- la pénétration des cellules cibles par fixation et enclage des virus sur les récepteurs CD4,
- la décapsidation du virus et la libération de l'ARN dans le cytoplasme,
- la synthèse d'un ADN à partir de l'ARN viral (Action de Transcriptase Reverse), l'évolution de l'infection (Intégration de l'ADN néoformé dans l'ADN chromosomique de la cellule) développant alors un provirus (Action de l'intégrase),
- la transcription du provirus en ARNm viraux,
- la synthèse et l'assemblage de protéines virales à partir des ARNm (Action des protéases),
- le bourgeonnement et la libération de nouvelles particules virales.

1.1.2.4-Les différentes phases de l'infection VIH

L'évolution spontanée en l'absence de traitement ARV se fait en trois phases :

- Primo infection (phase aiguë)
- Infection chronique (latence clinique)
- SIDA (phase terminale)

➤ La primo infection

Elle survient quinze jours à deux mois après la contamination. La sérologie est négative au départ ; d'où l'intérêt de répéter le test sérologique après trois mois et à six mois. La charge virale est souvent massive à cette phase.

➤ La Phase d'infection chronique

Elle dure sept à onze ans en moyenne mais probablement plus courte en Afrique. Elle correspond à une phase où le virus est présent mais n'engendre presque pas de symptômes. Le sujet est séropositif (test de dépistage positif). La charge virale baisse à un niveau d'équilibre.

➤ Phase terminale (SIDA)

Elle dure plusieurs mois à quelques années.

L'évolution de l'infection par le VIH est dite persistante, productive et est représentée par ce diagramme qui montre la relation entre la charge virale et le nombre de lymphocytes TCD4.

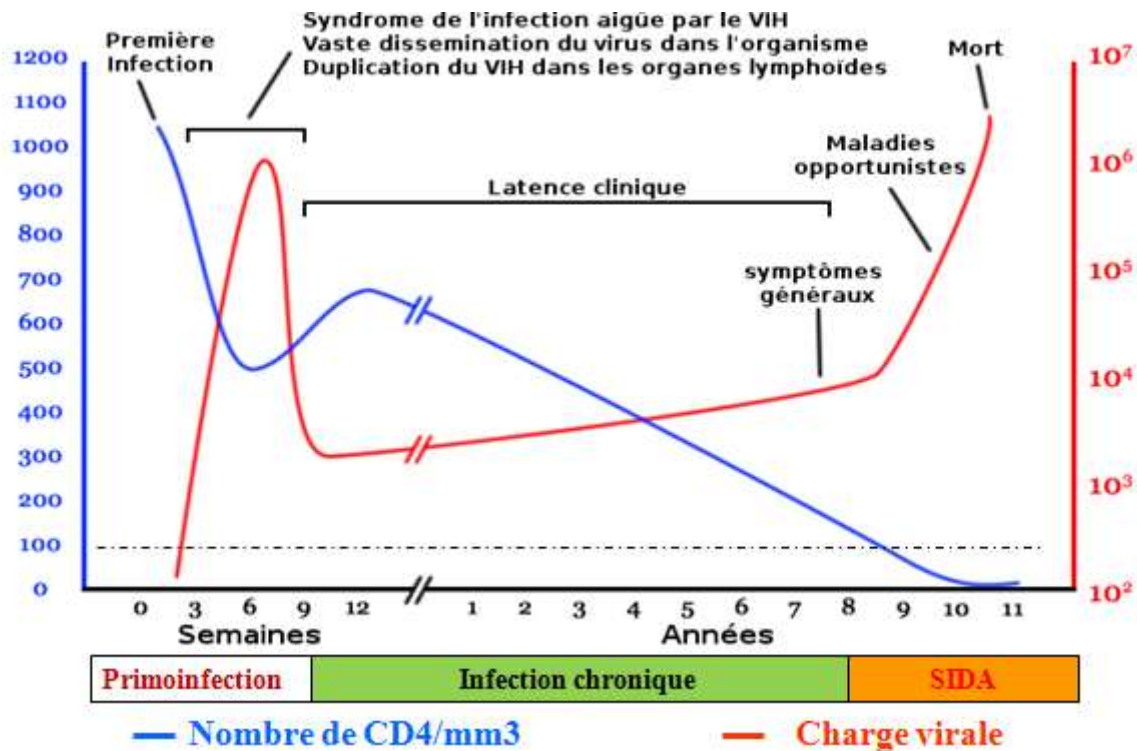


Figure 2 : Diagramme montrant l'évolution des lymphocytes T CD4 et de la charge virale en fonction des phases

1.1.2.5-Transmission du VIH

Le facteur déterminant du risque de transmission est la charge virale du produit biologique contaminant, celle-ci étant corrélée au stade de la maladie VIH chez le sujet contaminant. Nous avons trois principaux types de transmission dont la transmission sexuelle, la transmission par le sang et ses dérivés, et la transmission de la mère à l'enfant (10).

1.1.2.6-Diagnostic biologique

Le diagnostic biologique de l'infection par le VIH repose sur les différents tests de dépistage du VIH. Deux méthodes sont utilisées pour le dépistage :

- la méthode directe qui consiste en la mise en évidence du virus. Elle est plus utilisée chez le nouveau-né et au cours de la primo-infection.
- la méthode indirecte quant à elle, consiste en la détection des anticorps anti-VIH. Deux types de test sont utilisés pour faire la preuve de l'infection. Il s'agit de l'Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) et les tests rapides utilisables par un personnel de formation limitée. Les tests retenus par l'OMS pour le dépistage du VIH sont : le test Determine, le test Capillus HIV, le test SD Bioline, l'ELISA pour le contrôle de qualité, le test Genie 2 HIV1&2 et le test Immunocomb HIV1&2.

1-2 Généralités sur la tuberculose

1.2.1- Epidémiologie de la tuberculose

Dans le monde, le nombre de cas de TB toutes formes confondues est estimé en 2013 à 9 millions avec un peu plus de 25% de ces cas venant de l'Afrique Subsaharienne qui représente 12% de la population mondiale.

Au Bénin, au cours de l'année 2014 nous avons noté 3977 cas de TB toute forme confondue, soit une augmentation de 1% comparativement à l'année précédente avec une incidence de 42/100.000 habitants (9).

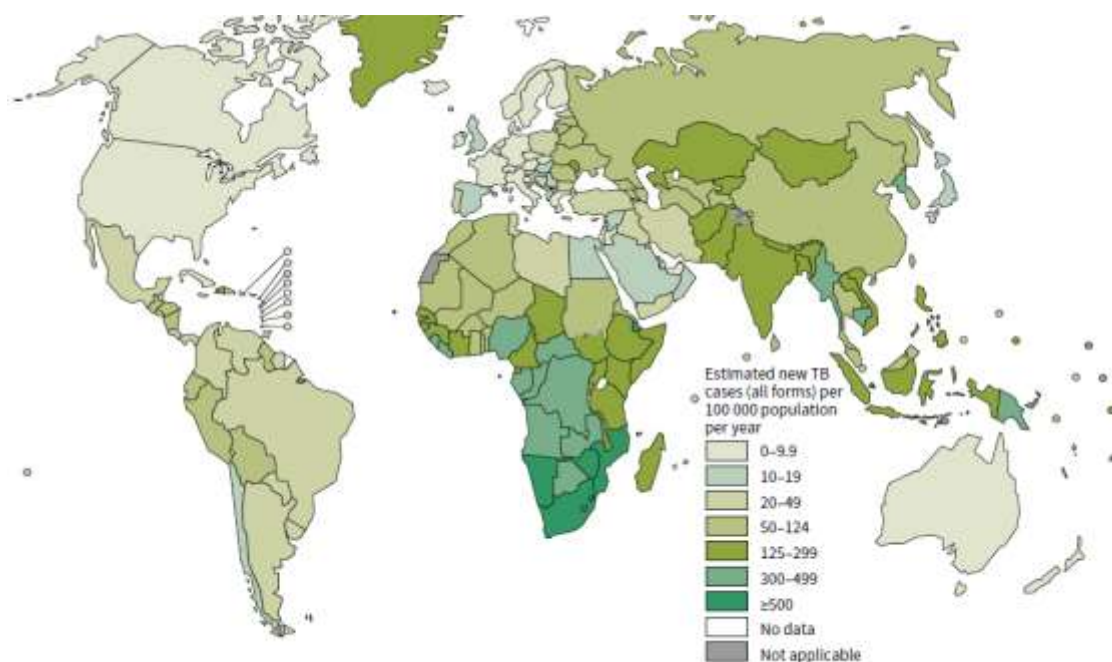


Figure 3 : Incidence de la tuberculose par Pays en 2014 (1)

1.2.2- Caractères bactériologiques de *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis est la mycobactérie la plus fréquemment rencontrée chez l'Homme. C'est un germe aérophile, particularité qui n'est pas étrangère à la localisation pulmonaire préférentielle de la maladie.

La richesse de sa paroi en lipides rend compte de plusieurs de ses propriétés dont :

- L'acido-alcool-résistance, propriété tinctoriale essentielle, caractéristique du genre *Mycobacterium* mise en évidence par la coloration de Ziehl-Neelsen à chaud ou l'auramine.
- La résistance aux agents chimiques tels que les alcalis (soude), les acides (acide sulfurique), les détergents...
- La sensibilité particulière aux antibiotiques. Certaines molécules actives sur les bactéries pyrogènes, ne peuvent franchir la barrière hydrophobe de la paroi et ne peuvent atteindre leur cible, c'est par exemple le cas des bêta-lactamines. D'autres molécules qui agissent en perturbant le métabolisme lipidique ou l'agencement complexe de la paroi ont une activité sur *M. tuberculosis* et sont dénuées d'efficacité sur les autres bactéries, c'est le cas par exemple de l'isoniazide et de l'éthambutol.

- La cuirasse lipidique qui entoure la bactérie et la capsule polyosidique joue un rôle dans la pathogénicité de *M. tuberculosis* en permettant sa multiplication intracellulaire.

M. tuberculosis est une bactérie exigeante dont la culture nécessite la présence de nombreux facteurs de croissance.

Son temps de division est élevé, environ 20 heures. Ce qui explique :

- La lenteur de croissance environ 3 semaines sur les milieux solides, 10 à 15 jours sur les milieux liquides.

- Les particularités de traitement qui sera long (6 mois), mais une seule administration quotidienne des antibiotiques sera suffisante.

1.2.3-Physiopathologie :

Les caractéristiques cliniques et histologiques de la tuberculose découlent de la conjonction de deux types de facteurs ; d'une part, de la virulence du bacille et d'autre part, de la nature et de l'intensité des mécanismes de défense de l'hôte.

1.2.3.1- Pathogénie

La tuberculose est une maladie contagieuse. La contamination est interhumaine et se fait par voie aérienne à partir des gouttelettes de pflugges. Le risque d'infection est d'autant plus élevé que la concentration en bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) est importante dans l'air inhalé. Le bacille pénètre jusqu'au parenchyme pulmonaire où il va être phagocyté par le macrophage entraînant une réponse inflammatoire locale. L'activation des macrophages entraîne un arrêt de la croissance bactérienne. Les phagocytes sont transformés en cellules épithélioïdes avec formation d'un granulome par l'action de l'IL3, l'IL4 et le GM-CSF. L'intradermoréaction à la tuberculine, pourrait se positiver dans une période de 3-8 semaines après le contact du *M. tuberculosis* avec les macrophages alvéolaires (11). Le granulome se calcifie entraînant la guérison. A partir de cette lésion primaire, la progression peut se faire par voie lymphatique jusqu'au ganglion satellite créant ce que l'on nomme le complexe ganglio-pulmonaire de la Primo-Infection Tuberculeuse (PIT).

Au sein du granulome, la lyse cellulaire se présente sous la forme de nécrose blanchâtre (caséum). La lésion primaire de la tuberculose est ainsi représentée histologiquement par un granulome à cellules épithéloïdes centré par de la nécrose caséuse. Les PIT sont souvent inapparentes et 95% guérissent de façon spontanée. Dans 5% des cas, apparaît la TB maladie : le granulome actif est dépassé et ne parvient plus à limiter la croissance bactérienne qui se développe alors soit librement dans les espaces alvéolaires soit dans les macrophages infectés. Il existe alors une double population intra et extra cellulaire. Les macrophages infectés atteignent les ganglions régionaux.

1.2.3.2- Immunité

La TB est le paradigme des infections dont l'immunité protectrice est de type cellulaire. Après pénétration des bacilles dans l'organisme lors de la première rencontre, la phagocytose par le macrophage entraîne un recrutement des monocytes par l'intermédiaire du facteur de nécrose tumorale α (TNF α) et par l'interféron γ (IFN γ) sécrété par les cellules NK (stimulées par l'IL12). Ce sont d'abord des réactions non spécifiques. Le système s'amplifie par le biais des LT CD4+ reconnaissant l'antigène et sécrétant l'INF γ . Ces LT CD4+ (de type Th1) avec les LT CD8+ vont avoir un effet cytolytique, permettant la libération des bactéries intracellulaires et leur destruction par les monocytes activés, instaurant également une mémoire immunitaire. Cette mémoire permet la mise en place d'une immunité spécifique. Lorsque les lymphocytes activés atteignent un certain nombre, apparaît une réaction cutanée à la tuberculine : c'est l'hypersensibilité retardée utilisée pour les tests tuberculiques (12).

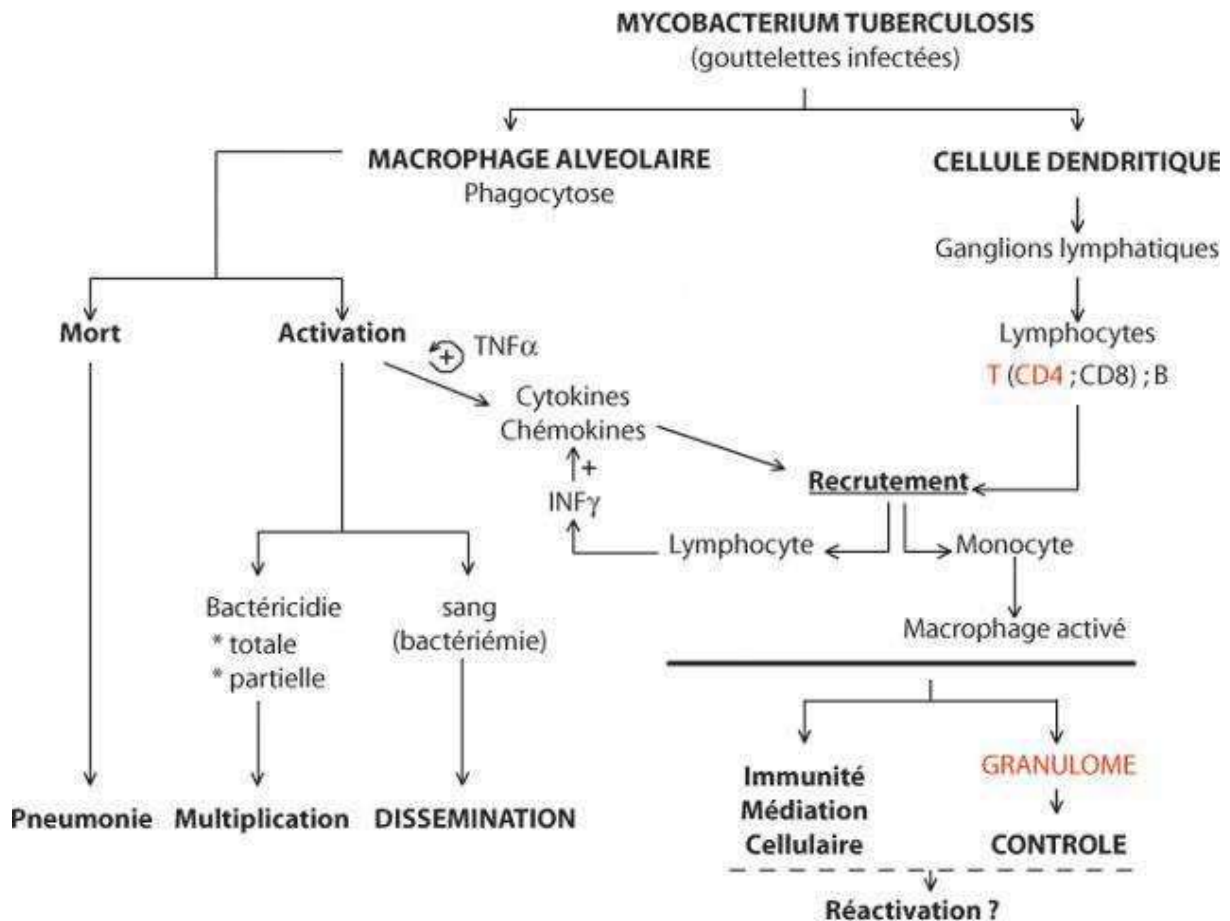


Figure 3: Tuberculose physiopathologie(13)

1.2.4. Infection tuberculeuse latente (ITL)

1.2.4.1 Définition

Une ITL correspond à l'infection par des bacilles tuberculeux viables, mais dont le métabolisme est ralenti, sans aucun signe clinique ni radiologique de tuberculose-maladie. La difficulté de la définition de l'ITL réside dans la date de la contamination, "récente ou ancienne", qui conditionne l'attitude thérapeutique (14).

L'« incubation » varie de 1 à 3 mois, et l'infection est par définition asymptomatique et passe inaperçue.

La primo-infection tuberculeuse (PIT) peut-être asymptomatique ou se révéler par une symptomatologie avec une fièvre peu élevée, un amaigrissement, une asthénie, un érythème noueux, ou une kérato-conjonctivite phlycténulaire. Sur le plan radiologique on peut retrouver

un complexe primaire avec une opacité nodulaire de 3 à 10 mm de diamètre, en rapport avec un chancre d'inoculation. Une adénopathie satellite peut également se voir (15).

La difficulté actuelle est la confusion entre ITL et PIT. De nos jours, on aura tendance à traiter une PIT symptomatique (cliniquement ou radiologiquement) comme une tuberculose-maladie, alors que le traitement de l'ITL est par définition encore un traitement préventif.

1.2.4.2 Intradermoréaction à la tuberculine (IDR)

1.2.4.2.1 Historique

L'IDR, encore appelée test de Mantoux, est connue depuis plus d'un siècle. Elle a été découverte par Robert Koch, après l'isolement du bacille tuberculeux en 1882. En effet, il isola un filtrat de culture de *M. tuberculosis* qui provoqua une réaction cutanée, qu'il nomma « tuberculine ». Ce n'est qu'en 1932 que Seibert et Munday isolèrent le principe actif protéique de la tuberculine, permettant ainsi sa production industrielle (tuberculine DPP-Seibert). En raison des variations de résultats des tests tuberculiniques provenant de différentes préparations, la tuberculine RT23® fut produite à partir de cultures de 7 souches de *M. tuberculosis*. Elle deviendra la référence de l'OMS, et la plupart des pays l'adopteront.

1.2.4.2.2 Immunologie

L'IDR explore in vivo l'hypersensibilité retardée induite par l'injection intra-dermique de composants antigéniques de *M. tuberculosis*. Cette réaction se positive suite à une infection par *M. tuberculosis*, ou bien suite à une vaccination par le BCG. Elle peut également se positiver suite à une infection par une mycobactérie atypique. Des lymphocytes T mémoires sont recrutés avant de se différencier suivant un profil Th1. Ils seront à l'origine de la sécrétion de l'INF γ qui favorisera l'afflux des macrophages activés. Un afflux cellulaire local de lymphocytes B, de polynucléaires basophiles et éosinophiles accompagne les lymphocytes T CD4 mémoires et les macrophages. Les kératinocytes prolifèrent dans la membrane basale épidermique et se chargent en CMH de type II à leur surface. Cela aboutit à la formation d'une papule indurée érythémateuse (15).

1.2.4.3 Les tests de détection de l'interféron γ :

La clé du contrôle de la tuberculose est la mise en évidence des sujets infectés par *Mycobacterium tuberculosis*, à risque de développer une tuberculose active.

En effet cette stratégie est efficace, car un traitement préventif des sujets infectés non malades diminue le risque de progression vers une tuberculose-maladie de près de 90%.

Deux tests permettent dorénavant d'être précis dans le diagnostic d'un contage tuberculeux chez les sujets même vaccinés par la souche vaccinale BCG de *Mycobacterium bovis*: le QUANTIFERON-TB® et le T- SPOT.TB®. Ces tests permettent de mettre en évidence « in vitro » une réponse immunitaire à l'égard de *M. tuberculosis*. Après stimulation par des protéines mycobactériennes, les lymphocytes T spécifiques de *M. tuberculosis* synthétisent des cytokines de type Th1, notamment de l'INF γ dont la détection est à la base de ces nouveaux tests.

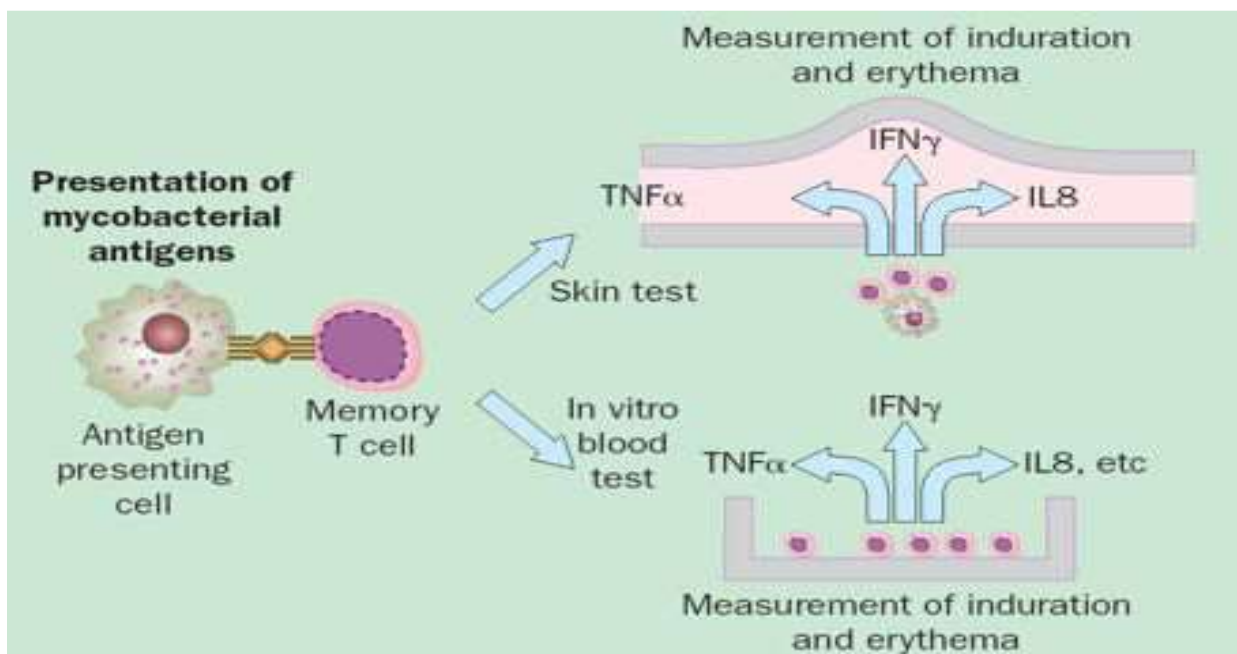


Figure 4: Réaction d'hypersensibilité retardée à la tuberculine (13)

1.2.5 Diagnostic bactériologique de la tuberculose pulmonaire:

1.2.5.1 Examen direct

La mise en évidence des BAAR à l'examen microscopique est le moyen le plus rapide et le moins coûteux de faire le diagnostic de présomption de la tuberculose. L'examen direct permet de détecter immédiatement les tuberculoses pulmonaires les plus contagieuses.

L'examen direct est la première étape du diagnostic bactériologique. A partir des échantillons, des frottis sont faits et colorés en vue d'une lecture microscopique. Il existe plusieurs

techniques de coloration des mycobactéries. Toutes ces techniques exploitent la propriété d'acido-alcool-résistance des mycobactéries, c'est-à-dire leur capacité à former des complexes stables avec les colorants basiques comme la fuchsine, qui persistent malgré la double action de l'alcool et des acides forts dilués. Deux principaux types de coloration sont utilisés :

- la coloration de Ziehl-Neelsen (ZN) (à chaud ou à froid): les bacilles apparaissent rouge sur un fond bleu au microscope à lumière directe
- la coloration par un fluorochrome, l'auramine : les bacilles apparaissent jaune fluorescents sur fond sombre au microscope à fluorescence.

1.2.5.2 Le GeneXpert MTB/RIF

C'est un nouveau test rapide automatique pour le diagnostic moléculaire. Il détecte simultanément la tuberculose et la résistance à la Rifampicine qui est un indicateur fiable de la tuberculose multi résistante. Les résultats sont obtenus 2 heures et cela permet de mettre les patients sous traitement le même jour. Il requiert un minimum de biosécurité, de formation et peut être utilisé dans des conditions non habituelles de laboratoire.

1.2.5.3 Culture

Elle est beaucoup trop lente. Elle permet de rechercher la mycobactérie et fournit le support nécessaire pour son identification et sa sensibilité aux antibiotiques. Il existe les milieux de culture solides et les milieux de culture liquides. Avant la mise en culture sur milieu solide, les échantillons subissent une décontamination préalable avec de l'hydroxyde de sodium. Cette étape entraîne la destruction des germes autres que les mycobactéries et permet aux mycobactéries de disposer à elles seules des substances nutritives du milieu nécessaire pour leur croissance car les autres germes à croissance rapide couvrent la surface du milieu et épuisent les substances nutritives présentes.

1.3-Généralité sur la co-infection TB/VIH

1.3.1-Epidémiologie de la co-infection TB/VIH

Sur 8.8 millions de cas de tuberculose dans le monde, 13% sont co-infectés par le VIH soit 1.1 million.

Notons que l'Afrique supporte à elle seule 82% soit 900.000 co-infectés. Trente-sept des 68 pays à haute prévalence de co-infection dans le monde se trouvent en Afrique (9).

1.3.2- Rôle du VIH dans la co-infection

- Le VIH augmente :
 - le risque de progression d'une infection récente à *M. tuberculosis*,
 - le taux de réactivation des infections latentes à *M. tuberculosis*,
 - le taux de rechute de la tuberculose.
- Le VIH modifie la présentation clinique et radiologique de la TB et complique son diagnostic.
- Le VIH augmente la proportion de patients avec TB pulmonaire à frottis négatif (TPM-) et extra pulmonaire (TEP) et se traduit par des résultats faibles du traitement et une mortalité précoce élevée.

1.3. 3-Physiopathologie de la co-infection

L'infection par le VIH favorise le développement de la tuberculose par trois mécanismes principaux :

- le premier mécanisme est une réactivation endogène chez une personne vivante avec le VIH de la tuberculose infection latente. En effet le risque d'un séropositif à développer une tuberculose-maladie est d'au moins 10% l'an alors qu'il est estimé entre 5 à 10% au cours de la vie d'un patient séronégatif,
- le deuxième est une augmentation de la vitesse de progression de la tuberculose maladie,
- le troisième est un accroissement du taux de rechute de la tuberculose et le risque de la transmission de la tuberculose dans la communauté.

Notons que la réaction inflammatoire qui aboutit à la formation du granulome tuberculeux est moindre chez les PVVIH. Il en résulte une faible élimination des bacilles dans les expectorations ; d'où la fréquence des tuberculoses pulmonaires à microscopie négative. Au stade avancé de l'immunodépression, il se produit une dissémination des bacilles à tout l'organisme (Tuberculose extra pulmonaire).

1.4 Revue de la littérature

Gobelens *et al.* (7) dans une étude focalisée sur des tuberculeux pulmonaires à microscopie positive en vue d'évaluer la sensibilité de l'IDR à la tuberculine, avait trouvé que la réduction du seuil de positivité de 10 mm à 5 mm en utilisant l'IDR à la tuberculine chez les tuberculeux pulmonaires non infectés par le VIH, avait entraîné une réduction limitée des faux négatifs. Ces mêmes auteurs affirmaient qu'il y aurait une réduction additionnelle du diamètre de l'induration en cas de diminution du nombre des lymphocytes T CD4, mais leur contribution à ce phénomène semble limitée.

Dodd *et al.* trouvaient que le seuil de positivité optimal pour l'IDR à la tuberculine chez les VIH positifs serait supérieur à 0 mm. L'IDR à la tuberculine était limitée par une faible spécificité chez ceux ayant reçu la vaccination par le BCG, et avait une faible sensibilité chez les personnes infectées par le VIH (4).

Swaminathan *et al.* (16) affirmaient que l'IDR à la tuberculine était un mauvais prédicteur de la TB active avec une valeur prédictive positive de 29%. Ils trouvaient aussi que l'induration donnée par l'IDR à la tuberculine continuait aussi par décroître bien que le taux de CD4 restait supérieur à 500 cellules/mm³. Cette remarque était soutenue par une étude Thaïlandaise effectuée par Yanai *et al* (17).

Lee et al. avaient trouvé que l'IDR à la tuberculine et le test Quantiferon TB Gold avaient une sensibilité et une spécificité élevée autour de 90% pour le diagnostic de la TB active chez des sujets immunocompétents vaccinés au BCG à leur naissance (18).

Chkharstvilli *et al.* dans une étude recherchant la TB latente chez des adultes infectés par le VIH et présentant pour 95% une cicatrice du BCG avaient trouvé une faible sensibilité pour l'IDR à la tuberculine, le Quantiferon TB Gold in Tube et le T.SPOT.TB avec respectivement comme sensibilité 17%, 29%, et 24%, et une faible concordance entre les différentes techniques diagnostiques utilisées QFT-GIT vs. T-SPOT. TB ($\kappa = 0.18$, 95% CI .07-.30), QFT-GIT vs. TST ($\kappa = 0.29$, 95% CI .16-.42), and TST vs. T-SPOT.TB ($\kappa = 0.22$, 95% CI .07-.29).

2. CADRE ET METHODE D'ETUDE

2.1. Cadre d'étude

Notre étude s'était déroulée au Laboratoire de Référence des Mycobactéries (LRM) du Centre National Hospitalier et Universitaire de Pneumo-Phtisiologie (CNHUPP) situé à Cotonou/BENIN.

La République du Bénin est un pays du Golfe de Guinée. Elle couvre une superficie de 114.600 km² et est limitée au Nord par le Niger, au Nord-Ouest par le Burkina-faso, au Sud par l'Océan Atlantique, à l'Est par le Nigéria, et à l'Ouest par le Togo. On dénombre trois principales zones climatiques : un climat subéquatorial avec deux saisons sèches et deux saisons pluvieuses au Sud, un climat tropical semi-humide au centre, et un climat tropical humide au Nord avec une saison sèche et une saison pluvieuse.

Au recensement général de la population de 2002, la population de la ville de Cotonou, était de 665 100 habitants pour une superficie de 3200 Km² (17). Située entre la commune de Sèmè Podji et celle d'Abomey-Calavi, elle est bordée par l'océan Atlantique au Sud et le Lac Nokoué au Nord.

Le LRM est dirigé par, un Professeur Titulaire de bactériologie assisté par un Professeur Agrégé de biologie médicale. Le reste du personnel est constitué de techniciens de laboratoire et d'agents d'entretien.

En dehors de la mise en évidence des BAAR à l'examen direct des crachats et autres prélèvements, le LRM s'occupe aussi :

- de la réalisation des tests de sensibilité aux antituberculeux,
- de la supervision des laboratoires périphériques,
- du contrôle de qualité du réseau de microscopie,
- de la formation et de l'encadrement des techniciens de laboratoire,
- du diagnostic du VIH et du suivi biologique des patients co-infectés TB/VIH.
- du diagnostic microbiologique de l'ulcère de Buruli.
- de l'assistance technique des laboratoires de références de la tuberculose de la région ouest africaine.

2.2. Méthode d'étude

2.2.1. Nature et durée de l'étude

Il s'agissait d'une étude prospective, transversale, descriptive et analytique

L'étude couvrait une période allant du 26/06/2012 au 31/12/2012.

2.2.2. Population d'étude

L'étude concernait un échantillon de patients tuberculeux pulmonaire à bacilloscopie positive.

2.2.2.1. Critères d'inclusion

Avaient été inclus dans notre étude les sujets :

- dont l'âge était supérieur ou égal à 15 ans,
- ayant une tuberculose pulmonaire à microscopie positive,
- ayant eu un dépistage du VIH par test sérologique,
- ayant donné son consentement éclairé pour la participation à l'étude.

2.2.2.2. Critères d'exclusion

Avaient été exclus de l'étude les patients TPM+ ayant eu une sérologie VIH indéterminée et ceux qui n'ont pas donné leur consentement pour participer à l'étude

2.2.2.3. Taille de l'échantillon

Tous les sujets répondant aux critères d'inclusion étaient sélectionnés consécutivement et de façon exhaustive pendant la durée de l'étude PITUVI au CNHUPP. Au total, 300 patients répondant à nos critères d'inclusion ont constitué l'objet de l'étude.

2.2.2.3.1 Les outils et la technique de collecte

Nous avons utilisé la base de données de l'étude PITUVI réalisée en 2012. Des pots pré-étiquetés avaient été utilisés au prélèvement des crachats. Nous avons personnellement collecté les données nécessaires à l'étude.

2.2.2.3.2 Le déroulement de l'étude

La collecte des échantillons consistait à réaliser l'IDR à la tuberculine et la sérologie VIH chez 300 sujets âgés d'au moins 15 ans, atteints de tuberculose-maladie après examen direct des crachats au laboratoire et ayant accepté de participer à notre étude. Les sujets étaient inclus consécutivement au CNHUPP jusqu'à atteindre le nombre de 300 patients.

La sérologie VIH, et l'IDR étaient effectuées le jour où le patient était inclus dans l'étude. Le prélèvement pour le comptage des lymphocytes T CD4 de même que la lecture de l'IDR sont faits trois jours plus tard.

2.2.2.3.3 Procédure de traitement des échantillons

Cette procédure prend en compte toutes les manipulations effectuées sur les échantillons de crachats, la sérologie VIH, l'IDR et le comptage de lymphocytes T CD4.

❖ Recueil et traitement des échantillons de crachats

Le prélèvement de crachat était réalisé dans un environnement sécurisé chez tous les sujets dans des pots pré-étiquetés. Un premier échantillon était recueilli sur place et le deuxième le lendemain matin au domicile.

Les échantillons ont fait l'objet de recherche de BAAR dans les crachats au microscope à fluorescence LED après coloration à l'auramine.

La bacilloscopie, la sérologie VIH, l'IDR et le comptage des lymphocytes T CD4 de l'étude ont été entièrement pris en charge par le Programme National contre la Tuberculose (PNT).

❖ La sérologie VIH

Pour chaque sujet tuberculeux inclus, nous avons réalisé un prélèvement sanguin dans un tube sec sur lequel était inscrit le numéro d'identification du sujet.

Le diagnostic de l'infection à VIH a été effectué selon l'algorithme en vigueur au Bénin, c'est-à-dire la stratégie de type II de l'OMS (1) avec les tests rapides (Determine HIV-1/2 et Immunocomb II HIV1/HIV2).

❖ L'intradermo réaction (IDR)

A chaque sujet inclus, l'IDR était réalisée après le prélèvement sanguin pour sérologie VIH.

La tuberculine PPD RT23 du Serum Statens Institute de Copenhague était utilisée. On avait injecté en intradermique 0,1 ml.

La lecture des tests tuberculiques a été faite 3 jours après l'injection intradermique.

❖ Numération des lymphocytes T CD4

Pour les sujets séropositifs VIH, un deuxième prélèvement sur tube EDTA était fait au 3^{ème} jour (jour de la lecture de l'IDR) pour la numération des lymphocytes T CD4.

2.2.3 Examens biologiques

2.2.3.1 Matériels

✓ Matériel de prélèvement et de conservation des échantillons :

Il s'agit :

- Des pots stériles pour le recueil des crachats,
- Des tubes stériles secs pour les prélèvements sanguins destinés à la sérologie VIH,
- Des tubes EDTA pour les prélèvements sanguins de LTCD4,
- Un marqueur et un stylo à bille,
- La chambre froide à 4 degrés Celsius du CNHUPP

✓ Matériel pour la microscopie :

Il s'agit :

- Un crayon,
- Une lame pour étalement,
- Une flamme,
- Des gants,
- Des bâtonnets pour étalement sur lame,
- Les solutions d'auramine, d'alcool acide et de permanganate de potassium.

✓ **Matériel pour la sérologie VIH :**

Ce sont :

- Un marqueur,
- Des gants,
- Une centrifugeuse,
- Détermine HIV1/HIV2 (premier test),
- Immunocomb II HIV 1/2 BiSpot (deuxième test)
- Une pipette Pasteur,
- Un cône jaune.

✓ **Matériel pour l'IDR**

Il s'agit de :

- Un fauteuil,
- Un réfrigérateur,
- Du coton,
- Une aiguille d'insuline jetable à biseau court,
- Une seringue jetable de 1ml graduée en centième de ml,
- Une boîte jaune de sécurité pour rejet des seringues et des aiguilles,
- Un flacon de tuberculine PPD RT 23 SSI,
- L'alcool 90°,
- Un double décimètre.

✓ **Matériel pour le taux de LTCD4**

Ce sont :

- Un réfrigérateur,
- Un automate Cyflowcounter I,
- Une minuterie,
- Une micropipette de 20 µl non réglable,
- Une micropipette de 1000 µl,
- Un portoir,

- Une boîte à déchets,
- Une poubelle,
- Des portes cônes,
- Des marqueurs indélébiles,
- Des tubes de dilution cytecs,
- Des cônes de 10 µl à 50µl,
- Des cônes de 1ml,
- Un rouleau de papier essuie-tout,
- Des gants,
- Un stylo à bille,
- Un coffret de réactif CD4easy count kit,
- Une solution de nettoyage (vert),
- Une solution de décontamination (violet),
- Un sheathfluid,
- Un count check beads (contrôle).

2.2.3.2 Techniques et résultats

2.2.3.2.1 Microscopie

Après réalisation du frottis, la lame est séchée à température ambiante et fixée à la flamme puis colorée à l'auramine, décolorée à la solution alcool acide et contre colorée au permanganate de potassium (cf. annexes). Ensuite on passe à la lecture au microscope à fluorescence.

Le résultat : il était positif ou négatif.

2.2.3.2.2 Sérologie VIH

- **Test Determine HIV1/2**

- ✓ **Principe**

Abbott Determine est un test immunochromatographique pour la détection qualitative des anticorps anti-VIH-1/2.

L'échantillon est déposé sur la zone de dépôt de l'échantillon. Comme l'échantillon migre jusqu'à la zone de dépôt du conjugué, il se reconstitue et se mélange avec le conjugué colloïde de sélénium-antigène. Ce mélange continue à migrer sur la phase solide jusqu'aux antigènes recombinants immobilisés et aux peptides synthétiques au niveau de la fenêtre-patient.

Si les anticorps anti-VIH-1/2 sont présents dans l'échantillon, ils se lient à l'antigène du conjugué antigène-colloïde de sélénium et à l'antigène de la fenêtre-patient en formant une ligne rouge.

Si les anticorps anti-VIH-1/2 sont absents, le conjugué antigène-colloïde de sélénium traverse la fenêtre-patient sans donner de ligne rouge.

La barre de contrôle de la procédure est incluse dans ce système de test afin d'assurer la validité du test.

✓ **Manipulation**

- Inscrire le numéro d'identification de chaque sujet sur chaque prélèvement et chaque test.
- Centrifuger les échantillons à 3000 tours/mn pendant 5 mn.
- Prélever 50µl du sérum de patient obtenu après centrifugation.
- Déposer à l'aide d'une pipette de précision sur la zone de dépôt de l'échantillon (Symbole : flèche).
- Attendre 15 minutes au moins (maximum 60 minutes) et lire le résultat.

Le résultat : il était positif ou négatif.

• **Immunocomb II HIV 1/2 BiSpot**

✓ **Principe et manipulation**

La trousse ImmunoComb II HIV 1/2 BiSpot est un test immuno-enzymatique indirect en phase solide. La phase solide est un peigne de 12 dents, chaque dent étant sensibilisée à sa surface en trois points ou spots de réaction :

Spot supérieur : Anticorps de chèvre anti-immunoglobulines humaines (Contrôle interne)

Spot médian : peptides synthétiques VIH-2

Spot inférieur : peptides synthétiques VIH-1

Le test n'utilise que le sérum ou le plasma comme échantillons.

Tous les réactifs nécessaires à la réalisation du test sont prêts à l'emploi et pré distribués dans le bac de développement.

Le bac de développement est divisé en six compartiments (A à F) de 12 puits chacun ; chaque compartiment correspond à un réactif et à une étape du test.

Le déroulement du test consiste à transférer le peigne d'un compartiment à l'autre.

Le test débute par la distribution des échantillons de sérum ou de plasma dans les puits du compartiment A du bac de développement.

Le peigne est alors introduit dans les puits de compartiment A du bac de développement. Les anticorps anti-VIH éventuellement présents dans les échantillons testés se lient de façon spécifique aux peptides synthétiques du VIH immobilisés à la surface des dents du peigne.

Parallèlement, les immunoglobulines humaines contenues dans les échantillons sont capturées au niveau du spot supérieur par les anticorps anti-IgG humaines (contrôle interne).

Tout anticorps non fixé de façon spécifique lors de cette première étape est éliminé au cours d'une étape de lavage dans le compartiment B.

Dans le compartiment C, les immunoglobulines humaines de classe IgG fixées sur les dents du peigne sont reconnues par les anticorps de chèvre anti-IgG humaines conjugués à la phosphatase alcaline (PA).

Après deux nouvelles étapes de lavage dans les compartiments D et E, la phosphatase alcaline réagit dans le compartiment F avec un composé chromogénique.

Cette dernière réaction entraîne la visualisation des résultats sous forme de spots gris-bleu à la surface des dents du peigne.

Le principe se résume à :

- La formation du complexe peptide VIH - anticorps (10 mn),

- La fixation du conjugué anti IgG humaines (10 mn),
- La réaction enzymatique colorée (10 mn).

La trousse comprend un contrôle positif (anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2) et un contrôle négatif qui doivent être inclus dans chaque série.

Une fois le test réalisé, trois spots gris-bleu doivent être visibles sur la dent du contrôle positif.

Sur la dent du contrôle négatif, seul le spot supérieur de contrôle interne doit être visible.

Enfin le spot supérieur de contrôle interne doit être visible sur chaque dent correspondant à un échantillon testé, confirmant ainsi un dépôt correct de l'échantillon, le bon fonctionnement des réactifs ainsi qu'une manipulation correcte.

2.2.3.2.3 Intradermoréaction à la tuberculine

- ✓ **Principe :** il est basé sur l'hypersensibilité de type retardé induite par l'injection de composants antigéniques de *M. tuberculosis*.
- ✓ **Manipulation :**
 - Mettre le flacon de tuberculine à la température ambiante pendant 10 minutes au moins,
 - Installer le patient dans le fauteuil,
 - Faire un tampon d'alcool,
 - Demander au patient de tendre le bras gauche,
 - Faire sortir la seringue de son emballage et aspirer un peu plus de 0,1ml de tuberculine,
 - Chasser l'air et ajuster le volume exactement à 0,1ml en purgeant la solution en excès dans le flacon,
 - Nettoyer le 1 / 3 médian de la face antérieure de l'avant-bras gauche à l'aide du tampon d'alcool,
 - Empoigner l'avant-bras et tendre légèrement la peau,
 - Introduire la pointe de l'aiguille (maintenue tangentielle à la surface de la peau biseau vers le haut) dans la couche superficielle du derme,

- Injecter lentement la solution. Une petite papule de 8 à 10 mm de diamètre apparait et persiste environ 10 mn.

Préciser au patient :

- D'éviter de gratter en cas de démangeaison la zone d'injection.
- D'éviter de frotter la zone d'injection avec l'éponge lors des bains.
- D'éviter de soigner avec quelques produits que ce soient en cas d'apparition d'ampoule ou de plaie.
- De revenir rigoureusement au laboratoire avec son bulletin d'examen à la date inscrite sur ce dernier.

✓ Le résultat

La lecture de la réaction doit être faite dans les 72 heures après l'injection.

→ Chez les personnes non infectées par le VIH

≥10millimètres	POSITIF
<5millimètres	NEGATIF

→ Chez les personnes infectées par le VIH

≥ 05millimètres	POSITIF
<2 millimètres	ANERGIE

2.2.3.2.4 Comptage des lymphocytes TCD4

- Pipeter 20µl d'anticorps dans chaque tube de dilution préalablement numéroté.
- Bien homogénéiser le sang par retournements à la main (environ 5 fois).
- Déposer 20µl de sang total dans chaque tube correspondant.
- Bien mélanger au vortex ou à défaut en secouant à la main.
- Incuber le mélange pendant 15 mn à l'abri de la lumière.
- Au bout des 15 mn, sortir les tubes de l'obscurité.

- Ajouter 1000µl de solution tampon sur le mélange (correspond à un facteur de dilution de 52 : Dilut. 52.000).
- Homogénéiser délicatement le mélange à l'aide d'une pipette munie d'embout en évitant de créer des bulles d'air.
- Vérifier sur l'écran de l'automate que le facteur de dilution inscrit dans l'appareil (en bas, à gauche) est bien : 52 .Si non, le changer.

Lecture

Elle se fait échantillon par échantillon en introduisant dans l'appareil le numéro de l'échantillon. (cf. annexes)

2.2.4 Définitions de variables

✓ Phase descriptive

- **La performance de l'IDR à la tuberculine** : est le rapport entre le nombre de patients ayant eu une valeur de l'induration cutanée après injection de tuberculine, supérieure ou égale au seuil de positivité choisi (5 mm, 10 mm ou 15 mm) sur le nombre total de patients diagnostiqués TPM+ par la technique d'auramine (Gold standard). Par abus dans notre étude, nous avons assimilé la performance de l'IDR à la sensibilité de l'IDR.

- L'**anergie** était définie comme tout patient ayant eu une induration cutanée dont les valeurs étaient 0, 1 ou 2 mm après injection de tuberculine.

✓ Phase analytique

Cette phase ne concerne que les co-infectés TB-VIH de l'étude.

Le diamètre d'induration de l'IDR constitue la variable dépendante tandis que la variable indépendante est représentée par la numération des lymphocytes T CD4.

2.2.5 Traitement et analyse des données

Les données ont été enregistrées dans un fichier Excel version 2003 et l'analyse a été faite par le logiciel Epi info version 2007. Les variables qualitatives étaient exprimées sous la forme de

proportions assorties de leur intervalle de confiance à 95% et les variables quantitatives étaient exprimées sous forme de moyennes assorties de leur déviation standard. La phase analytique avait étudié l'association entre la numération des lymphocytes CD4 et le diamètre de l'induration obtenue après IDR chez les co-infectés TB/VIH. Le seuil de signification du test de chi carré était $p < 0,05$.

2.2.6 Considérations éthiques

L'avis du Comité National d'Ethique pour la Recherche en Santé avait été obtenu pour toute l'étude PITUVI donc valable pour cette sous étude sur la sensibilité de l'IDR.

2.2.7 Biais et limites de l'étude

La limite essentielle de cette étude réside dans le fait que la mesure de la sensibilité de l'IDR à la tuberculine, à elle seule ne suffit pas comme paramètre pour apprécier les performances d'un test diagnostique. L'inclusion de patients négatifs pour la recherche des BAAR par la technique de l'auramine chez qui l'IDR serait fait nous aurait permis de connaître la spécificité de l'IDR à la tuberculine et de calculer les valeurs prédictives positives et prédictives négatives.

3. RESULTATS

Pendant la durée de l'étude PITUVI, 300 patients étaient diagnostiqués Tuberculeux Pulmonaires à Microscopie positive (TPM+) dont 46 étaient co-infectés par le VIH soit 15,33% IC95% [11,61-20,18] de co-infectés TB/VIH.

Les résultats de l'étude seront présentés selon le plan ci-après :

- Une première partie consacrée à la phase descriptive de l'étude.
- Une deuxième partie consacrée à la phase analytique étudiant l'association entre la numération des lymphocytes T CD4 et le diamètre de l'induration obtenue à l'IDR.

3.1 Description de la population étudiée

3.1.1 les caractéristiques socio-démographiques

La moyenne d'âge était de 34,36 ($\pm 11,67$) ans.

Chez les co-infectés TB/VIH les tranches d'âge de 25 à 34 ans (29,55%) et 35 à 44 ans (36,36%) étaient les plus représentées soit un total de 65,91%. La même tendance était observée chez les TPM+ non infectés par le VIH avec les tranches d'âge de 25 à 34 ans (36,14%) et 35 à 44 ans (25,70%) soit un total de 61,84%. (cf. Tableau I)

Le sexe féminin était le plus représenté chez les co-infectés TB/VIH (60,87%) contrairement aux tuberculeux non infectés au VIH où le sexe masculin était prépondérant (71,60%). (cf. Tableau I).

3.1.2 Les caractéristiques immuno-cliniques (Tableau I)

La moyenne du diamètre de l'induration de l'IDR était 10,72 ($\pm 8,72$) mm chez les co-infectés TB/VIH alors qu'il était à 15,17 ($\pm 5,31$) chez les tuberculeux non infectés par le VIH. La mesure de l'IDR à la tuberculine n'avait pu être faite chez 03/46 co-infectés TB/VIH soit 06,51%

Plus du tiers des co-infectés TB/VIH (37,21%) présentaient une anergie à l'IDR, contre 07,20% des tuberculeux non infectés par le VIH.

Souvent les co-infectés TB/VIH avaient une numération des lymphocytes T CD4 ≤ 200 cellules/mm³ soit 76,32% d'immunodéprimés sévères. Notons que 08/46 co-infectés n'avaient eu de comptage des lymphocytes CD4

Plus de la moitié de l'échantillon tant chez les co-infectés (65,91%) que chez les tuberculeux non infectés par le VIH (69,20%) présentaient une cicatrice de BCG.

Tableau I: Caractéristiques socio-démographiques et immuno-cliniques de l'échantillon

Variables	Patients VIH négatifs n(%)	Patients VIH positifs n(%)
Classe âge (ans)	N=249	N=44
15-24	54(21,6)	06(13,64)
25-34	90(36,14)	13(29,55)
35-44	64(25,70)	16(36,36)
45-54	26(10,44)	06(13,64)
≥ 55	15(06,02)	03(06,82)
Sexe	N=250	N=46
Féminin	71(28,40)	28(60,87)
Masculin	179(71,60)	18(39,13)
IDR	N=250	N=43
≤ 2 mm	18(07,20%)	16(37,21%)
[3 -4]	-	-
[5-9]	02(00,80%)	-
[10-15[60(24,00%)	07(16,28%)
≥ 15 mm	170(68,00%)	20(46,51%)
CD4		N=38
<200	-	29(76,32%)
[200-350]	-	03(07,89%)
[351-499]	-	03(07,89%)
≥ 500	-	03(07,89%)
BCG	N=250	N=44
OUI	173(69,20%)	29(65,91%)
NON	77(30,80%)	15(34,09%)

3.1.3 la sensibilité de l'IDR selon les différents seuils de positivité de l'IDR

Tableau II: Sensibilité de l'IDR pour le diagnostic de tuberculose avec les seuils variés de 5mm, 10mm, et 15mm avec la bacilloscopie comme le gold standard

Sensibilité	HIV négatifs	HIV positifs
	N=250	N=43
	n (%)	n(%)
≥5mm	232 (92,80)	27(62,79)
≥10mm	230 (92,00)	27(62,79)
≥15mm	170 (68,00)	20(46,52)

Chez les co-infectés TB/VIH la performance brute de l'IDR pour le diagnostic de la TPM+ selon les seuils de positivité ≥ 5 mm et ≥ 10 mm était la même soit 62,79%. (cf. Tableau II)

Chez les tuberculeux non infectés par le VIH, la performance brute de l'IDR pour le diagnostic de la TPM+ selon les seuils de positivité ≥ 5 mm et ≥ 10 mm était forte, respectivement de 92,80% et 92%. (Tableau II)

Quant à la performance ajustée spécifiquement à l'anergie due à la tuberculose (07,20% chez les tuberculeux non infectés par le VIH), elle est de 70% aux seuils de positivité ≥ 5 mm et ≥ 10 mm chez les co-infectés TB/VIH.

3.2 Phase analytique : Etude de l'association entre le diamètre de l'induration de l'IDR et la numération des CD4

Tableau III: Association entre la numération des lymphocytes T CD4 et l'induration obtenue après IDR pour un seuil diagnostique de l'IDR à la tuberculine 5 mm

	≤5 mm n(%)	≥5 mm n(%)	OR [IC95%]	P
CD4 (cells/mm)				
≤ 200	11(85)	18 (72)	2,14[0,37-2,20]	0,64
>200	02(15)	07(28)		

Tableau IV: Association entre la numération des lymphocytes T CD4 et l'induration obtenue après IDR pour un seuil diagnostique de l'IDR à la tuberculine ≥10 mm

	≤10 mm n(%)	≥10 mm n(%)	OR [IC95%]	P
CD4 (cells/mm)				
≤200	11(85)	18 (72)	2,14[0,37-2,20]	0,64
>200	02(15)	07(28)		

Il n'existerait pas d'association statistiquement significative entre le niveau d'immunodépression et le diamètre de l'induration de l'IDR (cf. Tableau III et IV) soit un OR=2,14[0,37-2,20] avec une probabilité P=0,64. Cette tendance a été la même aux seuils de 5 mm et de 10 mm.

4. DISCUSSION

Notre discussion s'articulera autour de deux grands axes

4.1 La validité méthodologique

Au cours d'une étude transversale, nous avons mesuré la performance de l'IDR, qui est un test utilisé pour le diagnostic de l'infection tuberculeuse latente. Nous avons utilisé comme Gold standard les résultats de la bacilloscopie basés sur la coloration à l'auramine. Nous savions que la coloration à l'auramine identifie même les mycobactéries non tuberculeuses, donc exposant à un risque de faux positifs. De même l'IDR à la tuberculine ne ferait pas aussi de différence avec les mycobactéries non tuberculeuses. Cette insuffisance commune entre la méthode de coloration à l'auramine (Gold standard) et la méthode évaluée (IDR à la tuberculine) nous a permis de mitiger un peu l'influence des faux positifs.

Nous avons pu atteindre tout au moins tous les objectifs qui avaient été fixés pour cette étude.

4.2 La discussion des principaux résultats

La performance brute de l'IDR est la même soit 62,79% à un seuil de positivité de ≥ 5 mm et ≥ 10 mm. L'autre résultat non moins important serait lié au fait qu'il n'y aurait pas d'association entre la numération des lymphocytes T CD4 et le diamètre de l'IDR.

Nos résultats sont similaires à ceux d'autres études comme celle effectuée par Gobelens *et al.* Tanzanie en 2006 (7), qui révélait un bénéfice limité avec une augmentation de sensibilité brute qui serait passée de 64,3% pour un seuil de positivité à 10 mm à 71,2% pour un seuil de 05 mm. Swaminathan *et al.* ont rapporté aussi un bénéfice limité de cette réduction du seuil de positivité à 5 mm (19). Il est vrai que dans chacune de ces deux études le Gold standard du diagnostic de la tuberculose pulmonaire choisi est la méthode de Ziehl- Neelsen. Le fait que la distribution des diamètres de l'IDR chez les VIH positifs ayant une tuberculose active est très similaire à celle des VIH positifs ayant une TB latente exceptée pour ceux qui ont une anergie (20-22), nous a permis d'extrapoler les résultats de la performance de l'IDR obtenue chez des TPM+, à des cas d'infection tuberculeuse latente. Il en résulte que diminuer le seuil de positivité jusqu'à un seuil ≥ 5 mm ne serait pas toujours justifié dans le diagnostic de la tuberculose latente. Par contre cette performance de l'IDR chez les tuberculeux non infectés par le VIH était à 92%, donc relativement plus élevée que les 62% retrouvée chez les co-

infectés TB/VIH. Cette différence de sensibilité pourrait s'expliquer par la forte anergie retrouvée chez les co-infectés qui était environ à 37% dans notre étude. Cette fréquence de l'anergie se retrouve dans la même tranche de fréquence d'anergie 30% à 49% retrouvée par d'autres auteurs (23-26). Certains auteurs ont trouvé que l'anergie serait liée à un taux de $CD4 < 100$ cellules/mm³ mais même à des taux élevés ($CD4 \geq 400$), on continuait par noter une décroissance de l'induration liée à l>IDR (16, 27, 28). On pourrait en déduire qu'il n'existerait pas une association entre la numération des CD4 et l'importance de l'induration liée à l>IDR. Les données de notre étude (tableaux III et IV) ont confirmé cette assertion car aucune association n'aurait été retrouvée aux seuils de 5 et 10 mm avec un $OR=2,14[0,37-2,20]$ et $p=0,64$, bien que la majorité des co-infectés 29(76,32%) étaient immunodéprimés sévères. La positivité de l>IDR serait beaucoup plus liée au taux d'IL12 au niveau plasmatique. Or l'IL12 est sécrété par les macrophages, dont le rôle est altéré en cas d'effondrement de l'immunité médiée par les Th1, phénomène fréquemment précurseur de la TB active. Aussi l'infection tuberculeuse latente, amène le *M. tuberculosis* grâce à ces mécanismes d'échappement à réduire la sécrétion de l'IL12 par les macrophages (29).

En effet, le fait que la performance soit la même à un seuil de ≥ 5 mm qu'à ≥ 10 mm, nous fait déduire qu'il n'y aurait pas eu d'amélioration de la performance de l>IDR chez les VIH positifs quand on a abaissé le seuil de positivité de l>IDR à 5 mm et que donc cette réduction du seuil ne serait pas toujours justifiée.

La tranche d'âge de 25-44 ans était la plus affectée tant par la co-infection TB/VIH que la mono-infection TB. do Prado *et al.* au Brésil trouvaient une tendance similaire dans une publication récente où la tranche d'âge de 20-39 ans représentait 57% de l'échantillon des co-infectés TB/VIH (30).

Le sexe féminin était le plus représenté chez les co-infectés, alors que le genre masculin était le plus fréquent chez les mono-infectés TB. Cette tendance à la féminisation de l'infection par le VIH dans la population générale a été rapportée par l'ONU-SIDA (31).

Plus de la moitié des co-infectés TB/VIH et mono-infectés de notre échantillon était vacciné par le BCG. La vaccination par le BCG serait responsable de faux positifs après le test de l>IDR, si l>IDR était réalisé dans les six semaines après immunisation par le BCG. Le PEV selon l'OMS recommande la vaccination par le BCG la première semaine de vie au Bénin.

Dans tous les cas, des auteurs comme Swaminathan *et al.* n'ont pas trouvé de différence de positivité de l'IDR selon qu'on ait fait ou pas la vaccination par le BCG (19).

Notre étude réalisée de façon transversale avec une composante analytique présentait comme forces essentielles d'étudier le gain ou non en sensibilité de l'IDR si on diminuait le seuil de positivité de l'IDR de 10 mm à 5 mm. Aussi elle a permis d'évaluer l'association entre le diamètre de l'induration obtenu après IDR et la numération des lymphocytes T CD4. Les faiblesses sont mineures et n'ont pas un impact réel sur les objectifs que nous avons fixé pour ce mémoire. Le taux d'IL12 non exploré nous aurait permis de mieux comprendre cette fréquence élevée de TB chez les VIH positifs qui pour la majorité avait un taux de lymphocytes T CD4 élevé. Bien que la performance de l'IDR nous permettrait de diagnostiquer 2 cas sur 3 de TB latente chez les PVVIH, nos données ont montré qu'il n'y avait pas de différences de performance aux seuils de 5 et 10 mm. La détermination des valeurs prédictives positives et prédictives négatives nous aurait permis de mieux cerner les performances des différents seuils diagnostics. Swaminathan *et al.* trouvaient une VPP de 29% et concluaient que l'IDR ne serait pas un test indiqué ni pour le diagnostic de la TB active ni pour la TB latente (16). Dans certains pays, il a été proposé d'utiliser les tests de détection basés sur l'Interferon Gamma Releasing Assay (IGRA), pour la recherche de la tuberculose latente, notamment chez le personnel de santé (32). D'autres auteurs à travers une méta-analyse, trouvaient que les tests IGRA avaient une meilleure sensibilité que l'IDR (33) pour la détection de la TB latente. A l'opposé certains ont souligné un manque de concordance entre l'IDR et les tests IGRA (Quantiferon TB Gold) (34) pour le diagnostic de la TB latente. Pour améliorer la sensibilité de l'IDR et du test IGRA (T SPOT.TB) pour le diagnostic de la TB latente chez les VIH positifs, il a été proposé une combinaison de l'IDR et du TSPOT.TB (35). De plus en Corée, Lee *et al.* n'ont pas pu trouver de différence entre l'IDR et le test IGRA (Quantiferon TB Gold) pour le diagnostic de la TB active chez de jeunes patients tuberculeux de 20-29 ans non infectés par le VIH (18).

CONCLUSION

La réduction du seuil de positivité de 10 mm à 5 mm chez les co-infectés pour le diagnostic de la TPM+ avec l'IDR n'améliorerait pas la performance de l'IDR.

Il n'existerait pas d'association entre le diamètre obtenu à l'IDR à la tuberculine et la numération des lymphocytes T CD4 chez les co-infectés TB/VIH.

A l'issue de cette étude il apparaît que la chute du taux plasmatique de l'IL12 pourrait être un facteur déterminant du passage à la tuberculose active. Nous nous proposons dans une étude ultérieure de faire un dosage périodique de l'IL12 dans une cohorte de PVVIH ayant une IDR ≥ 10 mm, afin de rechercher une association entre la chute d'IL12 et la survenue d'une TB active.

Quant aux suggestions elles vont :

→ A l'endroit du personnel soignant

- Proposer la prévention de la tuberculose par chimioprophylaxie à l'isoniazide aux PVVIH.

→ A l'endroit des autorités du Programme National contre la Tuberculose du Bénin

- Réactualiser les critères de définition de la tuberculose latente chez les PVVIH en passant du seuil de 5 mm au seuil de 10 mm en attendant d'avoir les moyens d'appliquer les normes OMS qui propose les test IGRA.
- Rendre disponible la tuberculine dans tous les Centres de Diagnostic et Traitement de la tuberculose et sur tous les sites de prise en charge des PVVIH au Bénin.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. WHO. Global Tuberculosis Report 2014. Geneva: WHO2014.
2. WHO. Priority research questions for TB/HIV in HIV-prevalent and resource-limited settings. Geneva: World health Organization TB/HIV working group2010.
3. WHO, UNAIDS. Policy statement on preventive therapy against tuberculosis in people living with HIV. Geneva1998.
4. Dodd PJ, Millington KA, Ghani AC, J M, Butterworth AE, Lalvani A, et al. Interpreting Tuberculin Skin Tests in a Population With a High Prevalence of HIV, Tuberculosis, and Nonspecific Tuberculin Sensitivity. *Am J Epidemiol.* 2010;171(9):1037-45.
5. Woldehanna S, Volmink J. Treatment of latent tuberculosis infection in HIV infected persons. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2004(1):CD000171.
6. ATS. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *MMWR Recomm Rep*2000.
7. Cobelens FG, Egwaga SM, van Ginkel T, Muwinge H, Matee MI, Borgdorff MW. Tuberculin Skin Testing in Patients with HIV Infection: Limited Benefit of Reduced Cutoff Values. *CID.* 2006;43:634-9.
8. WHO:global health sector response to HIV, 2000-2015: focus on innovations in 2015 . <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/hiv-treat-all-recommendation/en/>, <http://www.unaids.org/en/resources/campaigns/2014/2014gapreport/videofootage/;2014>. [accessed on 12/01/2015]
9. PNT. Rapport annuel 2014. Cotonou: Programme National contre la Tuberculose du Bénin2014 Avril 2015.
10. Girard PM, Katlama C, Pialoux G, editors. VIH:Edition 2011. Paris2011.
11. Smith I. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and Molecular Determinants of virulence. *Clinical Microbiology Reviews.* 2003;16(03):463-96.
12. CMIT, editor. E.Pilly: infections bactériennes-chapitre 69: la tuberculose. Paris1995.
13. Taytard A. Tuberculose: physiopathologie. 2005 [cited 2015 28/10/2015]; Available from: <http://www.respir.com/doc/abonne/pathologie/tuberculose/TuberculosePhysiopath1.asp>.
14. Tattevin P. Le traitement de l'infection tuberculeuse latente au cours de l'infection à VIH. Rennes2011 [cited 2015 28/10/2015]; Available from: <http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/2011/bk-vih2011-07.pdf>.

15. Gentlini M, Caumes E, Danis M, Richard-lenoble D, Bégué P, Touze J, et al., editors. Tuberculose:Médecine tropicale. 6 ed. Paris2012.
16. Swaminathan S, Subbaraman R, Venkatesan P, Subramanyam S, Kumar SR, Mayer KH. Tuberculin skin test results in HIV-infected patients in India:implications for latent tuberculosis treatment. *Int J TUBERC LUNG DIS*. 2008;12(2):168-73.
17. Yanai H, Uthaiworavit W, Mastro T D, Limpakarnjanarat K, Sawanpanyalert P, Morrow RH Jr, et al. Utility of tuberculin and anergy skin testing in predicting tuberculosis infection in human immunodeficiency virus-infected persons in Thailand. *Int J TUBERC LUNG DIS*. 1997;14.(5):25-34.
18. Lee JE, Kim HJ, Lee SW. The clinical utility of tuberculin skin test and interferon-g release assay in the diagnosis of active tuberculosis among young adults:a prospective observational study. *BMC Infectious Diseases*. 2011;11(96).
19. Swaminathan S, Subbaraman R, Venkatesan P, Subramanyam S, Kumar SR, Mayer KH, et al. Tuberculin skin test results in HIV-infected patients in India:implications for latent tuberculosis treatment. *INT J TUBERC LUNG DIS*. 2008;12(2):168-73.
20. Slovis BS, Plitman JD, DW. H. The case against anergy testing as a routine adjunct to tuberculin skin testing. *JAMA* 2000;283:2003-7.
21. Slovis BS, Plitman JD, DW. H. Guidelines for conducting tuberculin skin test surveys in high prevalence countries. *Tuber Lung Dis*. 1996;77(Suppl 1):1-19.
22. Comstock G, Edwards L, Philip R, Winn W. A comparison in the United States of America of two tuberculins, PPD-S and RT23. *Bull World Health Organ*. 1964;31:161-70.
23. Graham NM, Nelson KE, Solomon L, Bonds M, Rizzo RT, Scavotto J, et al. Prevalence of tuberculin positivity and skin test anergy in HIV-1-seropositive and -seronegative intravenous drug users. *JAMA*. 1992;267(3):369-73.
24. Moreno S, Baraia-Etxaburu J, Bouza E, Parras F, Pérez-Tascón M, Miralles P, et al. Risk for developing tuberculosis among anergic patients infected with HIV. *Ann Intern Med*. 1993;119(3):194-8.
25. Caiaffa WT, Graham NM, Galai N, Rizzo RT, Nelson KE, Vlahov D. . Instability of delayed-type hypersensitivity skin test anergy in human immunodeficiency virus infection. *Arch Intern Med* 1995;155:2111–7.
26. Anastos K, Kalish LA, Palacio H, Delapenha R, Chirgwin K, Stonis L, et al. Prevalence of and risk factors for tuberculin positivity and skin test anergy in HIV-1–infected

- and uninfected at-risk women. Women's Interagency HIV Study (WIHS). *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1999;21:141–7.
27. Yanai H, Uthairavit W, Mastro T D, Limpakarnjanarat K, Sawanpanyalert P, Morrow RH Jr, et al. Utility of tuberculin and anergy skin testing in predicting tuberculosis infection in human immunodeficiency virus-infected persons in Thailand. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1997;1(5):425-34.
 28. Tegbaru B, Wolday D, Messele T, Legesse M, Mekonnen Y, Miedema F, et al. Tuberculin skin test conversion and reactivity rates among adults with and without human immunodeficiency virus in urban settings in Ethiopia. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: . 2006;13(7):784–9.
 29. José Bordón, Michael W. Plankeyb, Mary Youngb, Ruth M. Greenblattf, C. M. Villacresg A, et al. Lower levels of inteleukin-12 precede the development of Tuberculosis mong HIV-infected women. *Cytokine.* 2011 November 2011;56.(2):325–31.
 30. do Prado TN, AE M, de Souza FM, dos Santos Dias E, Fernandes Sousa LK, Arakaki-Sanchez D, et al. Factors associated with tuberculosis by HIV statusin the Brazilian national surveillance system: a cross sectional study. *BMC Infect Dis.* 2014;14(415).
 31. ONUSIDA. Rapport ONUSIDA sur l'épidémie Mondiale du VIH/SIDA en 2013. Genève: UNAIDS2013.
 32. Moucaut A, Nienhaus A, Courtois B, Nael V, Longuenesse C, B R, et al. The effect of introducing IGRA to screen French healthcare workers for tuberculosis and potential conclusions for the work organisation. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 2013;8(12).
 33. Diel R, Goletti D, Ferrara G, Bothamley G, Cirillo D, Kampmann B, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2011;37(1):88–9.
 34. Chkhartishvili N, Kempker RR, Dvali N, Abashidze L, Sharavdze L, Gabunia P, et al. Poor agreement between interferon-gamma release assays and the tuberculin skin test among HIV-infected individuals in the country of Georgia. *BMC Infect Dis.* 2013;13(213).
 35. Elzi L, Steffen I, Furrer H, Fehr J, Cavassini M, Hirschel B, et al. Improved sensitivity of an interferon-gamma release assay (T-SPOT.TB™) in combination with tuberculin skin test for the diagnosis of latent tuberculosis in the presence of HIV co-Infection. *BMC Infect Dis.* 2011;11(319).