

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA. BEJAIA

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Microbiologie



Option : Microbiologie Moléculaire et Médicale

Réf :.....

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme

Master

Thème

**Bacilloscopie direct dans le diagnostic de la
tuberculose pulmonaire**

Présenté par :

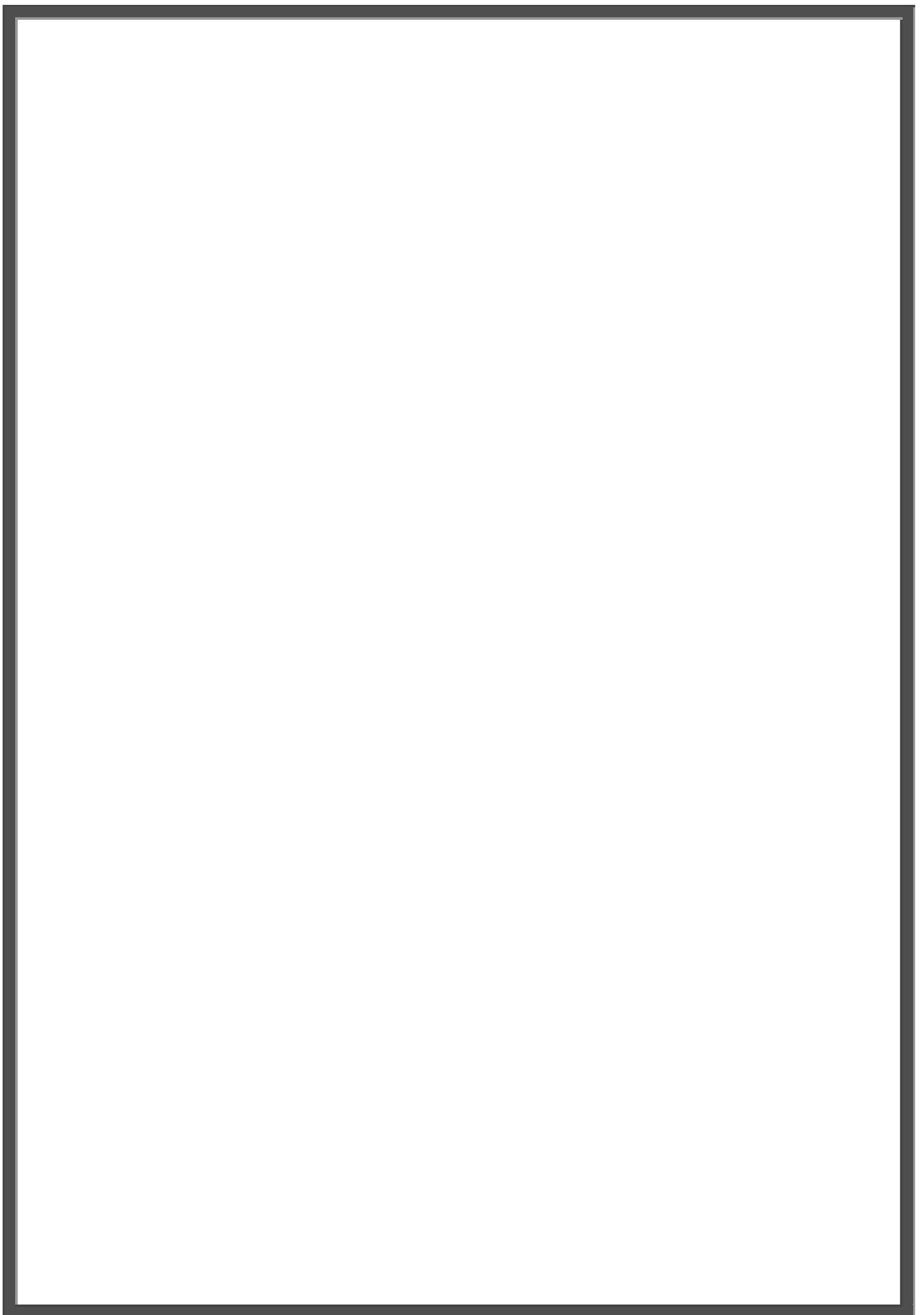
M^{lle} : AIS Samira et MERROC Meriema

Soutenu le 18 /06/2017

Devant le jury composé de :

Mr. AMIR Nadir	MCA	Président
Mr. DJOUDI Ferhat	MCA	Encadreur
M ^{me} . MOUICI Kahina	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2016/2017



Remerciements

Nous remercions Dieu le tout Puissant de nous avoir fait naître musulmane, de nous avoir donné la force, la santé, le courage et la patience de pouvoir accomplir ce travail.

A Monsieur le Docteur DJOUDI FERHAT

Pour avoir proposé et dirigé ce travail Avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la Confiance qu'il nous a accordé est qui nous a permis de réaliser ce travail

A Monsieur le Docteur AMIR, d'avoir accepté et fait l'honneur de présider ce Jury.

A Mademoiselle MOUACI K, D'avoir accepté d'examiner et de valoriser se modeste travail

Nous tenons également à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire de bactériologie SAYAH de BOUIRA pour leur aide, leur conseils et pour les moyens qu'ils ont mis à notre disposition, et leur assistance à la réalisation de ce stage sans oublier tout le personnel du Laboratoire de Microbiologie et particulièrement Mlle chaabane.

En fin nous tenant à exprimer notre profonde sympathie à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de nos études et tout particulièrement aux enseignants de la spécialité.

Dédicaces

J'adresse, surtout, ma plus profonde gratitude et tout mon amour à mon cher père à ma chère mère, qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances au cours de toutes mes années d'études, c'est avec émotion que je leurs exprime toute mon affection, mon admiration et mon profond respect.

Mes dédicaces sont adressées à mes frères YACINE et ANISSE ainsi qu'à mes sœurs HASSINA et AOUDA

A mes adorables cousines SAMIA et SAMRA

A toute ma famille et particulièrement KHALI MOULOUD

A mes deux sœurs âmes NASSIMA et SIHAM

A mes amies, qui m'ont aidé et supporté mes mauvaises et rares bonnes humeurs particulièrement AZIZ, et à celle avec qui j'ai partagé ce travail MARIEMA, à tous les membres de sa famille.

A tous ceux qui me sont chers et qui m'aiment.

A Toute la Promotion de sciences infirmières et la promotion de MMM 2015-2016.

SAMIRA

Dédicaces

*A la mémoire de ma mère et de mon père,
Que Dieu vous accueille dans son vaste paradis.*

*A mes sœurs NACIRA , MALIKA , CHAHRAZAD, LAHNA :
Merci pour tes conseils et tes encouragements, ainsi
que leurs maris*

*A mes frères SMAIL et sa femme FAHIMA, HAMZA,
SAID.*

*A mes amies sans exception, Sans oublier mon cher binôme SAMIRA et a
tous ceux qui sont cher mon cœur.*

A Toute la Promotion MMM 2015-2016.

MERJEMA

*LISTE DES TABLEAUX,
LISTE DES FIGURES ET
LISTE DES ABREVIATION*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°I	principaux caractères des Mycobactéries du complexe tuberculosis
Tableau N°II	Les de la tuberculose testés
Tableau N°III	Avantage et inconvénients de la méthode de diagnostic de la tuberculose

LISTE DES FIGURES

Figure N°1	Taux d'incidence estimés de tuberculose pour 100 000, OMS, 2015
Figure N°2	schéma simplifié de la réponse immunitaire antituberculeuse.
Figure N°3	Tuberculose pulmonaire a frottis positif par Bacilloscopie
Figure N°4	Tuberculose pulmonaire a frottis négatif et culture positive
Figure N°5	Répartition des cas dépistés durant la période d'étude selon le sexe
Figure N°6	Distribution des cas dépistés en fonction des tranches d'âge durant la période d'étude
Figure N°7	Répartition des TP en fonction des maladies associe

LISTE DES ABREVIATION

ADN: Acide désoxyribonucléique
ARN: Acide ribonucléique
BAAR: bacille acido alcool resistant
BCG : Bacille de Calmette et Guérin
BK : Bacille de Koch
ETB : Ethambutol
IDR : L'intradermo-réaction
INH: Isoniazide
OMS : Organisation mondiale de la santé
PCR : Polymérase Chain Réaction
PNLAT : Programme National de la Lutte antituberculeuse
PZA : Pyrazinamide
RIF : Rifampicine
SIDA: Syndrome d'immunodéficience acquise
TB: Tuberculose
TCH: Acide thiophènedicarboxylique
TEP: Tuberculose extra-pulmonaire
TP : Tuberculose pulmonaire
TPM+: Tuberculose pulmonaire à microscopie positive
VIH : Virus d'immunodéficience humaine
R : Résistant
S : Sensible

Table des matières

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATION

INTRODUCTION.....1

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

I- Mycobactéries.....	4
I.1. Caractères généraux	4
I.2. Taxonomie du mycobacterium.....	4
I.3. Mycobacterium tuberculosis	5
I.3. 1. Caractères du mycobacterium tuberculosis	6
I.3. 4. Les autres mycobactéries du complexe tuberculosis	8
II. la tuberculose pulmonaire.....	10
II.1. Définition.....	10
II.2. Historique.....	10
II.3. Epidémiologie.....	11
II.4. Physiopathologie.....	13
II.4.1. Les facteurs favorisant le développement de la tuberculose	13
II.5. Diagnostic.....	15
II.5.1. diagnostic bactériologique.....	16
1. Prélèvement.....	16
2. Diagnostic direct.....	17
3. Diagnostic indirect.	17
III. Traitement de la tuberculose pulmonaire.....	18

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I. Cadre et objectifs de l'étude.....	21
II. Nature de prélèvement.....	21
III. Isolement.....	21
IV. Identification	21
IV.1. Examen microscopique (bacilloscopie)	21
IV.2. culture sur gélose Lwenstein-Jensen.....	24

Chapitre III : Résultats et Discussion

I- Diagnostic des infections.....	27
I.1. Tuberculose pulmonaire a frottis positif par Bacilloscopie.....	28
I.2. Tuberculose pulmonaire a a frottis négatif et culture positive.....	29
I.3 . Distribution des cas dépistés en fonction des tranches d'âge durant la période d'étude.....	29
I.4. Répartition des cas dépistés durant la période d'étude selon le sexe....	30
I.5. Répartition des TP en fonction des maladies associe.....	31
II. Discussion.....	32
Conclusion	35

Référence et bibliographie

Annexes

Résumé

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La tuberculose (TB) appelée autrefois également « phtisie » est une maladie contagieuse, due à *Mycobacterium tuberculosis*, plus connu sous le nom de bacille de Koch (bK) (Shaechter, 1999). Cet agent infectieux est transmis par voie aérienne, via des gouttelettes contaminées par la bactérie en suspension dans l'air provenant des malades. La tuberculose pulmonaire est la forme la plus fréquente (70-80%) et la plus répandue (OMS, 2009).

Le diagnostic de la forme pulmonaire se fait par la mise en évidence de bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) dans les crachats ou sécrétions bronchiques aspirées lors des examens endoscopiques, les cultures n'étant pas toujours disponibles en routine dans certains pays. Ce diagnostic est d'autant plus aisé que les lésions sont excavées et donc très riches en bacilles. Cependant, il arrive souvent que les lésions soient pauci bacillaires rendant la mise en évidence des bacilles très difficile par l'examen direct ou même par la culture (Avril et al., 1992).

Le diagnostic de tuberculose pulmonaire à bacilloscopie négative se fera alors à partir de signes cliniques, radiologiques et éventuellement immunologiques. Ce diagnostic est d'autant plus difficile que la tuberculose est associée à l'infection VIH, car les lésions radiologiques sont alors atypiques ; et d'autant plus important que le pronostic vital du patient est en jeu si le traitement antituberculeux n'est pas institué rapidement» (D. Affolabi, et al., 2011).

Dans le monde entier, la tuberculose est responsable d'une morbidité et d'une mortalité importantes. On constate depuis quelques années, une augmentation des cas de tuberculose dans les pays en voie de développement. Selon l'OMS, chaque année près de 8,8 millions d'infections et de 2 millions de décès sont enregistrés. D'après cette même organisation pour l'année 2015, elle est la maladie infectieuse la plus mortelle devant le SIDA (Ajmi et al., 2010 ; OMS, 2015)

En 1993 l'OMS s'appuyant sur l'expérience acquise par plusieurs pays du monde en voie de développement (dont l'Algérie) a défini une nouvelle stratégie de lutte contre la tuberculose connue sous le nom de « stratégie dots » (directed observed treatment short course) (PSNRLTMR, 2005).

En 2014, l'Algérie estime plus 22,000 cas de tuberculose dont la plupart extra pulmonaires, ont été déclarés par le ministère de la santé de la population et de la réforme hospitalière (OMS 2014).

Pour la même année, l'incidence était de 57,2 pour toutes formes confondues de tuberculose, en 2001 le chiffre était de 60,1 par 100,000 habitants la baisse presque

insignifiante est due à la « persistance d'un niveau relativement élevé » de cas de tuberculose extra- pulmonaire (**OMS 2014**).

Avec ces chiffres, l'Algérie se place en incidence « moyenne » sur le plan mondial quant à la propagation de cette infection a fait remarquer M.Ali halassa.

A ces effets, on se propose d'étudier le diagnostic Bacilloscopie dans les infections tuberculeuses principalement pulmonaires, du fait de leurs contagiosité, chronicité et gravité, ainsi que leurs épidémiologies. Nous avons fixés pour objectif réaliser une étude pratique au niveau du secteur sanitaire de Bouira et du laboratoire d'analyses médicales SAYAH portant sur :

- ✓ Le suivre le diagnostic de la tuberculose pulmonaire par bacilloscopie et culture.
- ✓ L'étude des facteurs de risques associés aux différentes formes de la tuberculose pulmonaire a été également abordée chez les patients suivis.

CHAPITRE I :
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

I- Les mycobactéries

I.1 -Les caractères généraux du genre Mycobacterium

Les mycobactéries sont des bacille acido-alcool-résistant, aérobic strict, immobile, non capsulé, a sporulé, communément dénommé bacille tuberculeux, dont la variété la plus répandue est représentée par le bacille de type humain, *Mycobacterium tuberculosis* (Hershey et Ramakrishna, 1977).

Les mycobactéries ont une enveloppe cellulaire rugueuse avec des peptidoglycanes riches en lipide "un usuelle", une pathogénicité intracellulaire et une homogénéité génétique. Ceci représente 20 à 45% de l'ensemble de la bactérie, ce qui rend la bactérie peu perméable aux éléments hydrophiles. Parmi ces lipides, l'acide mycolique joue un rôle important dans l'acido-alcool-résistance (Iboudou, 2009).

Ils sont caractérisés par une croissance lente, Leur temps de génération est de 24 heures à température optimal 35-37 °C (Hershey et al., 1977).

Le PH des milieux de cultures peut être compris entre 4,8 et 8 avec un optimum légèrement au dessous de la neutralité : 6,7 à 6,9.

La plupart des espèces ne cultivent pas sur milieux usuels et nécessitent des milieux spécifiques, le plus classique est le milieu Lowenstein Jensen (Nauciel, 2000).

Parfois, on constate des groupements dits en « cordes » ou en « moustaches » rassemblant à de nombreuses mycobactéries.

I.2-Taxonomie

Domaine: *Bactéries*

Phylum: *Actinobactéries*

Classe: *Actinobactéries*

Famille : *Mycobacteriaceae*

Ordre : *Actinomycetales*

Genre : *Mycobacterium*

Espèces:

- ✓ **Groupe "tuberculosis"**: sont responsables de la maladie tuberculeuse humaine.
- ✓ **Groupe "atypiques"**: sont responsables d'infections opportunistes et qui ne causent pas la tuberculose mais les mycobacterioses.

Groupe "leprae": sont responsable de la lèpre (**Bergey's manuel., 2007**).

I.3-Mycobacterium tuberculosis

Mycobacterium tuberculosis ou le bacille de Koch, souvent abrégé BK est la bactérie responsable de la tuberculose humaine mais capable d'infecter certains espèces animales vivants (**Bottela, 2011 ; Bruns et al., 2014**). Sa croissance est lente, voir très lente (2 à 8 semaines) il pénètre dans l'organisme par les voies respiratoires (**Hershey et al., 1977**). Elle est découverte par Robert Koch en 1882 et son génome est séquencé en 1998 (**Paul ,2004**).

I.3.1-Habitat

L'habitat de *Mycobacterium tuberculosis* est :

- Les patients atteints de maladies cavitaires sont des réservoirs primaires.
- Ils sont des pathogènes obligatoires, des pathogènes facultatifs ou opportunistes ou des saprophytes vivants libres.
- La plupart d'entre eux se trouvent dans des habitats tels que l'eau ou le sol.
- Dans le corps humain à partir duquel est transmis directement d'une personne à l'autre.
- Les localisations les plus fréquentes sont les séreuses, les ganglions lymphatiques, l'appareil ostéo-articulaire et l'appareil génito-urinaire (**fasquelle, 1974**).

I.3. 2-Transmission

Le bacille de koch est un agent pathogène strictement humain dont la forme pulmonaire assure principalement la transmission inter – humain – gouttelettes Flugge- à partir des sécrétions bronchiques drainant les lésions pulmonaires cavitaires. Les autres localisations restent closes et ne participent pas à la transmission de bacille qu'au stade de fistulisation.

La transmission alimentaire ne concerne que la tuberculose à *M. bovis* qui est pratiquement éradiquée dans les pays où le cheptel est contrôlé et le lait pasteurisé (**Bensenouci,1995**).

I .3.3-Caractéristiques

I.3.3 .1- caractères morphologiques

M. tuberculosis est un bacille aérobic strict, immobile, droit ou légèrement incurvé, de 2 à 5 µm sur 0,3 à 0,5 µm. Ses extrémités sont arrondies (**Le Minor et Veron ,1989**).

Il ya des techniques spéciales ont été mises au point pour mettre en évidence le caractère d'acido-alcool-résistance, c'est la technique de référence de Ziehl-Neelsen où les bacilles colorés à chaud par la fuchsine de Ziehl conservent alors leur coloration rouge sous l'action combinée d'un acide fort et d'alcool. C'est une coloration qui peut être faite en 20 min environ (**Anderson ,1940**).

D'autres colorations ont aussi fait leur apparition : la coloration de Kinyoun et la coloration à l'auramine.

I.3.3.2-caractères cultureux

Mycobacterium tuberculosis est un bacille à croissance très lente (2 à 6 semaines) exigeant des milieux spéciaux, ne pousse pas sur les milieux de culture ordinaire. Le milieu solide le plus utilisé est celui de Lowenstein-Jensen ou une de ses multiples variantes .Ce sont des milieux solides à base d'œufs, additionnés en proportion variable d'asparagine, de glycérine ou de vert malachite. La culture est aussi possible en milieu liquide et en système automatisé. Les colonies apparaissent après 2 à 4 semaines et sont blanc-ivoire, rugueuses et adhérentes au milieu. Elles grossissent lentement pour atteindre 3-4 mm après 2-3 mois. Elles ont alors un aspect en chou-fleur (**Nauciel, 2000**).

I.3.3.3-Caractères physiologiques

I.3.3.3.1-Caractères de résistance : l'acido-alcool résistance n'est pas une propriété constatant des mycobactérie au cours de leurs croissance, Ainsi, les formes jeunes de *M.tuberculosis* ne sont pas acido-alcool résistantes, mais les formes matures le deviennent (**Avril et al., 1992**).

I.3.3.3.2-Action des agents physiques et chimiques

2-1-Agents physique : *M.tuberculosis* est très sensible à la chaleur, à la lumière, aux rayons X et UV. Il résiste au froid à +4°C ,il n'est pas affecté dans sa viabilité. Pendant plusieurs années a-

70°C, il se conserve indéfiniment. Il résiste également à la dessiccation, L'association dessiccation refroidissement (lyophilisation) est un excellent moyen de conservation (Le Minor et Veron ,1989).

2-2-Agents chimiques : *M.tuberculosis* est plus résistant que les bactéries usuelles aux désinfectants chimiques (H₂SO₄,NaOH). Cette grande résistance est employée pour sélectionner, par divers procédés de décontamination, les mycobactéries des autres bactéries dans les produits pathologiques contaminés (Le Minor et Veron,1990).

La désinfection des expectoration, avec une solution à 5% de crésol saponifié, de l'eau de javel, ou encore de l'iode, peut nécessiter 2 à 5 heures. L'alcool est insatisfaisant, parce qu'il coagule le mucus autour des bacilles tuberculeux (Frobischer et Fuerst,1976).

Une suspension de *Mycobacterium tuberculosis* est stérilisée en 5 minutes par l'alcool à 90° degré (Le Minor et Veron ,1989).

I.3.3.4-Caractères biochimiques

M.tuberculosis est aérobie strict. Il est catalase positive, nitrate positif. Au cours de sa croissance il synthétise une quantité importante d'acide nicotinique ou niacine qui peut être mise en évidence par une épreuve biochimique, le test de KONNO ou *niacine-test*. La positivité de cette épreuve est spécifique de *M.tuberculosis* (Ait khaled et al ., 1999).

I.3.4-les autre Mycobactéries du complexe tuberculosis

4. 1-*Mycopacterium bovis*

Bacille tuberculeux, strictement parasite des bovins et éventuellement de l'homme et de quelques animaux notamment le chat, le chien et la chèvre.

4.1-*Mycobactérium africanum* :

Mycobacterium africanum est une espèce de *Mycobacterium* qui se rencontre le plus souvent dans les pays d'Afrique de l'Ouest. Les symptômes de l'infection ressemblent à ceux de *M. tuberculosis*. Il est membre du complexe *Mycobacterium tuberculosis*.

II. La tuberculose pulmonaire

II. 1-Définition

Le terme de tuberculose (phtisie) désigne une **maladie contagieuse**, Elle peut se développer rapidement après le 1^{er} contact avec le microbe. Elle peut aussi apparaître plusieurs années plus tard (**Shaechter, 1999**).

il existe :

- ✓ la tuberculose pulmonaire
- ✓ la tuberculose extra-pulmonaire
- ✓ la tuberculose miliaire

Dans le cas de la tuberculose pulmonaire. **Elle** résulte de la présentation du bacille du complexe tuberculosis qui en est soit :

-Mycobactérium tuberculosis hominis .

-Mycopactérium tuberculosis bovis.

-Mycopactéraiium tuberculosis africanum.

(Grosset et Boisvert, 982) .

II.2-Historique

Au début du XIX^e siècle, LAENNEC individualise la tuberculose. En 1865, VILLEMIN montre qu'il s'agit d'une maladie inoculable à l'animal et transmissible d'un animal à l'autre (**Marchal,1993**). Robert KOCH découvre et cultive en 1882 le bacille responsable (**Shaechter, 1999**). Entre 1908 à 1920, CALMETTE et GUERIN préparent le B.C.G., la première vaccination ayant lieu en 1921. WAKSMAN découvre en 1944 la streptomycine, premier antibiotique actif sur *M.tuberculosis*. En 1952 arrive l'isoniazide et, en 1967, la rifampicine. Malgré ces découvertes, la tuberculose est encore un des plus grands fléaux de l'humanité qui entraîne en l'an 2000 près de de10 millions de nouveaux cas et plus de trois millions de morts chaque année dans le monde. L'épidémiologie et la gravité de la maladie sont aggravées par l'épidémie de SIDA (**Ajmi et al., 2010 ; OMS,2015**).

II.3-épidémiologie

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a estimé pour l'année 2015 à 10,4 millions le nombre de nouveaux cas de tuberculose, soit 142 cas pour 100 000 habitants. L'OMS estime que l'incidence de la tuberculose a baissé en moyenne d'environ 1,4 % par an depuis 2000. L'Asie concentrait 61 % des nouveaux cas, l'Afrique 26 %. C'est en Afrique que les taux d'incidence estimés sont les plus élevés, en raison notamment de l'impact de la prévalence importante de l'infection à VIH. Parmi les 10,4 millions de cas incidents en 2015, l'OMS estime que 11 % sont infectés par le VIH, ce qui est le cas principalement en Afrique et notamment dans certains pays d'Afrique australe où la prévalence de l'infection par le VIH peut dépasser les 50%. Le nombre de décès dus à la tuberculose est estimé dans le monde à 1,4 millions chez les personnes VIH négatives et à 390 000 chez des personnes ayant une infection à VIH (OMS,2015) .

II.4-physiopathologie

La compréhension de la physiopathologie et la réponse immunitaire contre le *Mycobacterium tuberculosis* à un niveau moléculaire repose préalablement sur l'intégration du mécanisme infectant de la maladie.

Emis par une source d'infection, le plus souvent un tuberculeux pulmonaire, dans les gouttelettes de FLUGGE, *M.tuberculosis* est inhalé et atteint l'alvéole pulmonaire. La maladie résulte de la multiplication du bacille et de ses interactions avec l'hôte infecté (immunité à médiation cellulaire, activation des lymphocytes T et des macrophages). *M.tuberculosis* ne produit pas de toxine. (O.Neyrolles, A-C .Volatron 2008)

II.4.1-les facteurs favorisant de développement de la tuberculose (Khaiati ,1983)

- **Les facteurs de risque de contamination**

- La source de contamination : essentiellement les malades qui toussent et crachent (TPM+).
- L'étroitesse du contact avec la source de contamination.
- L'âge : les enfants sont plus à risque (0-5 ans).
- La durée de l'exposition.
- L'intensité de la toux.

- Les facteurs liés à l'environnement (exiguïté des locaux, manque d'aération).
- La quantité des microbes.
- Les infections récentes.
- La perte ou diminution de la défense naturelle.

- **Les facteurs favorisant la survenue d'une tuberculose**

- ✓ **Au niveau de la communauté :**

- Pauvreté.
- Promiscuité.
- Habitat sombre et non aéré.
- Dépistage tardif des malades (qui ont déjà contaminé leur entourage).
- Insuffisance d'informations sur la tuberculose.

- ✓ **Au niveau de l'individu :**

- Infection à VIH/SIDA.
- Pauvreté.
- Malnutrition.
- Alcoolisme.
- Tabac.
- Diabète.
- Stress.

II.5- Diagnostic

II.5.2. Diagnostic bactériologique

5.2.1-Prélèvement

En cas de suspicion de tuberculose pulmonaire, il est conseillé de recueillir les crachats émis spontanément après un effort de toux, de préférence le matin au réveil, dans des flacons stériles, à large embouchure afin d'éviter les contaminations des bords extérieurs. La présence de bacilles dans les sécrétions respiratoires étant discontinue, les prélèvements sont généralement répétés trois jours de suite.

➤ **Recueil**

- Les crachats doivent être recueillis en plein air ou dans une pièce largement ventilée réservée à cet effet, le plus loin possible d'autres personnes.
- Une personne entraînée doit expliquer au malade comment tousser pour ramener une expectoration qui vient du plus profond des poumons.
- Cette personne doit ouvrir le crachoir, se placer derrière le malade et lui demander de cracher en rapprochant ses lèvres du crachoir.
- Contrôler la qualité et la quantité de crachat collecté (2 à 3 ml de crachat contenant des particules solides).
- Fermer le crachoir de façon étanche.
- Se laver les mains à l'eau et au savon avant de donner au malade un nouveau crachoir qu'il doit rapporter avec son prélèvement le lendemain au centre.
- S'assurer que le malade a compris comment il doit recueillir ses crachats le lendemain matin et comment bien fermer le crachoir.

➤ **Conservation et transport des crachats**

Si les crachats ne sont pas examinés sur place, ils doivent être envoyés à un laboratoire. Le transport doit avoir lieu tous les jours ou au moins 1 ou 2 fois par semaine. Pour la conservation et le transport, des boîtes spéciales pouvant contenir 10 à 20 crachoirs sont utilisés (**Régis Goursaud , 2012**).

II.5.3-Diagnostic directe

Le diagnostic de certitude de la tuberculose repose sur la mise en évidence de *Mycobacterium tuberculosis* dans les prélèvements pathologiques : crachats et tubages gastriques pour la tuberculose pulmonaire ; urines, liquides de ponction des séreuses, etc... pour les autres localisations tuberculeuses.

L'examen microscopique des frottis colorés par la méthode de ZIEHL-NEELSEN permet de mettre en évidence des bacilles acido-alcool-résistants (B.A.A.R.). Lorsqu'il est positif il permet un diagnostic de forte présomption de tuberculose (Avril et al., 1992).

- La culture permet l'identification biochimique et l'antibiogramme des bacilles isolés. Elle seule permet le diagnostic de *certitude* de la tuberculose. Etant donné la lenteur de multiplication du bacille de la tuberculose et la pousse rapide des autres germes sur le milieu de LOEWENSTEIN-JENSEN, les produits pathologiques contenant une flore associée doivent être décontaminés avant d'être ensemencés. La décontamination se fait par des antiseptiques (soude ou acide) auxquels le bacille de la tuberculose est moins sensible que les autres germes (Nauciel, 2000).
- Une sonde à ADN correspondant à une séquence ribonucléotidique spécifique (ARN ribosomal) du complexe tuberculosis est aujourd'hui disponible. Elle permet d'identifier en quelques heures les bacilles de la tuberculose isolés en culture.
- L'amplification génique « PCR » qui devait théoriquement permettre de détecter dans un produit pathologique quelques bacilles en quelques heures seulement est pour l'instant plutôt décevante (Delacourt et al.1995).

II.5.4. Diagnostic indirect

- L'intradermo-réaction(IDR) à 10 unités de tuberculine injectées par voie intradermique sous le volume de 0,1 ml, lue à la 72^e heure, permet uniquement de savoir si le sujet a ou non déjà été infecté soit d'une manière spontanée (primo-infection par *M.tuberculosis*), soit d'une manière artificielle (vaccination par le B.C.G.).
- Il n'y a pas actuellement de sérodiagnostic fiable de la tuberculose.(Harries ,1996, Nauciel, 2000).

III. Traitement de la tuberculose pulmonaire

III.1- Traitement curatif

Le traitement curatif de la tuberculose repose presque uniquement sur l'administration quotidienne pendant 6 mois d'une association antibiotique [2 mois d'isoniazide (INH) + rifampicine (RIF) + pyrazinamide (PZA) et éthambutol (ETB) suivi de 4 mois (INH) + (RIF)].

L'association d'antibiotiques est indispensable pour éviter la sélection de mutants résistants et la prolongation du traitement pendant 6 mois pour éviter les rechutes (**PLACT, 2011**).

II.2-Traitement préventif

Le traitement préventif repose sur la vaccination B.C.G. (souche de *M.bovis* ayant perdu sa virulence par repiquages successifs) qui donne 80 % de protection et chimio prophylaxie par l'isoniazide de certains groupes de sujets infectés (nourrissons, adolescents, immunodéprimés) (**PLACT, 2011**).

CHAPITRE II :
MATERIEL ET
METHODES

Matériel et Méthodes

I. Cadre de l'étude et objectifs

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire d'analyse médicale SAYEH de bouira, durant une période de 4 mois, allant de janvier jusqu'à avril 2017. Elle a pour objectif de suivre le diagnostic de la tuberculose pulmonaire par bacilloscopie et culture et l'étude des facteurs de risques associée aux différentes formes de la tuberculose pulmonaire à été également abordée chez les patients suivis.

II. Prélèvements

- Crachats ou expectorations : prélevés le matin chez un sujet qui sera préalablement rincé la bouche à l'eau, à la suite d'un effort de toux. Un volume minimum de 02 ml est nécessaire .les prélèvements seront si possible répétés trois jours de suite.
- Tubage gastrique : pratique chez les personnes âgées et les enfants qui produisent peu ou pas d'expectoration (3j de suite).
- Prélèvements réalisées sous fibroscopie : par aspiration bronchique, par brossage endo-bronchique, liquide de lavage broncho-alvéolaire.

III. Examen microscopique (Bacilloscopie)

Cet examen a pour but la mise en évidence du bacille tuberculeux en microscopie optique, dans un frottis à partir d'un prélèvement de crachat ,pour ce qui est des autres prélèvements, comme tubage gastrique aspiration bronchique , sont d'abord centrifugée a 3000 tour /mn pendant 20 minute.

III.1 .Réalisation du frottis : il est confectionné en suivant le protocole défini par le programme national de lutte contre la tuberculose.

➤ **Identification des lames**

- Prendre une lame neuve et graver avec le diamant marqueur, le numéro d'identification du crachat sur une extrémité de la lame en utilisant la liste d'accompagnement des échantillons.
- Préparer ainsi une lame pour chaque échantillon (pas plus de 10 à 12 crachats à la fois).

➤ Préparation des frottis

- On Prendre chaque lame par la partie où est gravé le numéro, la poser à cheval sur un support lame la partie gravée tournée vers soi.
- On Prendre le crachoir correspondant au numéro de la lame, l'ouvrir et poser le crachoir à droite du support de lames et poser à côté son couvercle.
- On Passe l'anse métallique à la flamme en le portant au rouge et la laisser refroidir.
- On Prélevé une parcelle de crachat en choisissant si possible une parcelle purulente.
- On Fait un frottis aussi fin que possible de 2cm à 1cm sur la lame.
- On Place la lame sur le séchoir.
- On Flambe l'anse métallique pour la stériliser avant de prendre un autre crachoir.
- On Prépare les autres lames de la même façon.

➤ Séchage et Fixation

- On Laisse sécher les frottis à l'air pendant au moins 15 minutes (15 à 30min). Ne pas utiliser la flamme pour sécher le frottis.
- On Prendre avec une pince chaque lame par sa partie gravée, frottis tourné vers le haut.
- On Passe la lame 3 fois (en 3 à 5 secondes) à travers la flamme du bec bunsen ou de la lampe à alcool.
- On Replace la lame sur le séchoir propre.

IV. Coloration par la technique de ZIEHL NEELSEN

Le principe de cette coloration est basé sur l'utilisation des propriétés pariétales spécifiques de la paroi de *mycobacterium tuberculosis*, qui retient la coloration par la fuchine malgré l'action combinée de l'acide et de l'alcool. Les bactéries apparaissent alors comme bâtonnets rouges sur fond bleu connues par le nom de bacille acido-alcollo-résistants (BAAR).

➤ Coloration

- On Place les lames sur le porte-lame, frottis tournés vers le haut, bords séparés.
- On Couvrir les lames avec de la fuchsine phéniquée de Ziehl. La fuchsine doit être filtrée au travers d'un filtre en papier placé dans un entonnoir au-dessus des lames.
- On Chauffé sous les lames, très doucement, jusqu'à émission de vapeur avec un tampon monté à l'extrémité d'une baguette métallique et imbibé d'alcool à brûler. En aucun cas le colorant ne doit bouillir ou se dessécher sur la lame.
- On les Laisse agir le colorant chaud pendant 3 minutes.
- On les répété deux fois le chauffage du colorant.

➤ **Décoloration**

- On le rince chaque lame séparément à l'eau du robinet jusqu'à ce que le colorant libre soit entraîné.
- On Remplace toutes les lames sur le porte-lame et couvrir chaque lame séparément avec de l'acide.
- On le laisse agir 3 minutes.
- On le Lave à l'eau.
- On le Couvrir avec l'alcool à 70 degrés.
- On le laisse agir 5 minutes.
- On rince à nouveau à l'eau.
- On le décolore une seconde fois avec l'acide jusqu'à ce que toute coloration ait pratiquement disparu.
- On rince à nouveau à l'eau chaque lame séparément.

➤ **Contre-coloration**

- On remplace les lames décolorées sur le porte-lame et recouvrir les frottis avec du bleu de méthylène à 0,3% pendant 1 minute.
- On rince chaque lame à l'eau et laisser sécher à l'air libre.
- La décoloration des frottis peut être obtenue en utilisant uniquement de l'acide sulfurique à 25% à plusieurs reprises jusqu'à obtenir une décoloration totale du frottis (Guide de la tuberculose, UICTMR).

V. Observation microscopique et lecture du frottis

La lame est observée au microscope à l'objectif à immersion. Cette lecture se fait systématiquement champ par champ en allant de la périphérie vers le centre du frottis, en commençant par son coin supérieur gauche (lecture en créneau). Tous les BAAR sont comptés sur 20 à 300 champs microscopiques selon la richesse du frottis.

L'interprétation des résultats est donnée en fonction du nombre de BAAR observés, selon les recommandations du programme national de lutte contre la tuberculose, comme le montre le tableau ci-dessous.

Tableau I : tableau représentatif des résultats de la Bacilloscopie.

BAAR observés par nom champs microscopiques	Résultats	Interprétation
0 bacille sur 300champs.	Négatif	Frottis négatif
1à9 bacilles sur 300 champs	Noter le nombre exact	Frottis douteux
10à99bacilles sur 100 champs	+	Frottis positif
1à 10bacilles par champs	++	Frottis positif
>à10 bacilles par champs	+++	Frottis positif

VI. Culture sur gélose Lwenstein-Jensen

Vue le caractère poly microbien des prélèvements, qui proviennent généralement de cavités ouvertes, une étape de décontamination est indispensable pour la mise en culture à partir d'échantillons de crachats.

La décontamination des produits pathologiques est obtenue par divers procédés , la plus couramment utilisée est basé sur l'emploi de la soude et d'un neutralisant . pour cela , on procède comme suite :

- Deux (2) ml de crachats sont transférés dans un tube à centrifugé stérile et bouché à vis.

- Puis, un volume de 2 ml de NaOH à 4 % ainsi que 3 gouttes de bleu de Bromothymol à 0,2 % sont ajoutés au tube précédent.
- Le mélange est agité, pendant 15 minutes dans un agitateur puis porté 30 minutes à l'étuve.
- Une centrifugation à 300 tour /min pendant 15-20 min est réalisée, et le culot est récupéré à l'aide d'une pipette Pasteur .
- 3-4 tubes de gélose de Lowenstein- Jensen sontensemencé par une pipette Pasteur en stries à partir du culot récupéré. Les tubes sont en suite incubés à 37°C , les bouchons légèrement fermés .
- Au bout de 48 heures, les tubes sont contrôlés et complètement fermés , puis examinés une fois par semaine . généralement les colonies commencent à apparaitre après 18 à 21 jours d'incubation, elles sont de couleur crème-beige, sèches à surface rugueuse, en forme chou-fleur , mais il faut laisser la culture jusqu'aux 72^{ème} jours .

CHAPITRE III:
RESULTATS ET
DISCUSSION

Durant la période allant de Janvier 2017 à Avril 2017, tous les patients admis pour le diagnostic de la tuberculose pulmonaire au niveau du laboratoire d'analyses médicales SAYEH de Brouira, ont été inclus dans l'étude.

Parmi les objectifs fixés dans ce travail, en premier lieu, Suivre le diagnostic de la tuberculose pulmonaire par bacilloscopie et culture. L'étude des facteurs de risque associés aux différentes formes de la tuberculose pulmonaire a été également abordée chez les patients suivis.

I.Diagnostic de la tuberculose pulmonaire

Sur un total de 320 patients diagnostiqués, 170 étaient de sexe masculin, et 135 de sexe féminin. L'âge de ces patients varie de 3 ans à 98 ans, dont 15 enfants de moins de 15 ans.

Les patients inclus proviennent de différentes structures sanitaires, ont été adressés au SAYAH par différents centres de soins externes et médecins privés. Le tableau suivant regroupe l'ensemble des cas testés par bacilloscopie et par culture pendant 4 mois au niveau du SAYAH

Tableau II : Les cas de la tuberculose testés.

Prélèvements	Bacilloscopie		Culture		Totale
	Positif	Négatif	Positif	Négatif	
Homme	90	80	15	25	170
Femme	57	78	11	22	135
Enfants	4	11	0	7	15
Totale	151	169	26	54	320
	320		80		

I.1.Résultats d'examen microscopique

Au total, 151 des patients inclus ont été diagnostiqués positifs pour la tuberculose pulmonaire proviennent des résultats de la Bacilloscopie en fonction du nombre de BAAR observés, ce qui donne un taux de 47,19%. La répartition des résultats est donnée dans le graphe suivant.

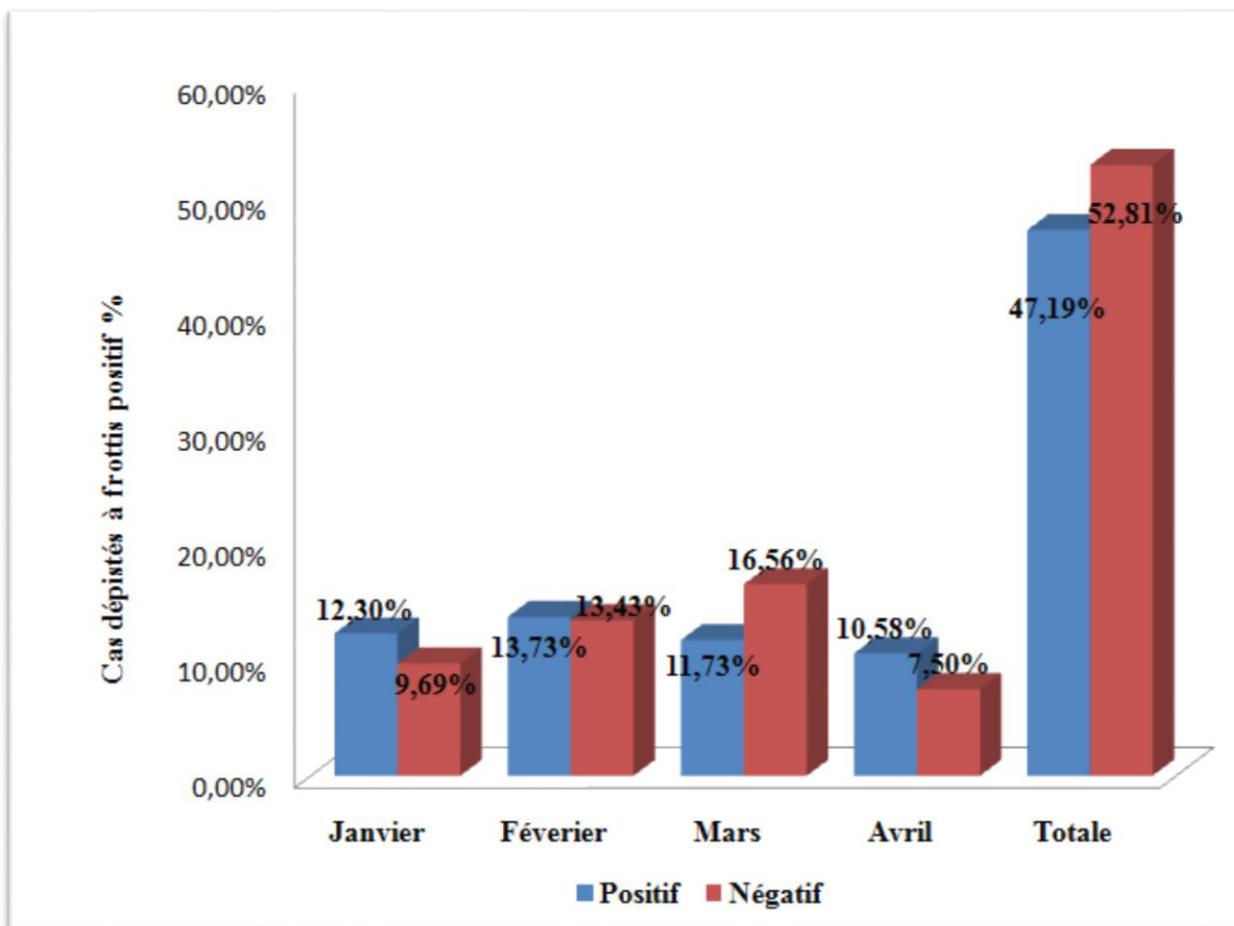


Figure 01 : Tuberculose pulmonaire a frottis positif par Bacilloscopie.

I.2.Résultats de la recherche du Mycopacterium par culture

Sur 80 prélèvements a Bacilloscopie négatifs, 26 ont aboutis à une culture positive sur gélose Lowenstein-Jensen, ce qui donne un taux de 32,5%, et le graphe suivant représente la répartition des résultats.

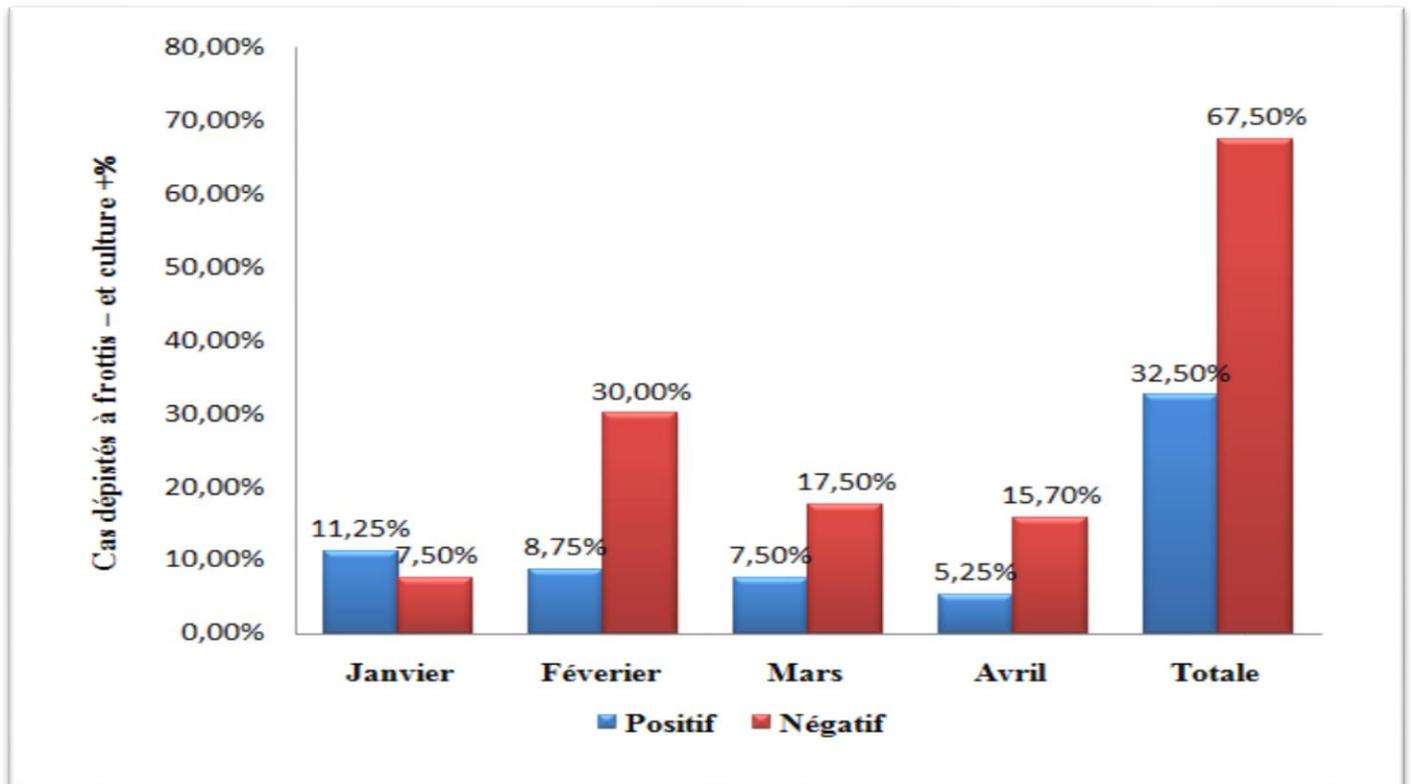


Figure 02 : Tuberculose pulmonaire a frottis négatif et culture positive.

Discussion :

Au cours de cette étude , 177 étaient diagnostiqués positifs pour la tuberculose pulmonaire, ce qui donne un taux de **55,31%** . Sur ce total ,151 proviennent des résultats de la Bacilloscopie en fonction du nombre de BAAR observés avec un taux de **47.19%** , et 26 proviennent des résultats de la recherche des mycobactéries par culture sur gélose Lowenstein- Jensen après avoir fait une culture sur 80 prélèvements négatives, avec un taux de **32.5%** .

Les résultats obtenu dans cette étude démontre, l'importance et la nécessité du diagnostic par bacilloscopie et dans la détermination de la contamination de l'échantillon par *M.tuberculosis* et nous n'a pas besoin des tests complémentaire comme culture pour confirmer si le prélèvement est positif ou pas. Comme déclaré par Mitchison, « l'examen de frottis de plusieurs échantillons pour chaque patient est presque aussi efficace que les examens par culture dans les polycliniques des pays en développement ». (D. Affolabi, et al, .2011).

II Répartition des tuberculeux selon l'unité de santé

II.1. Répartition des tuberculeux selon le sexe

Sur les 170 patients de sexe masculin, 90 ont été diagnostiqués positifs pour la tuberculose, après mise en évidence du bacille de Koch par examen direct, et 15 résultent de culture sur gélose. Chez le sexe féminin, 57 cas sur les 135 patients ont été enregistrés par bacilloscopie, et 11 par culture.

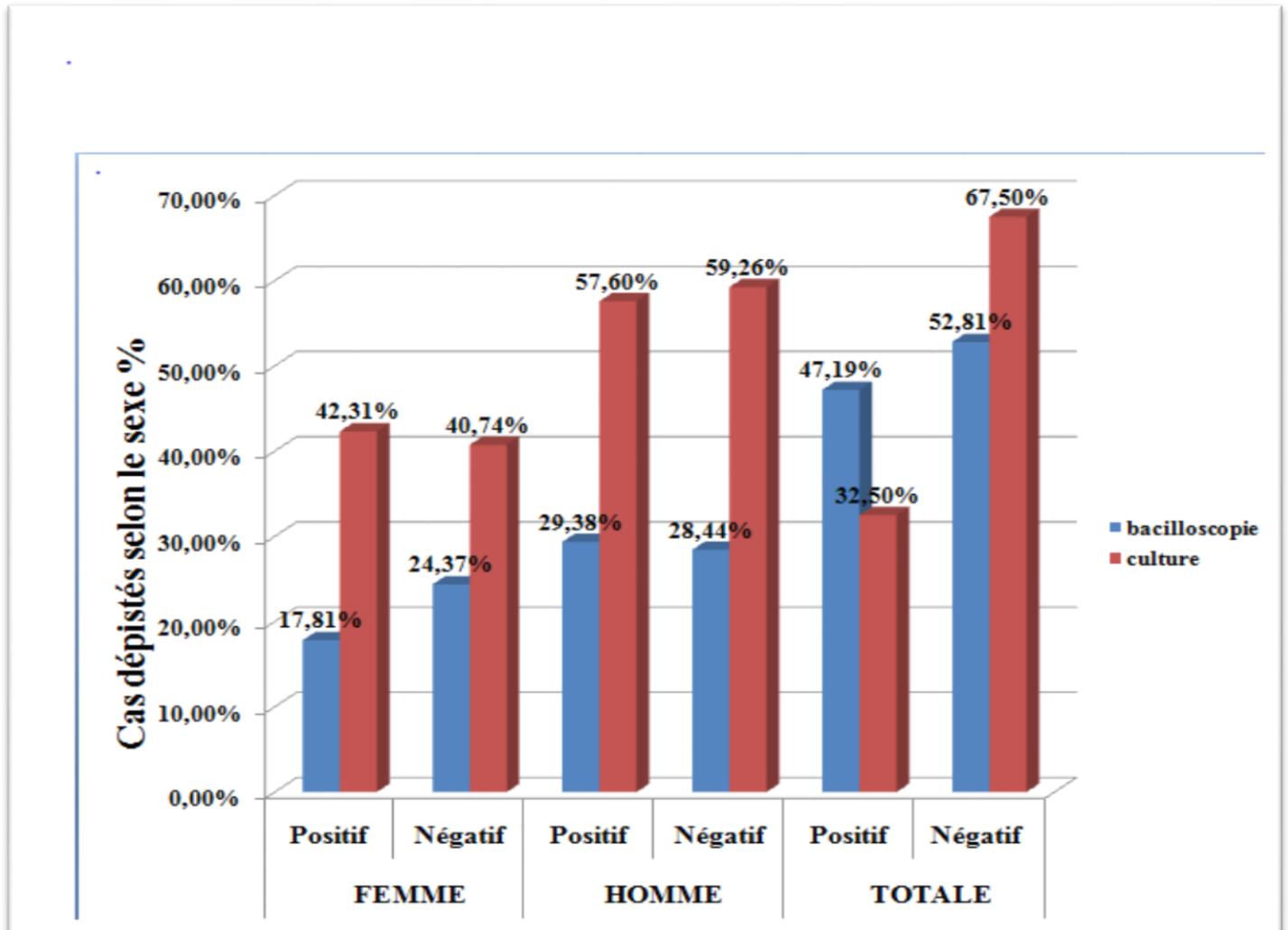


Figure 03 : Répartition des cas dépistés durant la période d'étude selon le sexe.

II.2. Répartition des tuberculeux selon l'âge

Parmi 15 enfants de moins de 15 ans, nous avons diagnostiqué 04 cas positifs par l'examen de Bacilloscopie, tandis que pour la culture nous n'avons enregistré aucun cas. Cependant, les sujets âgés de 16 à 65 ans étaient les plus touchés, avec 34.38% de la population générale. Dans la dernière tranche

d'âge, 37 cas diagnostiqués, ce qui représente 24.50% de tous les patients. La tranche d'âge la plus touchée par la tuberculose est celle de patients âgés entre 16 ans à 65, avec un taux de 51.16 %.

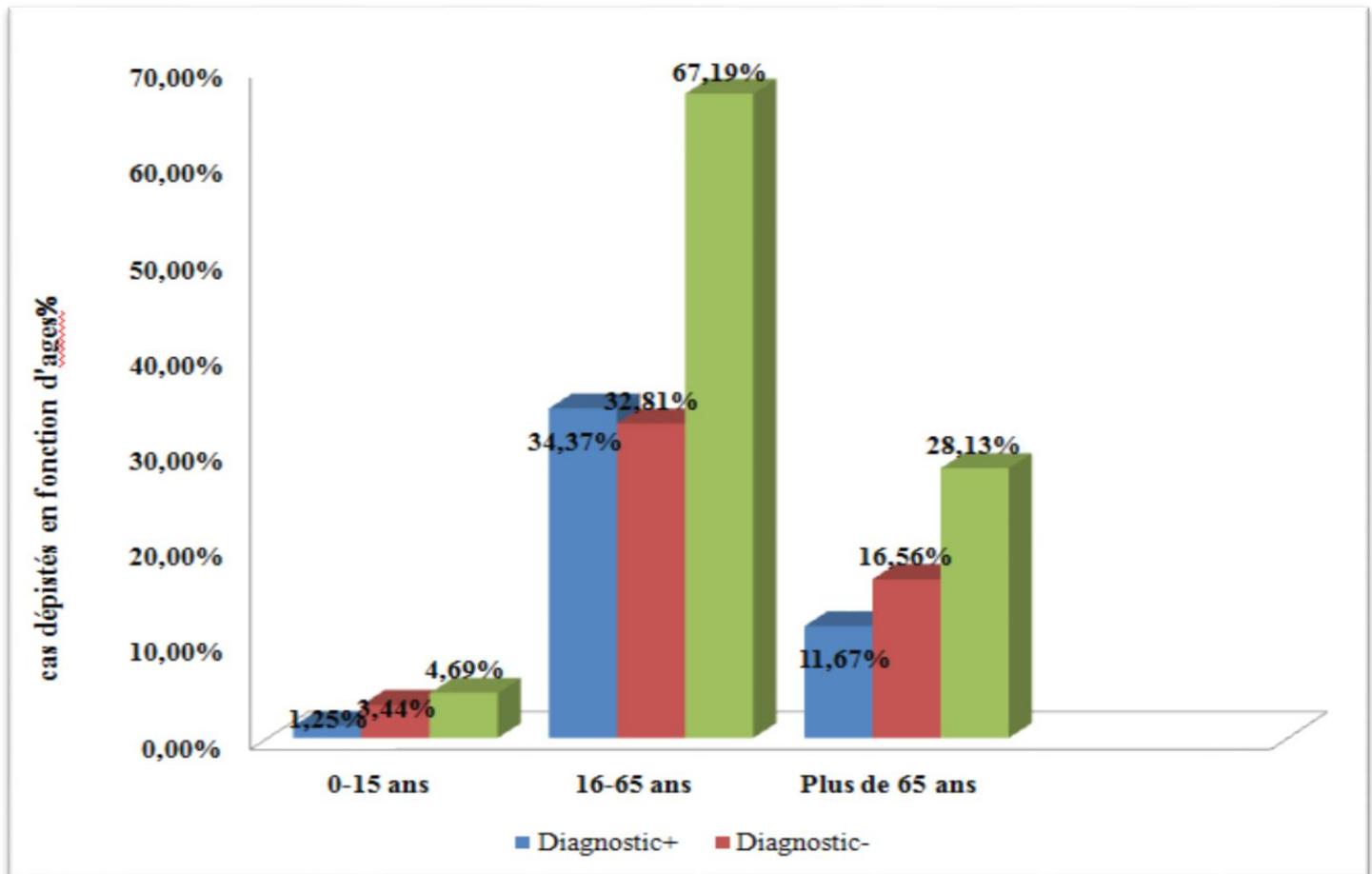


Figure 04 : Distribution des cas dépistés en fonction des tranches d'âge durant la période d'étude.

II.3.Répartition des tuberculeux en fonction de maladies associées

Le nombre des patients suivis avec une ou plusieurs maladies associées est de 190, ce chiffre reflète un taux de 59.38%, contre 130 cas qui ne présentent aucune pathologie sous-jacente (68.42%). La répartition de ces maladies est donnée dans la figure suivante.

Parmi les 190 patients souffrant de ces maladies, les diabétiques représentent environ 47.37%. Les maladies du système et la cardiopathie représentent, respectivement, 14.21% et 12.63% des cas.

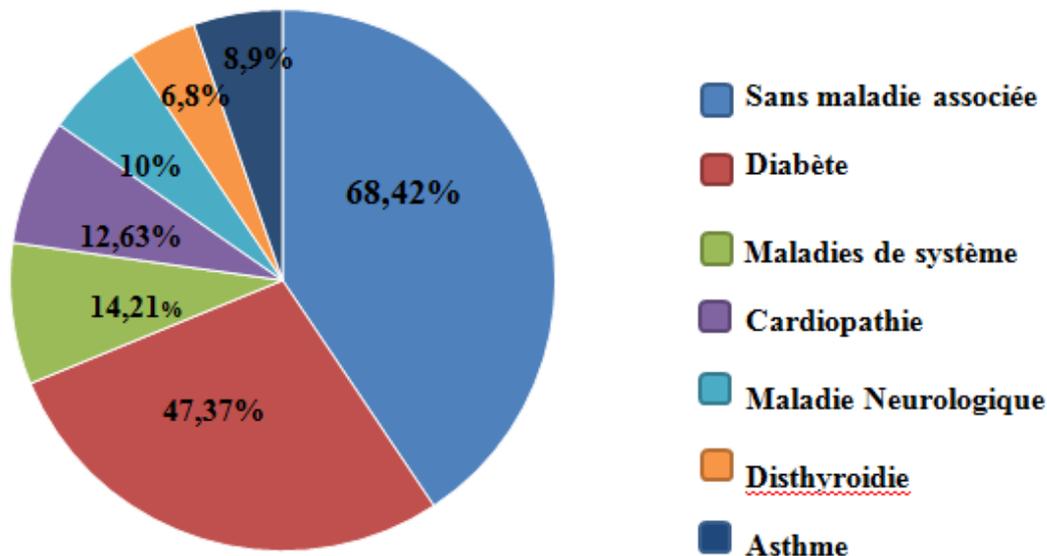


Figure 05 : Répartition des patients suivis durant la période d'étude selon leurs états.

Discussion

Nous avons constaté dans cette étude que la tuberculose touche plus les hommes avec une légère prévalence de (57.6%) des cas par rapport à (42.31%) des cas de sexe féminin, ce qui corrobore avec les résultats d'autres travaux, comme ceux d'Enarson *et al.* 1989). Cette vulnérabilité des hommes envers ce pathogène peut être expliquée par l'exposition aux facteurs de risque tels que l'alcoolisme, le tabagisme, la consommation de drogue et la promiscuité (Holmes *et al.*, 1998 ; Benhabyles *et al.*, 2006 ; Thorson, 2007 ; Adnaoui *et al.*, 2008 ; Touré *et al.*, 2010 ; Abdallah *et al.*, 2011 ; Antoine *et al.* Ihadadane *et al.*, (2015).

L'âge des patients diagnostiqués durant cette période a été un facteur important dans la sensibilité à l'infection par le bacille de Koch. Ainsi, il a été constaté que les enfants de moins de 15 ans étaient les moins touchés par cette bactérie. Cela est dû à une meilleure prise en charge par les moyens de prévention tels que la vaccination par le BCG ainsi que les plans nationaux de lutte contre la tuberculose.

Ces résultats ont montré que les sujets âgés de 16 à 65 ans étaient les plus touchés, avec 34,37% de la population générale. Ils ont été confirmés par plusieurs études précédentes. Ce constat est lié à une forte activité chez ces patients (fonctionnaires, étudiants...etc.), entraînant un contact plus fréquent avec des cas de tuberculose. Nos résultats concordent avec les travaux de plusieurs auteurs, qui ont rapporté des proportions élevées de tuberculose dans cette catégorie de population (Amrane *et al.*, 1993 ; Gagnière *et al.*, 2011 ; Che *et al.*, 2011 ; Kalappan *et al.*, 2006).

Chez les patients âgés de 66 ans ou plus, 11,67 % ont été diagnostiqués positifs. Ces sujets représentent un groupe vulnérable et à risque à toutes les infections. Ce qui s'explique par l'affaiblissement du système immunitaire et les différentes maladies chroniques associées. Ces résultats sont compatibles avec ceux d'autres auteurs qui confirment que le risque d'infection augmente avec l'âge (Yacoub *et al.*, 2009 ; Fattal *et al.*, 2009 ; Touré *et al.*, 2010 ; Elkard *et al.*, 1991).

D'après les résultats obtenus, concernant la répartition des patients diagnostiqués en fonction de l'organisation l'ayant demandé, plus de la moitié provenait du secteur privé. Ceci peut être expliqué par le fait que les patients consultent en premier temps chez des médecins externes aux structures de soins (Barchiche *et al.*, 2009)

Parmi les 320 des patients dans cette étude nous avons 190 des patients suivis à une ou plusieurs maladies associées, ce chiffre reflète un taux de 59.38%, contre 130 cas qui ne présente aucune pathologie sous-jacente (68.42%). Parmi les 190 patients souffrant de ces maladies, les diabétiques représentent environ 47.37%. Les maladies du système et la cardiopathie représentent, respectivement, 14.21% et 12.63% des cas. Cependant, le diabète reste un facteur de risque important dans le développement d'une tuberculose active (Parvanehbaghaei *et al.*, 2014).

CONCLUSION

CONCLUSION

Au cours de cette étude au niveau du laboratoire d'analyse médical SAYAH de bouira .Les résultats obtenu ont révélé que les résultats obtenus par bacilloscopie sont fiables dans la détermination de la contamination de l'échantillon et que nous n'avons pas besoin de culture pour déterminer le diagnostic. Donc, la bacilloscopie est déterminante à elle seule dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire, sans des tests complémentaire.

Les résultats pour les cas dépistés ont révélé que les sujets de sexe masculin sont plus touchés par la tuberculose. Cette vulnérabilité de l'homme, comparée à la femme, n'est pas significative .Cependant, les patients âges de 16 à 65 ans étaient les plus touchés et ceci est bien étudié.

Sur les 320 des patients dans cette étude nous avons 190 des patients suivis a une ou plusieurs maladies associées, par contre 130 cas qui ne présente aucune pathologie . Parmi les 190 patients souffrant de ces maladies ,90 sont des diabétiques. 65 des maladies du système et 24 des cardiopathie . Cependant , le diabète reste un facteur de risque important dans le développement d'une tuberculose active commme nous l'avons constaté dans cette etude .

Cependant, une suite de ces travaux est indispensable afin d'avoir une idée complet et généralisée sur cette maladie. Il serait important :

- Augmenter l'échantillonnage
- Procéder au culture des cas positif
- Confirmer par culture automatisé

A

Affolabi D, Akpona R, Odoun M, Alidjinou K, Wachinou P, Anagonou S, Gninafon M, Trébucq A .2011. Programme National Contre la Tuberculose, Cotonou, Bénin ; Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires, Paris, France.

Ait khaled , N., Enarson ,D., Billo,N.(1999).Epidémiologie de la tuberculose et de la résistance aux antituberculeux.Rev Mal Respir.14 :5S8_5S18.

Ajmi Th, Tarmiz H, Bougmiza I, Gataa R, Knani H, Mitraoui A.(2010).Epidimiological profile of tuberculosis in the region of health Sousse from 1995 to 2005.Revue Tunisienne d'infectiologie .4:18-22.

Amrane R , Djilali A, L'Hadj M, Ouarts Z, Chkoul A .(1993). La morbidité tuberculose de 1982 à 1990 en Algérie. Service de Pneumo-Phtisiologie, Centre Hospitalier et Universitaire de Bab el oued, Alger ; Direction de la Prévention, Ministère de la Santé et des Affaires Sociales, Alger . 74 :106-112.

Anderson R.J. (1940).The chemistry of lipids of tubercle bacilli. Harvey Lect.35, 271-313.

Avril,J.L. ;Dabernot,H..Denis,F. ;Monteil,H.1992.Bactériologie chimique 2^{eme} edition, Edition marketing;Paris:390-408.

B

Baghaei P, Tabarsi P, Moniri A, Velayati A.A.(2014).Impact of diabetes mellitus on tuberculosis drug resistance in new cases of tuberculosis.International Journal of Mycobacteriology.128.

Barchiche NA, Berkani A, Chernai M, Aitabdeslam S, Meguenni, W. (2010).Aspects de la tuberculose chez l'enfant à propos de 153cas. Pathologie Biologie.58 :33-38.

Bensenouci,A. Mazoni, M.Elément de pédiatrie.V1 :03.1995.

Berch,P. ; Gaillard, J.L ;Simonet,M.Bactériologie :Bactéries des infecion humaines.Collection de la biologie à la clinique.Médecine – sciences.Flammarion,1988.

Bottela H, Peyron P, Levillain F , Pincloux R, Poquet Y, Barandli I, et al. (2011). Mycobacterial P (1)-type ATPases mediate resistance to zinc poisoning in human macrophages. Cell Host Microbe.10:248-59.

C

Che D, Antoine D.(2011) Epidémiologie de la tuberculose en France en 2008 Médecine et Maladies Infectieuses. 41 :372-378.

Chretien,J. ;Morsac ,J.Pneumologie.3eme-édition,Masson.1990 :2-82.

D

Delacourt,C. ;Poveda,J.D. ;chureau,C.Use of the polymerase chain reaction for imporved diagnosis of tuberculosis in children,J.Pediatr 1995;126:703-709.

E

Elkard I, Zaghba N, Benjelloun H, Bakhtar A, Yassine N.(2015). Tuberculosis of the lung bases.revue de pneumologie Clinique.72:190-194).

Enarson DA, Wang JS, Dirks JM. (1989).The incidence of active tuberculosis in a large urban area. Am J Epidemiol.129:1268-76.

F

Fasquelle,R.1974.Elément de bactériologie médicale.9eme-édition,Flammarion Médecine- sciences,Paris :162-167.

Fettal N, Taleb A, Abdelmalek M.(2009). La tuberculose pulmonaire chez le sujet âgé : à propos de 17 cas. Revue des Maladies Respiratoires. 26.124.

Frobicher. ;Fuerst. ;1976 .Microbiologie clinique les éditions. HRNLTEE .Montral :358-368.

G

Gagnière B, Le Goff-Mevel D, Marquis M, Guillois-Bécel Y, Mari C ,Le Goas A et Salomon J. (2011). Epidémiologie de la tuberculose en Bretagne :les cas déclarés entre 2000 et 2007.Médecine et Maladies Infectieuses.41 :33-37.

Godean,P.,Herson,S. :Charles.Piette ,J.1992.Traité de médecine. Edition flammation.

Grosset,J. Place des examens Microbiologie et anatomopathologique dans la decision diagnostique et thérapeutique.Rev.Prat.Iqnf.long.Fr 1995 ;25 :32 7-333.

Grosset,J. ;Biosvet, H.Microbiologie de la tuberculose.In bactériologie médicale,édité par Le Minor,L et Veron, M.Paris,Flammation.Médecine-science.1982,PP :658-673.

H

Harries,A. ;Maher,D. ;Raviglione,M. ;Chanlet,P.;Nunn,P.;Van Praag,E.Tuberculose etVIH.Manuel Clinique.OMS.1996.

Hershey RM,et Ramakrishnan T.(1977) Rate of ribonucleic acid chain growth in Mycobacterium tuberculosis H37Rv.J Bacteriol.129,616-22.

I

Iboudou D,(2009). Diagnostic moléculaire par PCR en temps réel du complexe Mycobacterium tuberculosis résistant a l'isoniazide et a la rifampicine. Thèse de Doctorat en biologie Moléculaire .Université d'Ouagadougou, Faculté des Sciences de la nature et de la vie .78

K

Kaufmann SH.(2001).How can immunology contribute to the control of tuberculosis?Nat Rev Immunol. 1:20-30.

Kiati,M.1983.La tuberculose initiale de l'enfant.ed :OPU.

Kolappan C, Subramani R. (2006). Mortality of tuberculosis patients in Chennai, India. Bulletin of the World Health Organization.87:7.

M

Marchal,G.La réponse immunitaire au cours de la tuberculose .Ann.Inst.Pasteur.1993 :4 :216-224.

Moustardier ,G(1972).Bactériologie médicale.4éme –édition Librairie Molaire.S.A.Editeurs ;paris :923-933.

N

Nauciel, Abrégés, connaissances et pratique (collection).Bactériologie médicale. Edition : Masson année : 2000.

Neyrolles O et Quinttana-Murci L. (2009).Sexual Inequality in Tuberculosis.Plos Medicine.6.12; 1-6.

O

OMS. (2011). Déterminants sociaux de la santé : résultats de la conférence mondiale sur les déterminants sociaux de la santé (Rio de Janeiro, Brésil, Octobre 2011). « [Www .who .into/sdconference/background/news/B130_R11-fr.pdf](http://www.who.int/sdconference/background/news/B130_R11-fr.pdf) » (accessed 13.4.17).

OMS.(2011a). en route contre la tuberculose : transformer la lutte pour parvenir à l'élimination
[.http://www.stoptb.org/events/world_tb_day/2011/assets/documznts/WTBD2011_KeyM_FR.pdf](http://www.stoptb.org/events/world_tb_day/2011/assets/documznts/WTBD2011_KeyM_FR.pdf).

OMS.(2011b) .WHO Report 2011-Global Tuberculosis Control .

OMS (2014). Rapport 2014 sur la lutte contre la tuberculose dans le monde«www.who.int/tb/pulication/.../gtbr14_execsummary_summary_fr.pdf» (accessed 13.4.17).

OMS.(2015).Tuberculosis2015«http://www.photos.state.gov/libiraries/ars-paris/206200/.../bif_w_tuberculosis.pdf. » (accessed 2.5.17).

P

Paul G. (2004). Cours de bactériologie medical . Mycobacterium
«<http://microbe-edu.org/etudiant/Mycobacterium1.htm> » (accessed 21.5.17).

PNLAT,2001:Plan National de Lute Antituberculeuse.

S

Schaechter. ;Med off. ; Eisentein. ; De Boeck université.1999. Microbiologie et pathologie infectieuse.

T

Touré N, Dia Kane Y, Diatta A, Ba Diop S, Niang A,Ndiaye E, Thian K, MBaye F, Badiane M, Hane A.(2010) .Tuberculose du sujet âgé .Revue des Maladies Respiratoires .27(9)1062-1068.

Y

Yacoub S, Maalej S, Bourguiba M , Fakhfekh R, Slim L, Ben Saleh S, Ben Kheder A, et Drira I.(2009) La tuberculose pulmonaire du sujet agé . Revue des Maladies Respiratoires.26.132.

ANNEXES

Annexe N°I.

1- La fuchsine de ziehl

Fuchsine basique	10mg
Alcool à 95°.....	100ml
Phénol aqueux	55ml
Eau distillée	1000ml

2- Le bleu de méthylène

Bleu de méthylène	20mg
Phénol aqueux	22ml
Alcool à 95°	100ml
Eau distillée	1000ml

3- Le milieu de culture lowenstein-Jensen

Composition :

Œufs entiers	625cm ³
Asparagine	2,25g
Fécule de pomme de terre	18,75g
Glycérol	7,5 cm ³
Citrate de magnésium	0,375g
Vert malachite	0,25g
Sulfate de magnésium	0,15g
Dihydrogénophosphate de potassium	1,5g
Eau distillée	1000ml

Annexe N°II. Constitution des différents milieux de culture

Les milieux de culture

La pomme de terre glycéinée et biliée : Milieu a priori peu riche mais, permettant la culture.

1 /Milieux solide à l'œuf coagulé

- Milieu de L.J

-Ions minéraux (phosphate de (2.4g), sulfate mg (0.24g), citrate mg (0.6g))

-Asparagine 3.6g.

-Glycérol 0.75%=12g.

-Fécule de pomme de terre 0.4g.

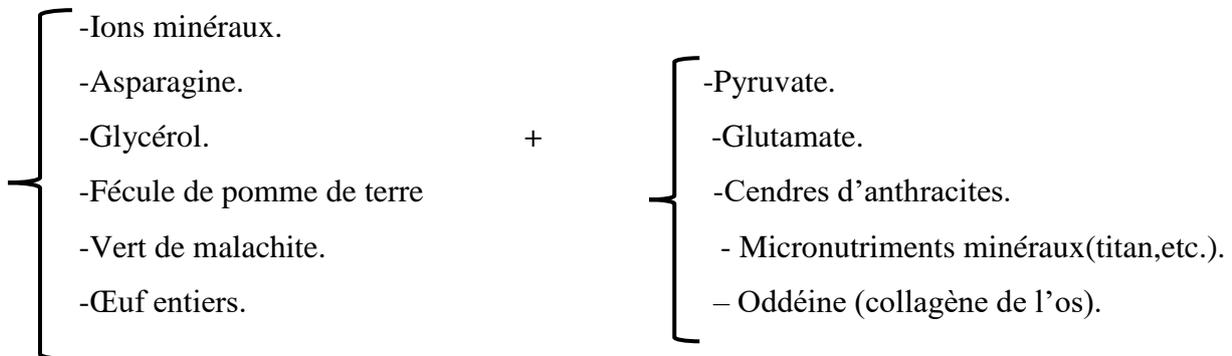
-Vert de malachite 30g (0.02% agent inhibiteur de nombreuses bactéries).

-Œuf entière qui assurent le durcissement et apportent des nutriments nombreuses 1640g.

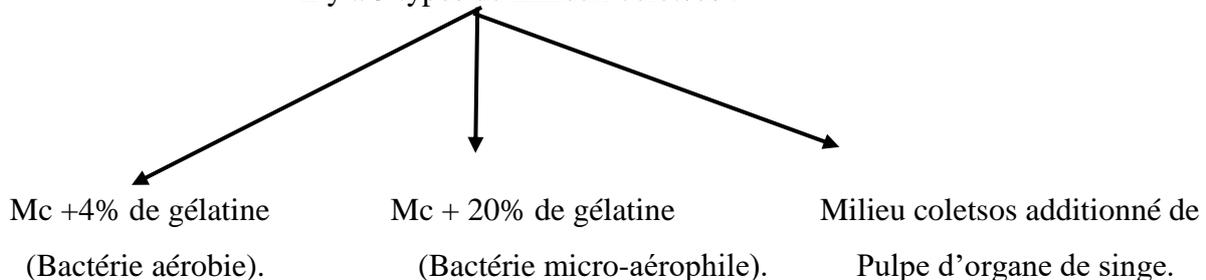
Remarque :-Ce milieu est solidifié Pr coagulation à 85°C pendant 50 mn.

- Eau distillée 1000ml.

- Milieu de coletsos



Il y a 3 types de milieux coletsos :



2 / Milieux solide gélosé (Middlebrouk et Cohn,) :

- Milieux synthétiques transparents , très couteux.
- Ions minéraux.
- Glucose.
- Fraction de sérum d'albumine bovine.
- Acide aminé.
- Pyruvate
- Catalase.

Ces milieux sont additionnés de 10% de co2 dans sacs de plastiques (pour conserver l'humidité)

3 / Milieu liquides(synthétique) :

.Milieu de sauton :

- Sels minéraux.
- Asparagine
- Glycérine.

Milieux de youmans : Dérive de sauton avec addition de : 10% sérum de bœuf .

- Bouillon de Dubos :
 - Sel minéraux.
 - L'hydrolysate de caséine.
 - Glucose.
 - Fraction de sérum d'albumine bivine.
 - Tween 80 :agent mouillant

Remarque :

Il n'existe aucun dérivé de milieu de Dubos (**Avril, 1992**).

Annexe N°III .Traitements des prélèvements :(Méthode sans centrifugation) :

La partie la plus purulente du crachat est placés dans un mortier ou tout récipient stérile permettant une bonne homogénéisation des crachats.

- Ajouter une quantité égale à la soude à 6% et 2 à 3 gouttes d'indicateur de Ph.
- Assurer une bonne homogéisation soit par broyage ou par agitation (ballon à bille).
- Le tout est ensuite mis à l'étuve à 37°C pendant 50.A la sortie de l'étuve ,le mélange est immédiatement neutralisé par la solution d'acide (HCL ou H2HO4 0 15%).
- Prélever une goutte et ensemercer des tubes contenant le milieux de culture (**Yala, 2011**).

Annexe N°IV.

Tableau N°03 : Avantage et inconvénients de la méthode de diagnostic de la tuberculose :(Yala, 2001).

Avantage	Inconvénient
<p>Technique de Ziehl Neelsen (ZN)</p> <ul style="list-style-type: none"> -Cout peut élevé. -Entretien facile. -Matériel robuste. -Personnel technique facile à former. -Résultats immédiats. -permet de dépister 60 à 80% des cas M+(dans les cas contagieux). 	<ul style="list-style-type: none"> - Temps de lecture long (10 à 15 pour une lame négative). -Nombre de lames liées en une journée de travail limite plus de 15 lames. -Fatigabilité rapide du microscopiste. -Sensibilité moindre que la culture et que la fluorescence surtout en ce qui concerne les prélèvements paucibacillaires.

Annexe N°V. Interprétation des résultats obtenus par l'examen direct et la culture.

- Examen directe positif et culture positive :Le diagnostic de la tuberculose est à peu près certain surtout si le contexte clinique s' accorde. En cas de non concordance , il faut se méfier d' une émergence du prélèvement ou au laboratoire.
- Examen directe négatif et culture positive : Il s'agit d'un cas fréquemment du à un dépistage précoce de l'affection à un stade paucibacillaire. Ils doivent à la multiplication des mises en culture car souvent ce ne sont que deux ou trois cultures 6 à 7 prélèvements qui pousseront et viendront confirmés la TB.
- Examen direct positive et culture négative :cette situation est beaucoup plus exceptionnelle et carrerspond soit à l'émergence déjà , mais à partir des lésions très anciennes .Soit à des prélèvements d'être cultivés.
- Examen direct négative et culture négative :le diagnostic de tuberculose ne peut écarté .En fonction du contexte clinique , il faut savoir envisager d'autres examen , répéter les rechres, instituer une simple surveillance.

Annexe VI. Règles à observer au laboratoire traitant les mycobactéries.

Le personnel du laboratoire ayant à traiter les prélèvements devra être en bonne santé, vacciné (BCG est obligatoire jusqu'à 25 ans si l'examen directe est négative), être suivi régulièrement, suivi lors d'examens cliniques. Les femmes enceintes doivent éviter de travailler dans ce service.

De façon générale, au laboratoire les mesures suivantes doivent être observées :

- Stérilisation de l'aire par utilisation de lampes germicides en dehors des heures de travail.
- Nécessite de travailler sous hotte à pression négative ou flux laminaire verticale, à filtre contrôlé et à ventilation convenable.
- L'air de la pièce doit être renouvelé de 6 à 12 fois /heures.
- Utilisation d'antiseptiques (phénol 5% formol 5% ,glutaraldehyde 2% , les ammoniums)
- Tubes à centrifuger doivent être à fermeture hermétique et à usage unique.
- Les pipettes sont à manipuler à la poire.
- Pour stériliser les oses et fils métallique, il faut utiliser un bec incinérateur ou à défaut, plonger l'instrument dans un flacon contenant du sable surmonté d'alcool à 90° avant le flambage.

Lorsqu'il y a une infection tuberculeuse à la suite d'une contamination au laboratoire, celle-ci doit être immédiatement déclarée comme maladie professionnelle (**Yala, 2001**).

Annexe VII. Le diagnostic indirect *La culture par la méthode classique*

La culture d'un produit pathologique suspect de contenir des bacilles est le moyen le plus rigoureux de faire le diagnostic de la tuberculose. La spécificité de cet examen est beaucoup plus élevée, puisque chaque bacille vivant donne une colonie après mise en culture. Le coût de l'équipement et de fonctionnement de la culture est beaucoup plus élevé que celui de la microscopie, et nécessite la formation de laborantins de niveau supérieur.

➤ **Méthode**

1- Décontamination des prélèvements

La plupart des produits pathologiques, à l'exception de ceux qui viennent de lésions fermées (séreuses, articulations, prélèvements lors d'interventions chirurgicales), sont contaminés par d'autres bactéries. Pour détruire ces bactéries qui peuvent contaminer le milieu de culture, il est nécessaire de décontaminer le

prélèvement avec des antiseptiques basiques qui tuent les bactéries contaminantes beaucoup plus vite que les mycobactéries. Cette décontamination permet aussi d'homogénéiser le produit pathologique.

2- Centrifugation et neutralisation

Les produits pathologiques sont ensuite centrifugés, le liquide surnageant éliminé et le culot est ramené à pH neutre par un acide faible.

3- Ensemencement

Le culot de centrifugation est ensemencé dans au moins deux tubes contenant un milieu de culture spécifique, généralement le milieu de Loewenstein-Jensen (milieu solide enrichi à l'oeuf). Dans le cas de lésions fermées (ou lors d'interventions chirurgicales), le prélèvement doit se faire avec la plus grande asepsie et être ensemencé directement sur le milieu de culture sans décontamination.

4- Mise à l'étuve

Les tubes ensemencés sont placés dans une étuve à 37°C pendant 4 à 12 semaines, les mycobactéries tuberculeuses poussant très lentement (temps de doublement moyen de 13 à 20 heures) donneront des colonies visibles à l'oeil nu après au moins 3 semaines d'incubation.

➤ Lecture

Lorsqu'une culture a poussé, on voit à l'oeil nu à la surface du milieu de culture de grosses colonies en « choux fleur », arrondies, de couleur crème-beige, à surface sèche et rugueuse, bien individualisées ou en nappes selon la richesse du prélèvement en bacilles .

➤ Identification

Lorsque les colonies apparaissent, elles doivent être identifiées par des critères selon leur aspect macroscopique (colonies rugueuses) et par leur réponse à des tests biochimiques : les colonies de *M. tuberculosis* ont une activité catalasique thermolabile (positive à 22°C, détruite par la chaleur à 68°C), une activité nitrate réductase, et elles accumulent l'acide nicotinique ou niacine qui peut être révélé par le niacine-test. Dans les autres cas il s'agit d'une autre mycobactérie qu'il faudra identifier (*M. bovis*, BCG ou mycobactéries atypiques).

- Critères d'identification des mycobactéries

MYCOBACTÉRI ES	ASPECT DES COLONIE S	NIACIN E	NITRAT E	CATALAS E 22°	CATALAS E 68°
Tuberculeuses	R	+	+	+	-
Bovis	S	-	-	+	-
BCG	R	-	-	+	+
Atypiques	v	v	v	+	+

R = rugueux ; S = lisses (smooth en anglais) ;V = variable.

➤ **Expression des résultats**

Le nombre de colonies présentes dans les tubes de culture est en relation directe avec la richesse en bacilles des lésions. C'est pourquoi les colonies sont comptées et les résultats donnés en nombre de colonies par tubes, sauf si leur nombre est si élevé qu'elles sont confluentes (dans ce cas le résultat sera : colonies confluentes incomptables). Comme pour la microscopie un code de lecture peut être adopté :

NOMBRE DE COLONIES	CODE DE LECTURE
Moins de 10 colonies	+
10 à 100 colonies	++
Plus de 100 colonies	+++
Incomptable	Incomptable

Les indications de la culture sont limitées aux tuberculoses pauvres en bacilles qui ne sont pas diagnostiquées facilement par la microscopie : tuberculoses pulmonaires à frottis négatifs et tuberculoses extra-pulmonaires.

➤ **Résultats comparés de la microscopie et de la culture**

Lorsque l'on fait un seul prélèvement d'expectoration à des malades présentant une tuberculose pulmonaire, 66% sont positifs en microscopie directe après coloration de Ziehl-Neelsen, alors que 93% sont positifs à la culture. Mais les résultats obtenus en microscopie s'améliore en augmentant le nombre

d'échantillons examinés.

NOMBRE D'ÉCHANTILLONS	FROTTIS POSITIFS ZIEHL %	CULTURE POSITIVE
1	66	93
2	76	97
3	84	99
4	85	100

* d'après RH Andrews et S Radhakrishna. *Tubercle* 1950 ; 40 : 155–162.

❖ *Autres méthodes de culture*

Deux méthodes beaucoup plus délicates et plus coûteuses sont utilisées dans certains laboratoires pour pallier la lenteur de croissance du bacille de Koch.

➤ **La culture sur milieu gélosé (milieu de Middlebrook)** : les cultures sont examinées à la loupe binoculaire après 3 à 4 semaines (au lieu de 4 à 6 par la méthode classique).

➤ **La culture sur milieu liquide** : les cultures sur des milieux liquides, soit radioactif (**Système Bactec**), soit non radioactif (**MGIT**) permettent de détecter les bacilles en 8 à 14 jours.

❖ *Méthode de génétique moléculaire ou PCR*

Pour détecter *M. tuberculosis* on peut obtenir en quelques heures une multitude de séquences nucléotidiques, copies d'un seul exemplaire d'une séquence cible du bacille par une technique d'amplification génomique. On utilise ensuite des sondes spécifiques qui permettent d'identifier les différentes mycobactéries. Cette technique est appelée la « réaction polymérase en chaîne » ou PCR.

Elle permet de détecter et d'identifier en 24 à 48 heures la présence de *M.*

tuberculosis dans un produit pathologique. Elle est cependant de faible sensibilité par rapport à la culture (en moyenne 80%), et sa spécificité est de 97% à 98%. Cette technique délicate, nécessitant un équipement sophistiqué et très coûteux, est réservée aux travaux de recherche.

Résumé

Cette étude consista à suivre le diagnostic de la tuberculose pulmonaire par bacilloscopie et culture et l'étude des facteurs de risques associée aux différents formes de la tuberculose pulmonaire à été également abordée chez les patients adressés au SAYEH par différents centres de soin externes et médecines privés. 320 patients diagnostiqués ont été testés par bacilloscopie et par culture pendant 4 mois au niveau du SAYAH, en utilisant la coloration de Ziehl Neelsen (ZN) qui permet de mettre en évidence le nombre des BAAR à l'aide d'un microscope pour identifier si l'échantillon est positif ou pas, et une culture sur L.J pour cultiver les BK isolés à partir des crachats, et une analyse statistique a été réalisée afin de déterminer les facteurs de risque.

Au cours de cette étude, 177 étaient diagnostiqués positifs pour la tuberculose pulmonaire, ce qui donne un taux de **55,31%**, sur ce total, 151 proviennent des résultats de la Bacilloscopie en fonction du nombre de BAAR observés avec un taux de **47.19%**, et 26 proviennent des résultats de la recherche des mycobactéries par culture sur gélose Lowenstein- Jensen après avoir fait une culture sur 80 prélèvements à frottis négatifs, avec un taux de **32.5%**.

Les résultats obtenus dans cette étude ont révélé que la bacilloscopie est déterminante à elle seule dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire, sans tests complémentaires.

Mots clés : la tuberculose pulmonaire, BK, bacilloscopie, Ziehl Nielsen (ZN), culture sur Lowenstein-Jensen(L.J).

Abstract

This study followed the diagnostic of pulmonary tuberculosis by the direct smear examination, culture and the study of risk factors associated with the various forms of pulmonary tuberculosis was also addressed in patients referred to laboratory SAYAH by different external care centers and private medicine. 320 patients were diagnosed by smear and culture for 4 months at the SAYAH laboratory using Ziehl Neelsen staining, which allows the number of BAAR to be plotted with a microscope to identify sample or not whether the positive, and LJ culture to grow BKs isolated from sputum, and statistical analysis was performed to determine risk factors.

In this study, 177 were diagnosed positive for pulmonary tuberculosis which gives a rate 55, 31%, 151 from the results of the smear as a function of the number of BAAR observed with a rate 47, 19%, and 26 originate from the results of the research of mycobacteria by culture on Lowenstein- Jensen after having grown out of 80 samples with negative smear with a rate 32, 5%.

The results obtained in this study revealed that smear examination alone is determinant in the diagnosis of pulmonary tuberculosis without any additional tests.

Key words: pulmonary tuberculosis, Bk, smear, Ziehl Nielsen (ZN), culture, Lowenstein- Jensen.