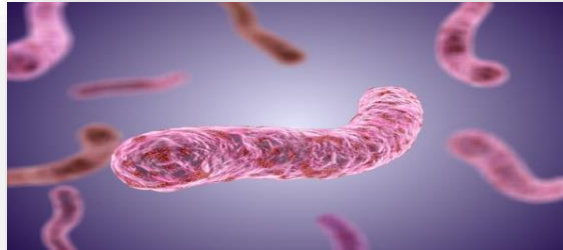




FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES – FES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

PROJET DE FIN D'ETUDES

**Licence en Sciences & Techniques :
Sciences Biologiques appliquées et Santé**



**Prévalence de la tuberculose dans la population
Affluent sur le laboratoire d'analyse SAISS à Fès**

Présenté par :

- ♣ BOUAZIZI ASMAE

Encadré par :

- ♣ Dr. BOUCETTA NABIL
- ♣ Pr. HALOTI SAID

Soutenu le : 17/06/2015

Devant le jury composé de :

- ♣ Pr. HALOTI SAID
- ♣ Dr. BOUCETTA NABIL
- ♣ Pr. BEKHTI KHADIJA

Dédicace

Enorme fut de joie et de plaisir de saisir l'occasion en guise d'une profonde reconnaissance et d'une gratitude égale, pour dédier ce mémoire à :

A NOS PLUS CHERS ETRES

Nos parents, qui nous ont accordé tout l'aide et le soutien voulu, qui nous ont garanti un amour que nul n'oublie et nous ont guidé avec leurs conseils intangibles dans la conception de notre personnalité ;

A NOS FRERES ET SŒURS

Nous vous dédions ce travail comme une promesse d'avenir, pour que nous ne soyons jamais plus séparés ;

A MON CHER FIANCE

Avec lequel nous avons formé une équipe solide, efficace et particulièrement, liée par un amour sincère que nous n'aurions garde d'oublier;

A TOUS NOS PROFESSEURS

Auxquels nous devons tout respect et hommage d'avoir contribué à notre solide formation.

Je dédie ce mémoire à vous tous.

Remerciements

Ce mémoire intitulé « Prévalence de la tuberculose dans la population affluant sur le laboratoire d'analyse SAISS à Fès » a été effectué au sein du Laboratoire SAISS d'analyses Médicales sous l'encadrement du **Dr. NABIL BOUCETTA**, nous tenons à leur exprimer notre profonde gratitude et nos vifs remerciements d'avoir accepté de nous encadrer durant ce travail. Leur soutien scientifique, leurs remarques et critiques, leur modestienous ont aidé à mener au bien ce travail.

Nos vifs remerciements s'adressent également au *Pr. SAID HALOTI*, enseignant à la FSTF, pour leur aide et leur disponibilité durant ce travail.

Nous tenons aussi à remercier tous les autres enseignants de la formation pour les efforts précieux et considérables qu'ils ont accomplis pour assurer notre formation universitaire.

Nous ne saurions oublier tous ceux qui nous ont partagé leursavoir leur savoir-faire, leurs expérienceset méthodologie sin qua non pour l'amorce la réalisation et le développement de ce thème.

Enfin nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet, ainsi qu'au bon déroulement du stage, et dont les noms ne figurent pas dans ce document.

Liste des figures

Figure 1 : Taxonomie des mycobactéries.

Figure 2 : M. tuberculosis vue au microscope Electronique à balayage colorisé.

Figure 3 : Schéma de l'enveloppe cellulaire des Bacille Acido-Alcolo-Résistant.

Figure 4 : Mode de transmission du complexe tuberculosis.

Figure 5 : Taux d'incidence estimée de la tuberculose en 2006

Figure 6 : Radiographie du thorax d'un patient avec une tuberculose pulmonaire avancée.

Figure 7 : Image de M. tuberculosis au Microscope après coloration de Ziehl-Neelsen.

Figure 8 : Coloration à l'Auramine.

Figure 9 : coloration de Zeihl-Neelsen.

Figure 10 : Travail sous poste de sécurité microbiologique .

Figure 11: Mycobacteriu M tuberculosis sur milieu de Löwenstein Jensen.

Figure 12 : Répartition des prélèvements selon le type.

Figure 13 : Nombre des cas positifs au BK dans les prélèvements de type crachoir en 2014.

Figure 14 : Répartition des pourcentages des cas positifs au BK selon le sexe.

Figure 15 : Répartition des pourcentages des cas positifs au BK selon l'âge.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Annotation des résultats de l'examen direct d'expectoration.

Tableau 2 : le taux de contaminations de la culture.

Sommaire

TRODUCTION	2
1 ^{ER} PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Définition	3
II. Agent pathogène responsable de la tuberculose.....	3
1. Classification	3
2. Caractéristique	4
3. Transmission.....	6
III. La tuberculose.....	6
1. Epidémiologie dans le monde.....	7
2. Formes cliniques de la tuberculose.....	7
3. Les symptômes de la tuberculose	8
4. La tuberculose maladie(Tm) et l'infection tuberculeuse latente (ITL)	9
5. Dépistage et diagnostic de la tuberculose.....	9
6. Traitement de la tuberculose active	12
7. Facteurs favorisant la résistance aux antituberculeux	12
8. Préventions	13
2 ^{ème} PARTIE : MATERIEL ET METHODE	
I. Cadre d'étude	15
II. Recueil des prélèvements	15
III. Enregistrement des échantillons	15
IV. Examen microscopique Bacille de Koch Examen Direct (BKED)	16
1. Préparation de frottis	16
2. Technique de coloration	16
3. Lecture des lames	17
V. Examen macroscopique Bacille de Koch Culture (BKC).....	18
1. Technique utilisée: Méthode de Petroff modifiée avec centrifugation.....	18
2. Surveillance des résultats.....	19
3. La lecture	19
4. Expression des résultats.....	19
3 ^{ème} PARTIE : RESULTAT ET DISCUSSION	
I. Répartition des prélèvements selon le type	22

II. Le pourcentage des cas positifs au Bacille de koch chez les patients suspects de Tuberculose	23
1. Le pourcentage des cas positifs au BK dans les prélèvements de type crachat.....	23
2. Le pourcentage des cas positifs au BK selon le sexe.....	24
3. Le pourcentage des cas positifs au BK selon l'âge	25
CONCLUSION	27
REFERENCES BIBLIOGRPHIQUES	30



1^{ER}PARTIE:ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



Introduction

Les infections respiratoires font partie des pathologies infectieuses les plus fréquentes ; les microorganismes responsables de ces infections sont nombreux et variés tels que les virus (le cas le plus souvent rencontré), les bactéries et les champignons.

Dans cette récente décennie du 21^{ème} siècle, le monde est en challenge contre les maladies infectieuses et mortelles dont la tuberculose (TB) en particulier. En effet, sur les 22 pays qui représentent les 80% du poids mondial de la tuberculose, 17 sont classés comme pays à faible revenu. Annuellement, 2,3 millions de personnes meurent encore de tuberculose, alors que l'augmentation des décès liés à la résistance aux médicaments antituberculeux, à la co-infection TB et Immunodépression liée à l'infection par la VIH entraîne une plus grande menace pour la santé au niveau mondial(1)

Au Maroc, la tuberculose demeure encore un problème majeur de santé publique. En effet, selon la revue du Programme National de Lutte Anti-Tuberculose (PNLAT) de 2000, l'incidence des cas déclarés est de 100 nouveaux cas pour 100 000 habitants.

L'outil principal de diagnostic pour la détection et la lutte contre la tuberculose est l'examen microscopique direct ; pour la recherche des bacilles Acido-Alcool Résistants (B.A.A.R.). La technique de Ziehl-Neelsen, exécutée directement sur des échantillons d'origine pulmonaire, est une méthode efficace pour détecter les cas de tuberculose, apprécier la réponse au traitement et suivre le taux de guérison.

I. Définition

La tuberculose est une maladie infectieuse transmissible causée par *Mycobacterium tuberculosis* et occasionnellement par *M. bovis* ; ces dernières sont les principales espèces pathogènes dans le complexe *M. tuberculosis*.

Ces bactéries sont également connues comme bacille de la tuberculose vue qu'elles sont capables de produire des lésions caractéristiques appelées tubercules.

II. Agent pathogène responsable de la tuberculose

1. Classification

L'agent étiologique de la tuberculose, *M. tuberculosis*, est une bactérie appartenant à la classe des *Actinobactéries*, l'ordre des *Actinomycétales*, la famille des *Mycobacteriaceae* au genre *Mycobacterium* (2).

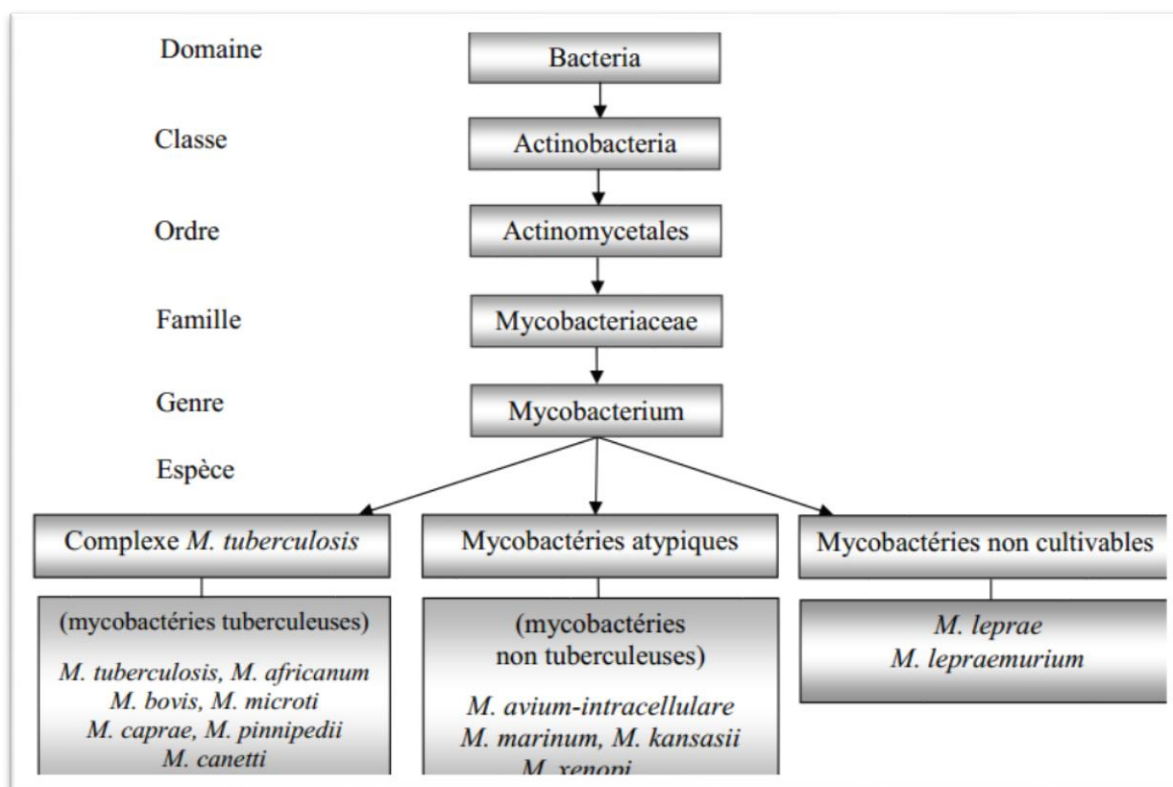


Figure 1 : Taxonomie des mycobactéries(2)

Le Genre *mycobactérium* comporte 3 groupes d'espèce comme le montre la figure ci-dessus(**figure1**)

❖ **Complexe *M.tuberculosis***se divisé en :

- *Mycobacterium tuberculosis*: agent responsable de la tuberculose
- *Mycobacterium africanum* : agent responsable, le plus souvent, de la tuberculose en Afrique de l'ouest (3).
- *Mycobacterium bovis* : agent responsable de la tuberculose chez les bovins et parfois chez l'homme (4).
- *Mycobacterium microti, caprae et pinnipedii* : agents responsables de la tuberculose chez les rongeurs, les chèvres et les mammifères marins (5).
- *Mycobacterium canetti* : agent responsable de tuberculose humaine (6).

❖ **Mycobactéries atypiques ou non-tuberculeuses :**

Ces mycobactéries sont omniprésentes dans l'environnement. Dans certaines circonstances (immunodépression, lésion, maladie préexistante,...), certaines d'entre elles peuvent devenir pathogènes pour l'homme. On parle dans ce cas d'infection opportuniste appelée aussi *mycobactériose.*, exemples :

- *Mycobacterium avium-intracellulare*: agent responsable de maladies respiratoires
- *Mycobacterium ulcerans*: agent responsable de l'ulcère de Buruli (nécroses chroniques de la peau et des tissus mous)
- *Mycobacterium marinum* : agent responsable d'infections cutanées torpides (maladie des aquariums)

❖ **Mycobactérie non cultivable :**

• *M. leprae* et *M. lepraemurium*, les agents de la lèpre chez l'homme et le rat, caractérisés par leur incapacité à être cultivés in vitro.

2. **Caractéristique de *Mycobacterium tuberculosis***

Mycobacterium tuberculosis se présente sous la forme d'un fin bâtonnet, de 4 µm de long et 0,4 µm de large, d'où le nom de « bacille » (**Figure 2**). Les bacilles tuberculeux sont rectilignes ou légèrement incurvés, aérobies ou microaérophiles, non sporulant et dépourvus de capsule. La croissance de la dite *M.tuberculosis* est particulièrement lente avec un temps de division de 12 à 24h (7).

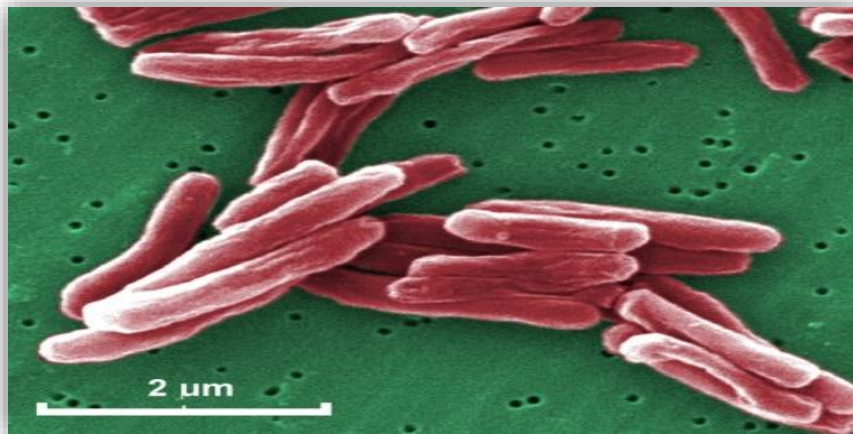


Figure 2 : *M. tuberculosis* vue au microscopie Electronique à balayage (15549x) , (8)

Une des caractéristiques majeures des mycobactéries est la richesse de leur paroi en lipides (60%) et, en particulier, en acides mycoliques (acides gras à longue chaîne). Ce haut composant lipidique les rend imperméables aux colorants basiques. La coloration de Gram est donc difficilement réalisable.

Pour obtenir une visualisation des mycobactéries au microscope, il est nécessaire de réaliser la coloration de Ziehl-Neelsen dont le principe repose sur l'acido-alcool-résistance de la mycobactérie, c'est-à-dire sa capacité de résister à la décoloration par les acides et alcools après une coloration à base d'arylméthane, telle que la fuchsine de Ziehl (9).

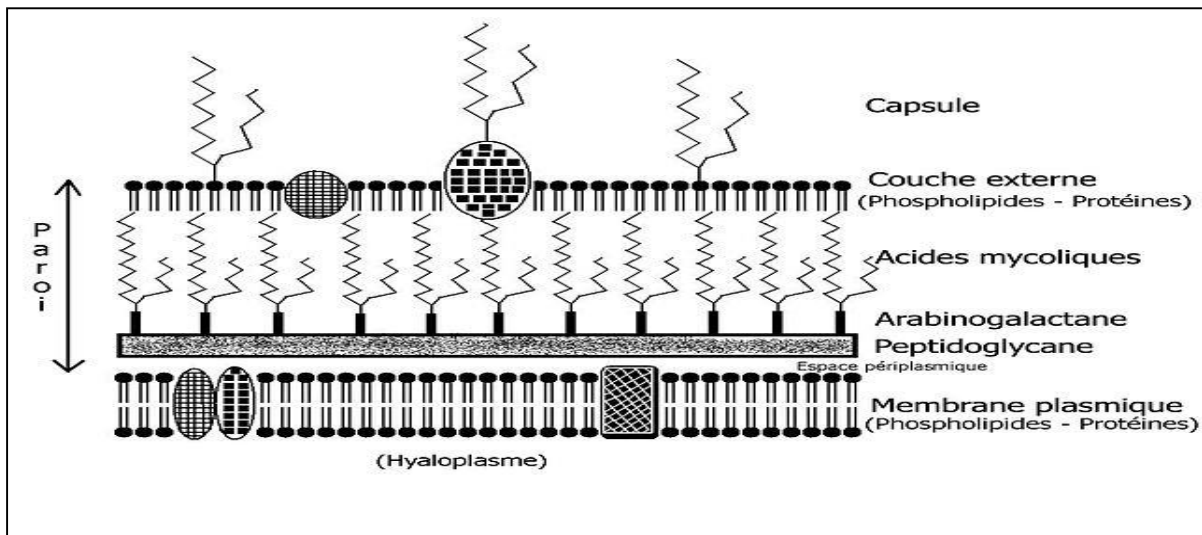


Figure 3 : Schéma de l'enveloppe cellulaire des Bacille Acido-Alcolo-Résistant(BAAR), (10)

3. Transmission :

L'infection tuberculeuse se transmet par voie aérienne directe, principalement interhumaine, par la dispersion de gouttelettes de salive et de sécrétions bronchiques aérosolisées. Ces sécrétions sont produites en particulier par la toux des personnes infectées(11).

Dans l'air expiré, ces gouttelettes restent en suspension .Elles peuvent être inhalées par d'autres sujets à proximité, En cas de mauvaise ventilation de la pièce, l'inhalation peut survenir plusieurs heures après l'émission des germes.

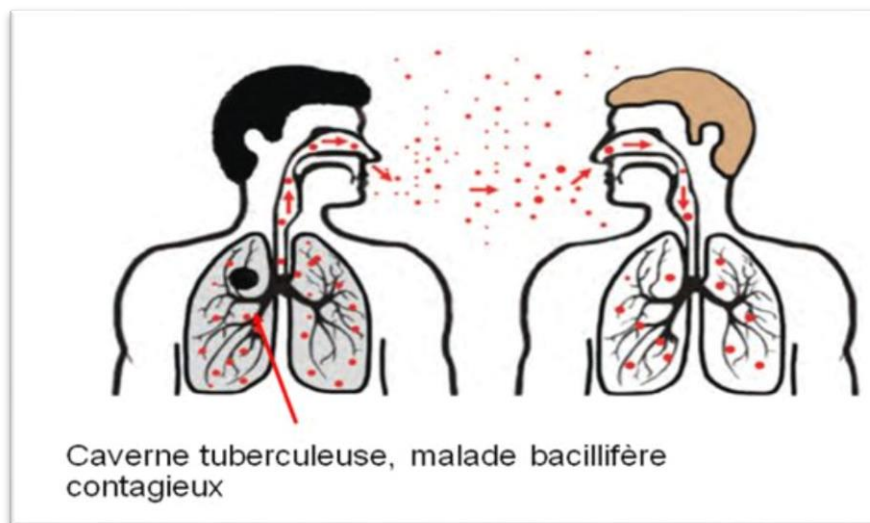


Figure 4 : Mode de transmission du complexe tuberculeux (12)

III. La tuberculose

1. Epidémiologie de la tuberculose dans le monde (figure 5)

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'approximativement un tiers de la population mondiale (~2 milliards d'individus) est infectée par *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent étiologique de la tuberculose. Ces personnes sont porteuses de la maladie et donc susceptibles de développer une forme active de tuberculose à un moment de leur vie (13) .

La prévalence de la tuberculose active dans le monde (le nombre de malades) est estimée à 14,4 millions (WHO, 2008b) : elle concerne principalement la population active, c'est-à-dire les individus appartenant à la tranche d'âge 15-49 ans (13). Après le syndrome d'immunodéficience acquise dû au VIH, la tuberculose est la seconde cause de mortalité liée à une maladie infectieuse. De ce fait, selon les estimations, la tuberculose sera encore reprise parmi les 10 premières causes de mortalité en l'an 2020 (14).

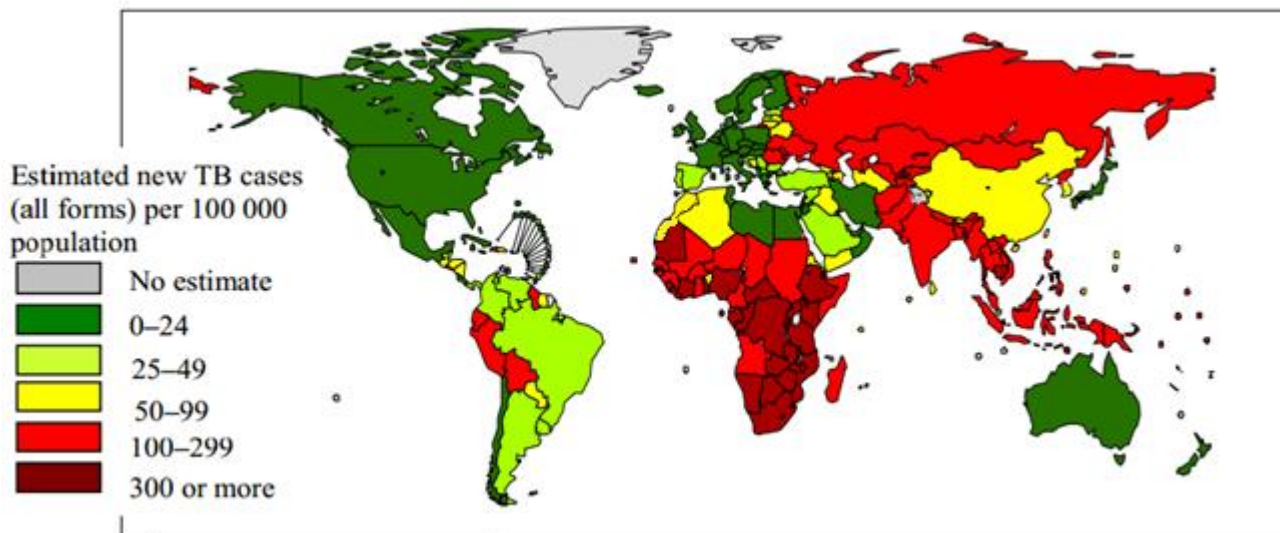


Figure 5 : Carte Mondiale représentant les taux d'incidence estimée de la tuberculose en 2006. (15)

La distribution mondiale de la tuberculose concerne fortement les régions économiquement faibles (pays en voie de développement) (figure 5). Les 3 zones géographiques les plus atteintes sont l'Asie du Sud Est (33% des malades), l'Afrique (29%), et le Pacifique Occidental (22%). Ensemble, ces 3 régions totalisent 84% des malades souffrant de tuberculose. L'Amérique (Nord et Sud) et l'Europe représentent, respectivement, 4 et 5% des cas de tuberculose (15).

Les plus hautes prévalences sont enregistrées, dans l'ordre, pour l'Inde, la Chine, l'Indonésie, l'Afrique du Sud et le Nigéria. En général c'est l'Afrique qui présente l'incidence la plus élevée avec 363 nouveaux cas pour 100.000 habitants en 2006 (15).

2. Formes cliniques de la tuberculose

L'agent pathogène responsable de la tuberculose est *Mycobacterium tuberculosis* complex. Il inclut *Mycobacterium tuberculosis* (le principal), *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae* et *M. pinnipedi*. Il occasionne en France dans 75 % des cas des infections pulmonaires, et dans 25 % des cas des infections extra-pulmonaires (osseuses, méningées, ganglionnaires, pleurales, urogénitales, etc.). Seule la forme pulmonaire de la tuberculose est contagieuse. *M.tuberculosis* complex est alors présent dans l'expectoration. Un examen direct positif de l'expectoration en microscopie signe une contagiosité particulièrement élevée (16).

2.1.Tuberculose pulmonaire commune

Cette forme de tuberculose affecte principalement les sommets lobaires et les segments postérieurs du parenchyme pulmonaire. Cette localisation prédominante pourrait s'expliquer par la circulation lymphatique réduite aux apex et par le fonctionnement aérobie de la bactérie.

Les lésions ont tendance à évoluer vers l'excavation, évocatrice de la maladie(16).

2.2. Formes extra pulmonaires de tuberculose

Elles représentent environ 25 % des cas déclarés. Elles peuvent être associées ou non aux formes pulmonaires :

2.2.1. Tuberculose ganglionnaire

Cette forme est la plus fréquente des tuberculoses extra-pulmonaires. La lésion est en général cervicale, unilatérale et unique. Les adénopathies multiples et/ou avec des localisations extra-cervicales correspondent à des tuberculoses plus importantes. Elles sont plus souvent associées à une localisation pleuro-pulmonaire concomitante et à des signes généraux, tels que la fièvre et la perte du poids.

2.2.2. Tuberculose osseuse :

La plus fréquente des localisations ostéo-articulaires est la spondylodiscite tuberculeuse, ou mal de Pott. Elle se manifeste par une atteinte vertébrale et discale avec formation d'abcès froids paravertébraux. Ils peuvent entraîner des déformations rachidiennes, des tassements, ainsi que des compressions médullaires(16).

2.2.3. Méningite tuberculeuse :

La méningite tuberculeuse se manifeste par une fièvre, des maux de tête, des troubles de la conscience et une altération rapidement progressive de l'état général (17).

2.2.4. Tuberculose digestive

La contamination du tube digestif se fait par déglutition de sécrétions contaminées. L'ensemble du tube digestif peut être atteint, de la bouche à l'anus, avec des lésions pouvant aller de l'ulcération à la masse pseudotumorale.

3. Les symptômes de la tuberculose

Les symptômes de la tuberculose dépendent de la localisation des germes. Les symptômes généraux de tuberculose sont les suivants :

- ✓ *Fièvre ;*
- ✓ *Transpiration nocturne, même lorsqu'il fait froid ;*
- ✓ *Perte d'appétit et de poids ;*
- ✓ *Fatigue.*

En cas de tuberculose pulmonaire, le principal symptôme est une toux persistante (qui dure plus de deux à trois semaines). Le malade produit également des crachats en abondance qui peuvent contenir du sang.

Certains symptômes de la tuberculose ressemblent aux symptômes d'autres maladies. Il est donc important de procéder à un examen dans un établissement de santé(18).

4. La Tuberculose maladie(Tm) et l'Infection Tuberculeuse Latente(ITL)

Après avoir été exposées au Bacille de la tuberculose, un certain nombre de personnes vont être infectées et seule 10 % d'entre elles vont secondairement développer la maladie généralement dans les premières années qui suivent l'infection. Il y a donc une distinction entre infection et maladie.

4.1. L'Infection Tuberculeuse Latente (ITL)

Elle correspond à la survie de *Mycobactérie tuberculosis* à l'état latent dans l'organisme c'est le résultat d'un équilibre entre le système immunitaire de la personne infectée et la bactérie. La personne infectée, ne présente aucun symptôme et n'est pas contagieuse ;

Le risque de développer une tuberculose maladie (Tm) dépend du délai par rapport à la contamination, l'âge et de l'état immunitaire du sujet infecté.

4.2. La Tuberculose maladie (TM)

Environ 10% des personnes infectées développeront une tuberculose maladie durant leur vie. Cette infection se développe, avec des symptômes(fièvre, sueurs nocturnes, amaigrissement) associés à des signes respiratoires (toux prolongée, hémoptysies) et des signes radiologiques.

5. Dépistage et Diagnostic de la tuberculose

5.1. Dépistage de la tuberculose latente (primo-infection)

Le dépistage d'une infection tuberculeuse latente nécessite la réalisation d'une intradermoréaction (IDR) tuberculique (ou test de Mantoux).

Il s'agit d'un test d'hypersensibilité retardée. Cette épreuve consiste en l'injection intradermique (face antérieure de l'avant-bras) d'un mélange de protéines tuberculeuses purifiées appelé la tuberculine.

⇒ Une réaction positive à ce test se traduit, 48 à 72 heures après l'injection, par une rougeur et une induration de la peau (> 10mm de diamètre) au niveau du site d'injection (présence d'une immunité cellulaire contre *M.tuberculosis*) (voir Figure)



Test Intradermoréaction.



Résultat d'un test IDR.

⇒ Une réponse positive à ce test ne signifie pas automatiquement que le patient présente une tuberculose active mais bien que son organisme a connu, à un moment donné, un contact avec le bacille tuberculeux (primo-infection).

Chez les personnes âgées et les patients immunodéprimés, comme les malades atteints par le SIDA, il y a un risque de résultats faussement négatifs à l'IDR car ces patients sont non-répondeurs.

Des résultats faussement positifs sont également possibles notamment si le patient a été vacciné par le BCG ou infecté par une autre mycobactérie non-tuberculeuse.

5.2. Diagnostic de la tuberculose active

La suspicion d'une tuberculose-maladie chez un patient nécessite la réalisation d'examens médicaux plus approfondis :

✓ Examen radiologique (cas suspects ou non confirmés).

La radiographie pulmonaire permet de diagnostiquer les formes pulmonaires de la maladie. Pour montrer des lésions :

- **Nodule isolé** (forme pseudo tumorale : tuberculome) ou multiples ;
- **Infiltrats ;**
- **Caverne unique ou multiple.**

Les anomalies visibles sur le cliché thoracique sont le meilleur signe prédictif d'une tuberculose et leur extension est corrélée au résultat des examens bactériologiques des expectorations (19).



Figure 6 : Radiographie du thorax d'un patient avec Une tuberculose Pulmonaire avancée(20).

✓ **Examens bactériologiques (cas confirmés)**

Le diagnostic de la tuberculose repose sur des critères bactériologiques tels que :

- **L'examen microscopique** permet la mise en évidence de bacilles tuberculeux après coloration de Ziehl-Neelsen(Figure7)ou par l'utilisation de l'auramine en microscopie à fluorescence (Figure 8)d'un échantillon d'expectoration (par aspiration bronchique, brossage endo-bronchique, liquide de lavage broncho-alvéolaire, crachat, urines et liquides de ponction)(21).

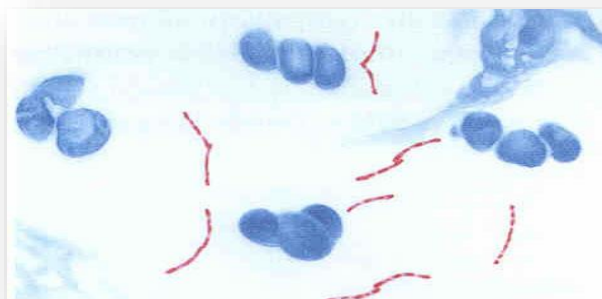


Figure 7 : coloration de Ziehl-Neelsen(22).

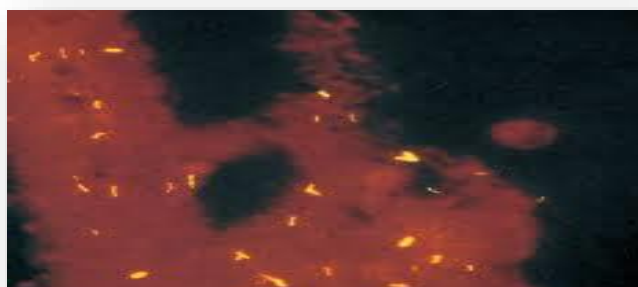


Figure 6 : Coloration à l'Auramine(22).

- La culture aérobie de ce même échantillon sur milieu spécifique de Löwenstein Jensen, étant donné la croissance lente de *M. tuberculosis*, 5 à 7 semaines sont nécessaires pour l'obtention d'un résultat définitif.

6. Traitement de la tuberculose

➤ Isolement

Il convient d'isoler (avec ou sans hospitalisation) les patients contagieux pendant les 3 premières semaines du traitement afin de limiter les risques de transmission. La levée de l'isolement peut se faire après amélioration de l'état général du patient et l'obtention de trois examens microscopiques des expectorations négatifs (23).

➤ Le traitement thérapeutique standard

Le traitement standard fait appel aux antibiotiques dits de « première ligne ». Ces antibiotiques sont : l'isoniazide (Nicotibine®), la rifampicine (Rifadine®), la pyrazinamide (Tebrazid®) et l'éthambutol (Myambutol®).

La durée du traitement standard est de 6 mois et comporte 2 phases successives :

- ◆ **La phase initiale** dure 2 mois et consiste en l'administration de 4 antibiotiques : *l'isoniazide, la rifampicine, la pyrazinamide et l'éthambutol*.
- ◆ **La deuxième phase**, appelée aussi « **phase de continuation** », dure 4 mois et consiste en une bithérapie à base d'isoniazide et d'un second antibiotique, en général *la rifampicine* (24). La prise des médicaments est quotidienne par voie orale (de préférence le matin à jeun).

Il est important pour le malade de prendre tous ses médicaments régulièrement, selon le calendrier prescrit, pendant toute la durée du traitement. Sinon, la maladie risque de devenir incurable.

7. Facteurs favorisant la résistance aux antituberculeux

- ✓ **La monothérapie**: l'administration d'un seul antibiotique favorise la sélection de mutants résistants à cet antibiotique.
- ✓ **L'irrégulation du traitement**: la tuberculose pharmaco-résistante résulte d'un traitement suivi de façon irrégulière ou partielle, les malades omettent de prendre régulièrement tous leurs médicaments jusqu'à la fin de la période prescrite (6 à 9 mois) par ce qu'ils commencent à se sentir mieux, ou parce que les médecins ou les agents de santé ne

prescrivent pas le bon processus thérapeutique, ou encore parce que l'approvisionnement en médicaments n'est pas fiable.

8. Préventions

Le Maroc réalise un programme national de lutte antituberculeuse dont les objectifs sont **(25)** :

- ✚ D'augmenter le taux de détection de 80% à 85% et d'atteindre un taux de succès thérapeutique de 90% entre 2006 et 2010.
- ✚ De réduire de moitié la prévalence et la mortalité de la tuberculose dans la population à l'horizon 2015 par rapport aux chiffres estimés de l'année 1990.

D'une part,

- Lorsqu'un cas de tuberculose est diagnostiqué, une enquête doit être effectuée pour contacter toutes les personnes ayant été en contact avec le tuberculeux.
- les malades suspectés de tuberculose peuvent être placés en isolement thérapeutique à l'hôpital, c'est-à-dire dans une chambre fermée(en quarantaine).
- Les déplacements du malade à l'extérieur de sa chambre sont restreints et le malade doit porter un masque dès qu'il reçoit une visite ou sort de sa chambre.
- Le personnel médical doit lui aussi porter un masque lorsqu'il entre en contact avec le malade.

D'autre part,

- le BCG (Bacille de Calmette et Guérin) est le vaccin destiné à protéger contre la tuberculose. Cette vaccination a pour but principal de protéger les jeunes enfants des formes graves de la tuberculose précoce.



2^{ème} PARTIE: MATERIEL ET METHODES



I. Cadre d'étude

L'objectif de mon projet fin d'étude **d'une part** c'est une étude rétrospective de l'analyse des cas positifs au *Mycobacterium tuberculosis* Concernant les prélèvements afférent au laboratoire SAISS d'analyses médicales de l'année 2014 ; en vue de réaliser l'étude rétrospective nous avons utilisé un registre qui contenait les résultats d'analyses et informations correspondant à 732 patients demandant l'analyse sujet d'étude et des informations sur les patients, **d'autre part** d'assister à l'application des différentes techniques de laboratoire mis en évidence.

❖ Les différentes techniques de laboratoire

II. Recueil des prélèvements

1- Prélèvement de type crachat

Pour chaque patient suspect de tuberculose pulmonaire, trois échantillons de crachat sont collectés en 2 jours :

- ◆ Le premier échantillon est recueilli le jour de consultation,
- ◆ Le deuxième est recueilli le lendemain par le malade lui-même au réveil, à jeun,
- ◆ Le troisième échantillon est recueilli au laboratoire au moment où le patient ramène son 2^{ème} crachat du matin.

Les crachats doivent être prélevés en pleine d'aire ou dans une salle bien aérée, ensoleillée et située le plus loin possible des autres consultants.

2- Autre prélèvement

Parmi les autres prélèvements recueilli li ya : urine, pus, liquide articulaire, aspiration bronchique, tubage gastrique.

III. Enregistrement des échantillons

Il est très important d'identifier les échantillons pour éviter les erreurs. Ces échantillons sont accompagnés d'une fiche de palliasse (**voir annexe1**) indiquant :

- ◆ La date de réception de l'échantillon.
- ◆ Le nom, le prénom, le sexe, l'âge et l'adresse du patient.
- ◆ La nature de l'échantillon.

Le prélèvement est réalisé à partir des crachats, des liquides de ponction (liquide céphalo-rachidienne, liquide articulaire, liquide pleural et liquide d'ascite), pus, urine, aspiration bronchique et de tubage gastrique.

IV. Examen Microscopique : Bacille de Koch Examen Direct (BKED)

Avant de commencer la manipulation il faut tout d'abord :

- ♣ Porter des gants stériles au cours de la manipulation ;
- ♣ Fermer les portes et les fenêtres du laboratoire pour éviter les courants d'air qui cause la contamination ;
- ♣ Manipuler près d'un bec bunsen pour éviter la contamination des échantillons ;
- ♣ Stériliser l'anse

1. Préparation du frottis

- ▣ Marquer le numéro du prélèvement à l'une des extrémités de la lame à l'aide d'un crayon diamant.
- ▣ L'étalement du crachat s'effectue sur des lames neuves, propres.
- ▣ La préparation du frottis se fait près d'un bec bunsen (dans un rayon de 20 cm)
- ▣ On prélève une parcelle purulente ou hémorragique de crachat. Le contenu de l'anse est étalé en couche mince se forme circulaire au centre de la lame sur une surface.
- ▣ Le frottis ainsi réalisé sécher à l'air pendant 15 à 20 mn. L'étalement une fois sec est fixé par 3 passages rapides sur la flamme rouge du bec bunsen.

2. Technique de coloration

Les lames sont placées sur un porte lame (2 baguettes de verre ou d'acier) bien équilibré horizontalement.

♣ 1er temps : coloration

Cette étape donne une coloration rouge brique au Bacille

Recouvrir la lame en totalité de fuchsine pendant 5 minutes tout en chauffant doucement (2 à 3 fois) jusqu'à émission de vapeur au moyen de la flamme d'un coton monté sur une tige, imbibé dans l'alcool à brûler et flambé.

♣ 2èmetemps : décoloration

Cette étape a pour but de relever l'excès de la fuchsine.

Recouvrir la lame avec le mélange « aide-alcool » laissé agir 3 minutes

⇒ Rincer abondamment à l'eau.

Le frottis est alors incolore ou légèrement teinté en rose

♣ 3ème temps : Contre-coloration

Cette étape donne un fond bleu à la lame.

Recolorer par la solution de bleu de méthylène

Laisser agir 1 minute

⇒ Rincer à l'eau puis laissé sèche à l'étuve à 37°C avant l'examen microscopique.



Figure 9 : coloration de Zeihl-Neelsen.

3. Lecture des lames colorées au Zeihl -Neelsen

Les lames colorées sont observées à l'objectif à immersion x100.

Les bacilles Acido-Alcolo-Résistants (BAAR) se présentent en rouge ou en rosé sur un fond contre coloré en bleu.

Les résultats sont exprimés en BAAR selon le tableau ci-dessous :

Nombre de Bacille observés	Noter	Répondre à rendre
0/300 champs	Négatif	-
1-2/300 champs	Nbre Observé	(+/-)*
1-10/100 champs	Nbre/100 champs	+
1-10/10 champs	Nbre /10champs	++
1-10 /champs	Nbre/ champs	+++
Sup 10 champs	Nbre /champs	++++
16 Amas /300 champs	Incapable de compté les bacilles	Nombre très important des Bacilles

*Ces examens doivent être répétés, en demandant de nouveaux échantillons du crachat

Tableau 1 : Annotation des résultats de l'examen direct d'expectoration

V. Examen Macroscopique Bacille de Koch Culture (BKC)

Le diagnostic bactériologique de la tuberculose joue un rôle crucial dans la lutte anti-tuberculose. Il existe plusieurs manières d'accomplir ce diagnostic dont la culture. En effet, cette dernière étant plus sensible que l'examen direct, permet d'améliorer le diagnostic et par conséquent le dépistage de la tuberculose.

La culture est pratiquée soit

- ❖ Dans le cas d'une TPM+ pour :
 - ◆ S'assurer que les BAAR vus au microscope sont bien des mycobactéries.
 - ◆ Effectuer l'identification biochimique de la souche cultivée.
 - ◆ Réaliser des tests de sensibilité à l'anti-bacillaire.
- ❖ Dans le cas d'une TPMO, des expectorations de patients fortement soupçonnés de tuberculose.

1. Technique utilisée : Méthode de Petroff modifiée avec centrifugation

Le Matériel nécessaire à la réalisation de cette technique doit être placé correctement dans la Hotte.



Figure 10 : Travail sous poste de sécurité microbiologique pour la manipulation du bacille de la Tuberculose.

*Etape 1. Fluidification –décontamination

Dans un tube à centrifuger, conique, stérile de 50ml mettre :

- 2 à 3 ml de crachat
- 2 fois le volume du crachat en hydroxyde de sodium (Na OH) à 4%.

- Ajouter quelques gouttes d'indicateur PH.
 - Agiter à l'aide d'un vortex.
 - Porter à l'étuve à 37°C pendant 20-30 mn (ne jamais dépasser 30mn)

***Etape 2. Neutralisation**

Neutraliser à l'aide d'une solution d'acide sulfurique à 4%. La neutralisation atteint lorsque la solution vire au jaune.

***Etape 3. Centrifugation**

Centrifuger 3000t/mn pendant 20mn. Puis éliminer le surnageant et utilisé le culot pour réaliser la culture.

***Etape 4. Ensemencement**

Ensemencer la totalité du culot sur 2 tubes de milieu *lowenstein –jansen* à raison de 0.2 à 0.3 ml par tube.

***Etape5.incubation**

Incuber les tubes ensemencés en position inclinée ,bouchons débloqués dans l'étuve à 37°C.

2. Surveillance des résultats

Examiner les tubes, le 3ème ou le 4ème jour d'incubation afin de déceler une contamination ou la présence de mycobactéries atypique à croissance rapide.

(pour tout tube contaminé demande un autre prélèvement).

3. La lecture

La lecture se fait en premier lieu une fois par semaine jusqu'à la 4ème semaine puis une fois par mois jusqu' au 3ème mois (90J).

4. Expression des résultats :

◆ Culture positive :

Les cultures sont déclarées positives dès l'apparition de colonies :

- Typique à croissance lente, rugueuse de couleur beige un aspect en chou-fleur.
- Atypique à croissance rapide ou lente de différents aspects le plus souvent lisses avec certaine espèce pigmentation assez caractéristique

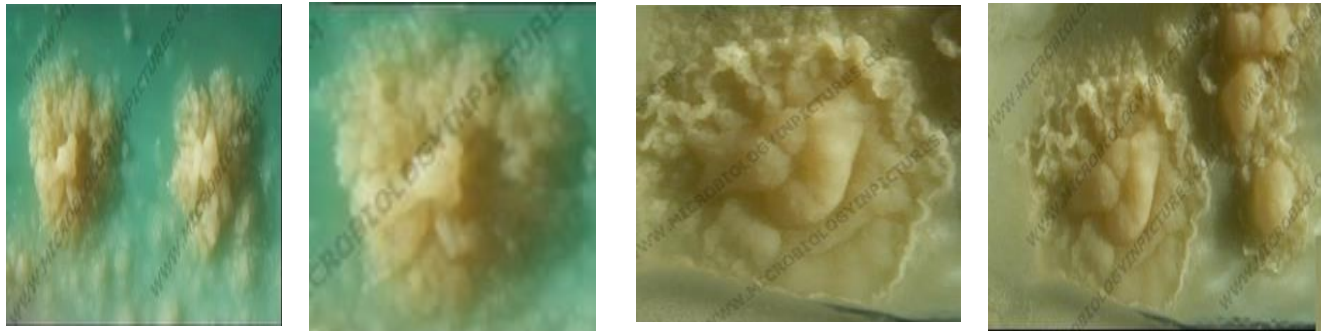


Figure 7 : Mycobacterium tuberculosis sur milieu de Löwenstein - Jensen après 6 semaines de culture 37° C.

Confirmer la présence de **BAAR** dans la culture par coloration spécifique de **ZiehlNeelsen**.

Les cultures positives sont envoyées systématiquement au laboratoire national de référence de la tuberculose à l'institut national d'hygiène pour identification et sur la demande du Médecine pour la réalisation d'un test de sensibilité aux anti-bacillaires

◆ Culture négative

Les cultures sont déclarées provisoirement négatives à partir du 30ème jour et si elle reste stériles jusqu'au 60ème jour.



***Cas d'une culture négative**



*** cas d'une culture positive**

◆ Culture contaminées :

Taux de contamination	Résultat
Entre 2 et 5%	Normal
Inférieur à 2%	Trop forte décontamination
Sup à 5%	Décontamination n'est pas suffisante

Tableau 2 : le taux de contaminations de la culture.



3^{ème} PARTIE:RESULTAT ET DISCUSSION



❖ Etude rétrospective

I- Répartition des prélèvements selon le type

Notre étude repose sur une population de 732 échantillons de nature différente, répartie selon le type de prélèvement : soit des crachats ou autres tels que : urine, pus, liquide articulaire, aspiration bronchique,

Ainsi, sur l'ensemble des échantillons, 605 cas sont de type crachats (qui représentent environ 83% de la population étudiée) et 127 d'autres (soit 17% des échantillons).

Après une première analyse nous constatons la prédominance de l'utilisation des prélèvements de type crachoir par rapport aux autres formes de prélèvement, ceci est due principalement au fait que :

- ♣ Les crachoirs sont facilement exploitables et donnent des résultats rapides et fiables ;
- ♣ L'effet d'apprentissage des techniciens du laboratoire sur les prélèvements de type crachoir ;
- ♣ les crachoirs représentent l'outil le plus efficace pour détecter la tuberculose pneumonie (cette dernière est considérée la maladie la plus fréquente et contagieuse).

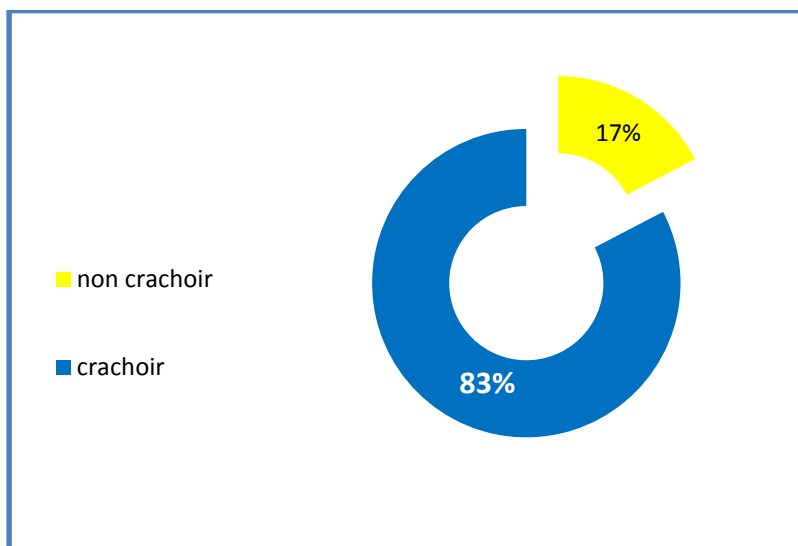


Figure 8 : Répartition des prélèvements selon le type

II- Le pourcentage des cas positifs au Bacille de Koch (BK) chez les patients suspects de Tuberculose

1. Le pourcentage des cas positifs au BK dans les prélèvements de type crachat

Nous allons nous intéresser dans cette partie à l'étude des cas suspects et pour lesquels nous avons procédé à un prélèvement de type crachat. Comme dénombré ci-dessus, il s'agit de 605 prélèvements recueillis dont 41 ont été confirmés comme des cas positifs ce qui représente 7% des prélèvements de type crachat (figure 13).

Ce constat suppose la présence d'une tuberculose pulmonaire contagieuse, qui est à l'origine de la transmission des bacilles tuberculeux.

Pour confirmer ce constat, un deuxième et troisième examen microscopique demeure indispensable.

- ✓ La valeur 7% représente le pourcentage de la tuberculose observé sur 605 prélèvements de type crachats, c'est-à-dire le pourcentage de BK chez les patients suspects ayant des symptômes de la maladie tels que : fièvre, perte d'appétit et de poids, la fatigue, transpiration nocturne même lorsqu'il fait froid.
- ✓ En outre on peut supposer qu'un membre dans la famille soit infecté par la bactérie.

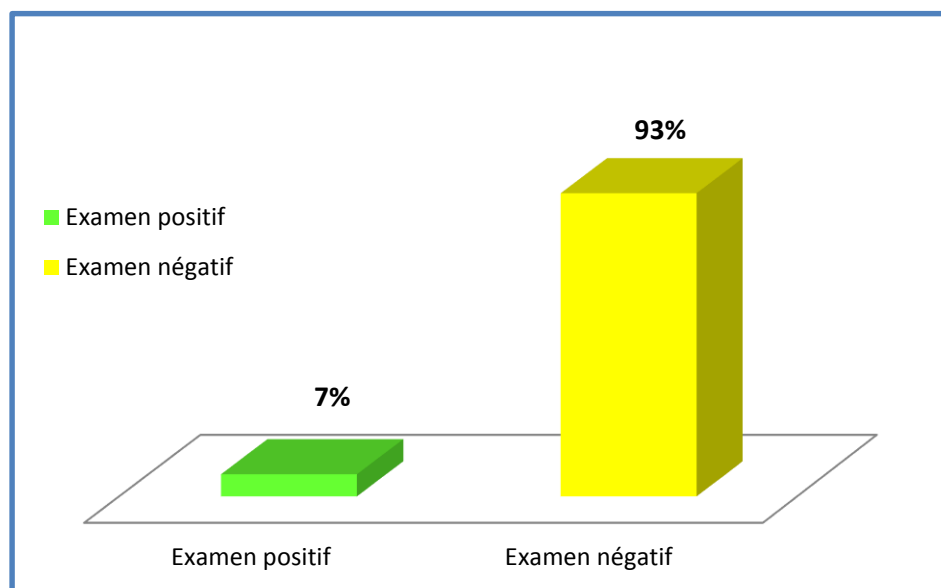


Figure 13: Nombre des cas positifs au BK dans les prélèvements de type crachats en 2014.

2. Le pourcentage des cas positifs au BK selon le sexe

Tranche d'âge	Le sexe	Nombre des cas négatifs	Pourcentage%	Nombre des cas positifs	Pourcentage%
0-4	Garçon♂	25	4%	0	0%
	Fille♀	22	3%	0	0%
5-15	Homme ♂	30	5%	1	1%
	Femme♀	16	2%	5	6%
16-20	Homme ♂	22	3%	1	1%
	Femme♀	21	3%	6	7%
21-60	Homme ♂	205	32%	30	37%
	Femme♀	185	28%	23	29%
60 et plus	Homme ♂	67	11%	12	15%
	Femme♀	58	9%	3	4%
Total		651	100%	81	100%

Le tableau ci-dessus nous ramène à relever que plus on vieillit plus on est exposé à être facilement contaminé par la tuberculose, en effet, 12 % des échantillons examinés est dont la tranche d'âge est comprise entre 60 ans et plus, sont des cas confirmés contre respectivement 11%, 4%, 11% et 0% pour les tranches d'âge 21-60 ; 16-20 ; 6-15 et 0-5. Ceci peut être expliqué notamment par une faiblesse immunitaire.

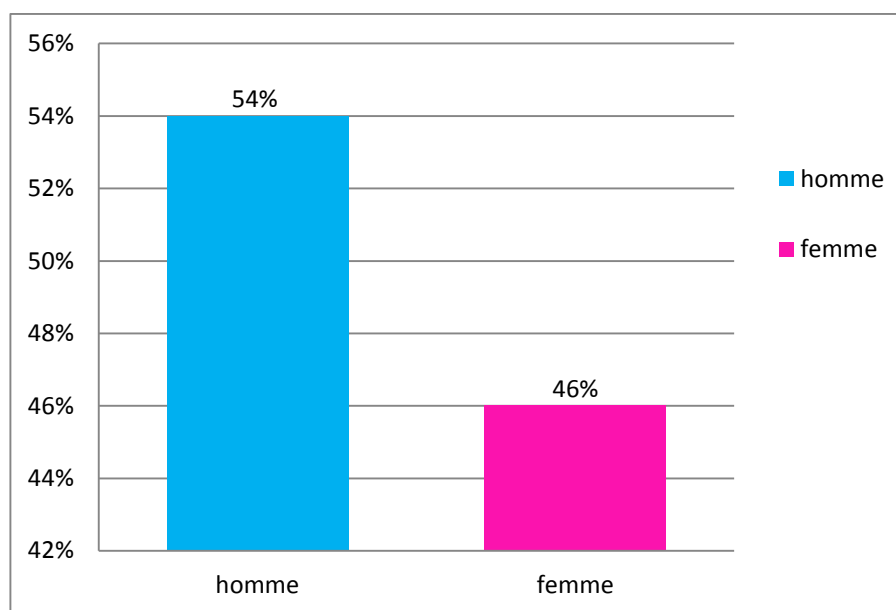


Figure 14 : Répartition des pourcentages des cas positifs au BK selon le sexe

Sur l'ensemble des 81 échantillons positifs, le sexe masculin est majoritairement présent avec 44 cas et représente 54%, alors que les femmes constituent seulement 46% avec 37 cas confirmés. Ce constat nous ramène à conclure que les hommes de notre échantillon sont plus exposés à une contamination par la tuberculose que les femmes, soit un ratio de 1.19 en faveur des hommes

(Figure 16). Des résultats similaires ont été observés par Mtiraoui (1998), (26) et Rhalys (1993), (27) dans le Sahel tunisien. Quant à Christiane (2014), (28) il a trouvé dans la zone de santé de Lubumbashi que 58.75% de la population sont des hommes affectés par cette maladie par rapport à 41.25% des femmes entre les années 2010 et 2011.

⇒ Ce phénomène peut-être dû à la l'exposition la plus fréquente des hommes aux mauvaises conditions de travail par rapport aux femmes, sachant que la bactérie se développe dans les conditions humides qui manque d'enseillement.

3. Le pourcentage des cas positifs au BK selon l'âge

Comme précisé sur la figure 16 et à partir de 81 échantillons positifs sur 732 nous avons décelé les résultats suivants :

- *0 cas positifs (0%) ayant un âge compris entre la tranche 0-5 ans ;
- * 6 cas positifs (7%) ayant un âge compris entre la tranche 5-15 ans ;
- *7cas positifs (9%) ayant un âge compris entre la tranche 16-20 ans ;
- * 53 cas positifs (65%) ayant un âge compris entre la tranche 21-60 ans ;
- * 15 cas positifs (19%) ayant un âge compris entre la tranche 60-93 ans ;

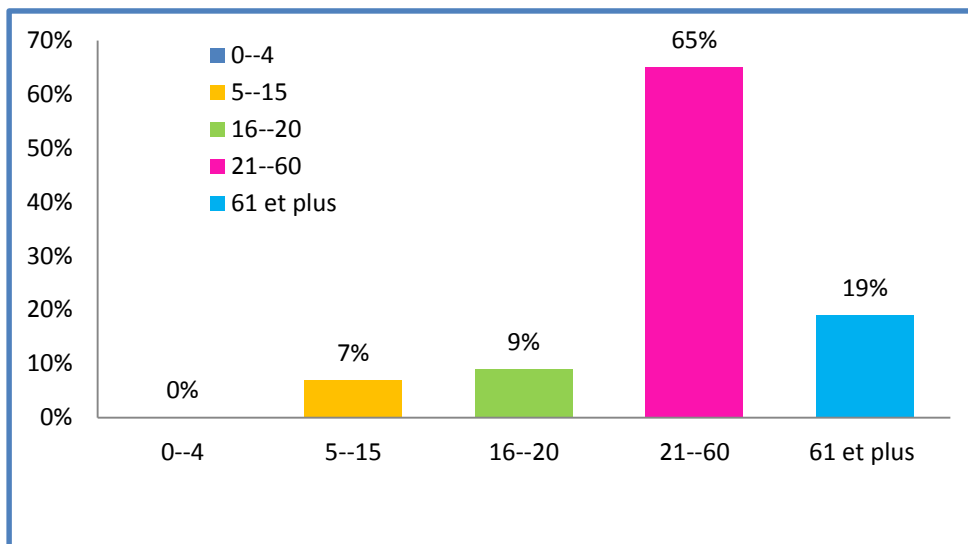


Figure 15 : Répartition des pourcentages des cas positifs au BK selon l'âge.

On remarque que La population dont l'âge se situe sur la tranche 21-60 ans est la plus exposée à la maladie de la tuberculose, ceci nous ramène à faire une liaison entre le milieu où vivent ces gens, et plus précisément le milieu de travail, et la propagation de la bactérie. En effet la population active qui entretient plus d'interactions avec le milieu extérieur chaque jour a plus de risque d'être contaminé par la bactérie.

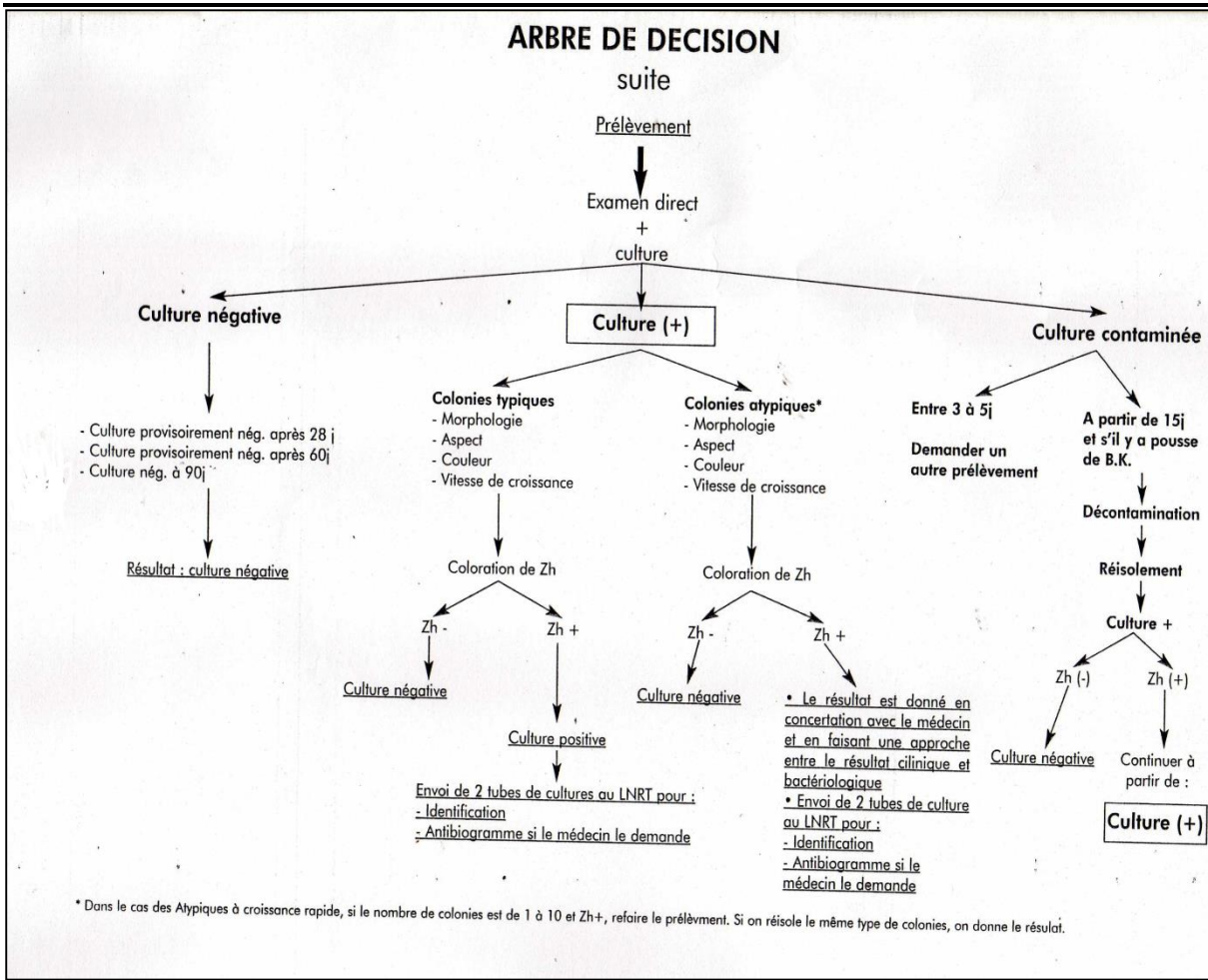
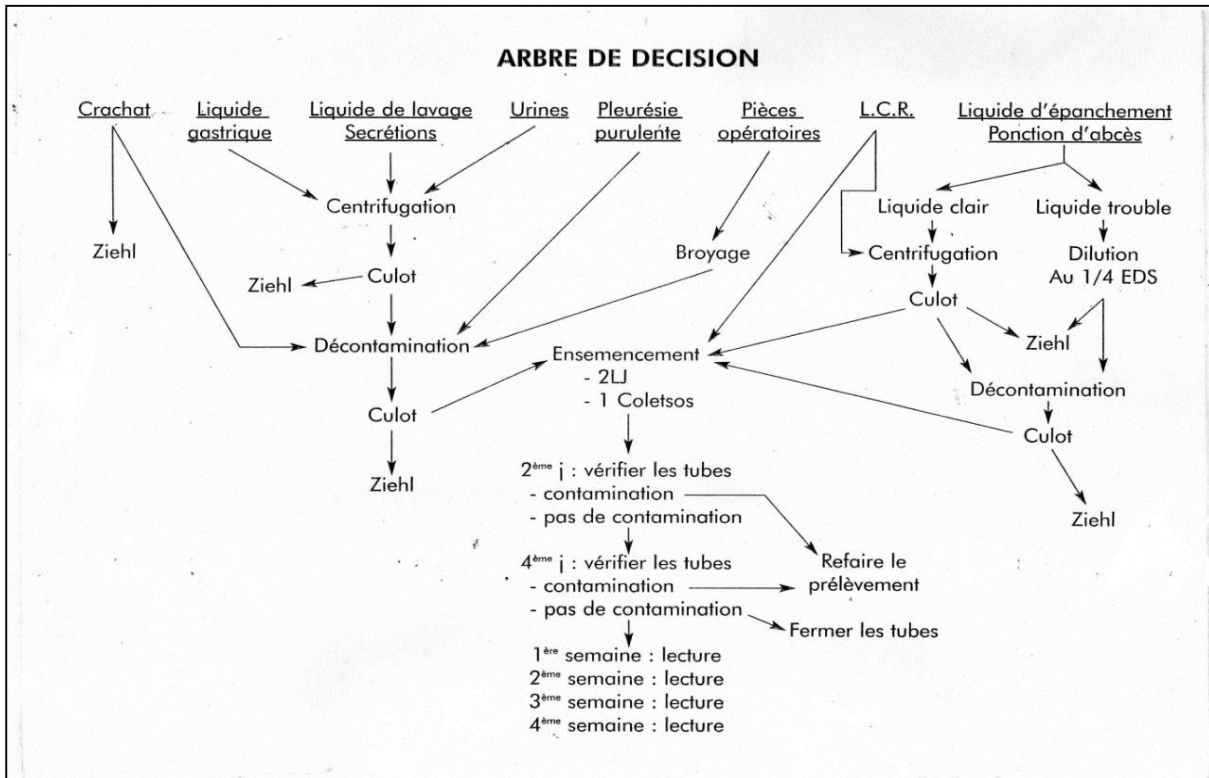
Conclusion

La tuberculose causée par le *Mycobacterium tuberculosis*, est l'infection *Mycobacterienne* la plus commune dans le monde et demeure un problème de santé publique de premier plan .

D'après notre étude effectuée au sein du laboratoire d'analyse SAISS,, deux études ont été réalisées : le première est d'assister à l'application des différentes techniques de laboratoire mis en évidence, le deuxième est une étude rétrospective des cas, datant de Janvier 2014 à Décembre 2014.

Et donc sur 732 échantillons Nos résultats indiquent le suivant :

- ♣ Les échantillons de type crachats présentes83% et les autre17%.
- ♣ Le sexe masculin a représenté 54% et les femmes46 %.
- ♣ 7% des prélèvements de type crachats sont positifs, indiquant une tuberculose pulmonaire
- ♣ la tranche d'âge de 21-60 ans est la plus exposée à la maladie de la tuberculose.



REFERENCES

- 1) document de l'OMS « Formation des formateurs en diagnostic microscopique de la Tuberculose.(2005)
- 2) Shinnick, T. M. & R. C. Good, (1994) Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*13: 884-901.
- 3) Bonard, D., P. Msellati, L. Rigouts, P. Combe, D. Coulibaly, I. M. Coulibaly & F. Portaels, (2000) What is the meaning of repeated isolation of *Mycobacterium africanum*? *Int J Tuberc Lung Dis* 4: 1176-1180.
- 4) O'Reilly, L. M. & C. J. Daborn, (1995) The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis* 76 Suppl 1: 1-46.
- 5) Prodinger, W. M., A. Eigentler, F. Allerberger, M. Schonbauer & W. Glawischnig, (2002) Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. *J Clin Microbiol*40: 2270-2272.
- 6) van Soolingen, D., T. Hoogenboezem, P. E. de Haas, P. W. Hermans, M. A. Koedam, K. S. Teppema, P. J. Brennan, G. S. Besra, F. Portaels, J. Top, L. M. Schouls & J. D. van Embden, (1997) A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* 215 complex. Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol*47: 1236-1245.
- 7) Harshey, R. M. & T. Ramakrishnan, (1977) Rate of ribonucleic acid chain growth in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Bacteriol*129: 616-622.
- 8) www.microbiologyinpictures.com
- 9) Gangadharam, P. R. & A. J. Droubi, (1981) Identification of mycobacteria by smear examination of the culture. *Tubercle* 62: 123-127.
- 10) <https://fr.wikipedia.org/wiki/Mycobacteriaceae>
- 11) VINCENT V, MARCHAL G. Tuberculosis : *Mycobacterium tuberculosis* and its host. *Rev Praticien*. 2002;52(19):2111-2114.

- 12) http://campus.cerimes.fr/microbiologie/enseignement/microbiologie_3/site/html/3.html
- 13) Dye, C., S. Scheele, P. Dolin, V. Pathania & M. C. Raviglione, (1999) Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA 282: 677-686
- 14) Murray, C. J. & J. A. Salomon, (1998) Modeling the impact of global tuberculosis control strategies. Proc Natl AcadSci U S A 95: 13881-13886
- 15) WHO, (2008b) Global tuberculosis control 2008 - surveillance, planning, financing. WHO Report 2008. WHO/HTM/TB/2008.393
- 16) BILLY C, PERRONNE C. Aspects cliniques et thérapeutiques de la tuberculose chez l'enfant et l'adulte. EncyclMédChir, Mal Inf. Mai 2004;1(2):81-98.
- 17) Byrd T, Zinser P. TuberculosisMeningitis. Curr Treat Options Neurol 2001.
- 18) OMS 2004 (Guide destiné à l'appui au traitement contre la tuberculose).
- 19) wilcke JT, Kok-Jensen A. Diagnostic strategy for pulmonary tuberculosis in a low-incidence country: results of chest X-ray and sputum cultured for Mycobacterium tuberculosis. Respir Med 1997; 91(5):281– 285.
- 20) <http://fr.wikipedia.org/wiki/Tuberculose>
- 21) Saltini, C., (2006) Chemotherapy and diagnosis of tuberculosis. Respir Med 100: 2085-2097.
- 22) www.institutpasteur.nc
- 23) Bouvet, E., D. Abiteboul, F. Antoun, Z. Bessa, C. Billy, B. Dautzenberg, B. Decludt, J. Gaudelus, V. Jarlier, S. Lerasle, O. Siruguet & V. Vincent, (2003) Synthèse et recommandations du groupe de travail du conseil supérieur d'hygiène publique de France: Prévention et prise en charge de la tuberculose en France. Maladies respiratoires 20.
- 24) Tattevin, P., (2007) Tuberculosis treatment in 2007. Med Mal Infect 37: 617-628.

- 25) Ministère de la Santé Marocain, 2006. « Objectifs de la programme national de lutte antituberculeuse » .
- 26) Mtiraoui A, et al. Epidémiologie de la tuberculose dans le Sahel tunisien. *Med Mal Infect.*1998;28(2):199–202.
- 27) RHALY S. Ag Aspects cliniques, diagnostiques et thérapeutiques de la tuberculose chez les 0-15 ans dans les services de pneumo-phtisiologie de l'hôpital national du point Get du dispensaire antituberculeux de Bamako (à propos de 30 cas) Thèse de médecine, Bamako, 1993.
- 28) Christian KakisingiNgama ,Michel ManikaMuteya, Yves Isango Idi Lukusha, Serge MatandaKapend, Henri MundongoTshamba, Paul Ilunga Makinko, Claude MwambaMulumba, et Liévin Kapend a Kalala. Profile épidimiologique et clinique de la tuberculose dans la zone de santé de Lubumbashi(DR Congo) ;(2014). 10.11604/pamj.2014.17.70.2445.

Résumer

Les infections respiratoires font partie des pathologies infectieuses les plus fréquentes et représentent une cause importante de morbidité et de mortalité (1ère cause de décès par infection chez les sujets âgés). Elles concernent tous les âges et peuvent survenir aussi bien chez l'adulte ou l'enfant sans aucune morbidité que sur des terrains cliniques particuliers (immunodépression, intubation-ventilation, dilatation des bronches...).

Les microorganismes responsables d'infections respiratoires sont nombreux et variés virus (le plus souvent), bactéries et plus rarement champignons.

Mycobactérie : se sont des microorganismes responsable de maladie chez l'homme (tuberculose, lèpres) et les animaux (mycobactéries).

Mots –clés

Mycobactérium tuberculosis, infection, tuberculose, Bacille de koch, Contagieuse.