

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA
TERRE ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire : Biologie moléculaire des procaryotes

Thème : La sensibilisation de la bacilloscopie par la méthode à l'hypochlorite de sodium.

Présenté par :

BAHNOUS Sara

MENANI Fatiha

ROUAIGUIA Ibtissem

Devant le jury composé de :

Président : Mme. KHELLAF M.

M.C.B. Université de Guelma

Examinatrice : Mme. TORCHE E.

M.C.B. Université de Guelma

Encadreur: Mr. BENOUARETH D. E.

Pr. Université de Guelma

Membre invité : Dr. NAMOUNE B.

Médecin Chef. UCTMR Guelma

Juin 2015

Dédicace

A Mes parents

A mes frères, et sœurs.

A toute ma famille.

A tous mes cousins, oncles et tantes.

A tous mes amis.

FATIHA

Dédicace

*A mes parents et surtout ma mère défunte, ma pensée et mon
souvenir.*

A mes frères, et sœurs.

A toute ma famille.

A tous mes cousins, oncles et tantes.

A tous mes amis.

Ibtissem

Dédicace

*A Mes parents,
A mes frères et sœurs,
A toute ma famille,
A tous mes cousins, oncles et tantes,
A tous mes amis.
A ma défunte mère, avec ma pensée et mon souvenir.*

Sara

Remerciements

Nos remerciements, d'abord à Dieu le tout puissant pour la volonté, la santé, et la patience qu'il nous a donné durant toutes ces années.

Avec notre haute considération, nous exprimons à travers cet ouvrage, nos chaleureux remerciements à notre encadreur, Pr. BENOUARETH Djamel Eddine, qui nous a assuré un fécond accompagnement pendant toute la phase de mise en forme de ce mémoire.

Nous formulons également nos remerciements et l'expression de notre parfaite considération à l'honorable jury notamment Mmes. KHALLEF M. et TORCH E. qui ont l'insigne honneur d'écouter attentivement notre présentation et d'apprécier sereinement la teneur de notre travail.

Nous adressons également nos remerciements et notre gratitude au Dr. Namoune B.

Qui nous a suivi avec abnégation et perspicacité, jusqu'au cap essentiel de notre objectif.

Enfin, nous tenons à remercier l'ensemble du corps enseignant de notre faculté qui n'a pas lésiné sur les moyens, l'art et la manière de nous transmettre la flamme du savoir sur les vecteurs de la connaissance.

Que tous ceux qui nous ont aidés à la conception de ce mémoire de fin de cycle, trouvent ici notre reconnaissance.

Fatiha

Ibtissem

Sara

Liste des figures

Page

Figure 1 : Incidence de la tuberculose (pour 100 000 personnes)	5
Figure 2 : Taxonomie des mycobactéries	7
Figure 3 : La paroi cellulaire de M.tuberculosis	9
Figure 4 : Image radiologique de la tuberculose pulmonaire	16
Figure 5 : Intradermo réaction à la tuberculine	19
Figure 6 : Prélèvement avec l'anse une parcelle du crachat purulent	25
Figure 7 : Etalement de la parcelle purulente sur la lame	25
Figure 8 : Fixation du frottis.....	26
Figure 9 : Culot après sédimentation 18h	26
Figure 10 : Coloration de Ziehl-Neelsen à chaud	27
Figure 11 : Décoloration par l'acide sulfurique dilué au ¼ et l'alcool 90%	28
Figure 12 : Contre coloration par la solution de bleu de méthylène	28
Figure 13 : Frottis d'expectoration après coloration de Ziehl-Neelsen à chaud.....	29
Figure 14 : Schémas de la procédure de lecture.....	29
Figure 15 : centrifugation et ensemencement du culot dans un tube de Löwenstein-Jensen ..	30
Figure 16 : Evolution de la tuberculose pulmonaire dans la Wilaya de Guelma entre 2008 et 2014.....	32
Figure 17 : Evolution de la tuberculose pulmonaire à microscopie positive et négative dans la Wilaya de Guelma de 2008 à 2014.	33
Figure 18 : Comparaison des frottis négatif obtenus par méthode direct simple et par méthode à l'hypochlorite de sodium.....	35
Figure 19 : Comparaison des frottis positif obtenus par méthode direct simple et par méthode à l'hypochlorite de sodium.....	36
Figure 20 : Frotti déclaré négatif selon la méthode direct simple et réajusté positif par la méthode à l'hypochlorite de sodium 5% (NaOCl).....	36
Figure 21 : Comparaison des résultats de la microscopie avec et sans traitement des expectorations à l'hypochlorite de sodium à 5 %.	39
Figure 22 : Culture positif sur milieu solide.	41
Figure 23 : culture négatif sur milieusolide	41

Figure 24 : Comparaison des résultats des crachats salivaires et crachats après traitement à l'hypochlorite de sodium à 5 % (NaOCl)	43
Figure 25 : Répartition des résultats positifs et négatifs identiques des crachats et des salives après traitement à l'hypochlorite de sodium à 5 % (NaOCl).	43

Liste des tableaux

Page

Tableau 1 : les différences des mycobactérium tuberculosis	8
Tableau 2 : Situation épidémiologique annuelle de tuberculose pulmonaire dans la Wilaya de Guelma à partir de l'année 2008 jusqu'à l'année 2014.	32
Tableau 3 : Origine des échantillons de crachat.	34
Tableau 4 : Répartition du taux d'incidence de la tuberculose pulmonaire à microscopie positive/négative.	37
Tableau 5 : Comparaison des résultats de la microscopie avec et sans traitement des expectorations à l'hypochlorite de sodium à 5 %.	38
Tableau 6 : Comparaison de la positivité selon la méthode directe et la méthode à l'hypochlorite de sodium à 5 % en fonction du sexe, de la tranche d'âge et du motif médical7	40
Tableau 7 : Comparaison des résultats de la culture des échantillons traités par la méthode directe et la méthode à l'hypochlorite de sodium 5%	41
Tableau 8 : Comparaison des résultats des crachats salivaires et crachats après traitement à l'hypochlorite de sodium à 5 % (NaOCl).	42

.

Liste des abréviations :

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ARN : Acide ribonucléique.

BAAR : Bacille Acido-Alcool Résistant.

BCG : Bacille de Calmette et Guérin.

BK : Bacille de Koch.

DOTS: Directly Observed Treatment Short-course.

EP : Extra-pulmonaire.

IDR : Intradermo Réaction

IGRA : Interféron-Gamma Release Assay (test de détection de l'interféron- γ).

IFN- γ : Interféron- γ .

MNT : Mycobactéries Non Tuberculeuses.

M.bovis : Mycobactérium Bovis.

M. leprae : Mycobactéries des lèpres.

M. tuberculosis : Mycobactérium tuberculosis.

NaOCl : Hypochlorite de sodium (Eau de Javel).

NC : Nouveaux cas

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

PCR : Réaction polymérase en chaîne.

PNTL : Programme National de Lutte Contre Tuberculose.

RH : Rifampicine et isoniazide

RHZE : Rifampicine, isoniazide, pyrazinamide, et ethambutol

S : Crachat salivaire.

SIDA : Le syndrome de l'immunodéficience acquise.

TBP: Tuberculose pulmonaire.

TBEP: Tuberculose extra-pulmonaire.

TBb : Tuberculose bovin.

TDO : Traitement Directement Observé.

TLI : Test de libération de l'interféron gamma.

TM: Tuberculose Maladie.

TPM + : Tuberculose Pulmonaire à Microscopie Positive.

TPM - : Tuberculose pulmonaire à microscopie négative.

UCTMR : L'unité contre la tuberculose et les maladies respiratoires.

UICTMR : L'union internationale contre la tuberculose et les maladies respiratoires.

UV : Ultra Violet.

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine.

ZN: Ziehl-neelsen.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

Chapitre I : Histoire et épidémiologie

I-1 Définition 2

I-2 Histoire de la maladie 2

I-3 Epidémiologie de la tuberculose 3

I-3-1 Au niveau mondial 3

I-3-2 Au niveau de l'Algérie 4

Chapitre II : Agent étiologique

II-1 Les mycobactéries 6

II-1-1 Taxonomie du genre Mycobactéries 6

II-1-1-1 Les mycobactéries non tuberculeuses 7

II-1-1-2 Mycobactéries des lèpres 7

II-1-1-3 Les mycobactéries tuberculeuses 7

II-1-2 Caractéristiques des mycobactérium tuberculosis 8

II-1-2-1 Caractères morphologiques 8

II-1-2-2 Caractères physiopathologiques 9

II-1-2-3 Caractères culturels 9

II-1-2-4 Caractères biochimiques 10

II-1-2-5 Caractères génomiques 10

II-1-2-6 Résistance aux agents physiques et chimiques 10

II-1-2-7 Propriétés d'acido-alcool-résistance 11

II-1-2-8 Survie à l'extérieur de l'hôte 11

Chapitre III : Maladie, diagnostic et traitement

III-1 Les différents types de la tuberculose 12

III-1-1 La tuberculose extra-pulmonaire 12

III-1-2 La tuberculose pulmonaire	12
III-1-2-1 Mode de transmission et développement	12
III-1-2-2 Primo-infections	13
III-1-2-3 Tuberculose active	14
III-2 Diagnostic de la tuberculose pulmonaire	15
III-2-1 Diagnostic clinique-radiologique	15
III-2-1-1 Les signes cliniques	15
III-2-1-2 Radiologie pulmonaire	15
III-2-2 Diagnostic bactériologique	16
III-2-2-1 Différents prélèvements (Forme pulmonaire)	16
III-2-2-2 Diagnostique direct	16
III-2-2-3 Diagnostic indirect	18
III-2-2-4 Méthodes de biologie moléculaire	20
III-3 Le traitement	21
III-3-1 Traitement de la tuberculose latente	21
III-3-2 Traitement de la tuberculose active	21
Partie pratique	
Objectif.....	23
I- Matériel et méthodes	23
I-1 Méthodologie.....	23
I-2 Cadre d'étude.....	23
I-3 Population étudiée	23
I-4 Recueil et conservation des crachats	23
I-5 Etiquetage et enregistrement de l'échantillon de crachats	24
I-6 Matériels de laboratoire	24
I-7 Protocole technique	24
I-7-1 Préparation du frottis d'expectoration pour l'examen direct	24
I-7-2 Préparation du frottis après traitement d'expectoration par l'hypochlorite de sodium (NaOCl).....	26
I-7-3 Coloration de Ziehl-Neelsen à chaud.....	27
I-7-4 Examen microscopique des lames	29
I-7-5 Evaluation de la sensibilité de la méthode à l'hypochlorite de sodium par rapport à la mise en culture	30
II- Résultats	32

II-1 Evolution de la tuberculose pulmonaire dans la wilaya de Guelma	32
II-2 Résultats de l'évolution de la densité bacillaire avec et sans traitement des expectorations par l'hypochlorite de sodium à 5% (NaOCl) dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire	34
II-2-1 Interprétation des résultats de l'examen microscopique.....	35
II-2-2 Résultats de l'évaluation de la sensibilité par la mise en culture sur milieu solide.....	41
II-2-3 Recherche des BKs à partir des crachats salivaires	42
III. Discussion	44
Conclusion	49

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Introduction

*Histoire et
épidémiologie*

*Agent
étiologique*

*Maladie,
diagnostic et
traitement*

*La Partie
pratique*

Résumé

Conclusion

*Références
bibliographi-
ques*

Annexe

Glossaire

Introduction

La tuberculose est une maladie infectieuse très ancienne, due aux bacilles tuberculeux. Elle a constitué pendant longtemps un défi majeur au plan de la santé publique dans le monde entier. Elle se situe en seconde position juste après le VIH/sida. **(Bouizem et Chellali, 2010)**

La stratégie Halte à la tuberculose du Programme National de Lutte contre la Tuberculose (PNLT) vise à assurer le diagnostic par un examen bactériologique de qualité garantie, réduire les sources de contamination par le dépistage des malades contagieux et leur traitement selon un protocole de courte durée sous contrôle direct (DOTS). **(1)**

Le diagnostic bactériologique de la tuberculose (TB) repose dans une large mesure sur l'examen microscopique direct des frottis d'expectoration après coloration selon Ziehl-Neelsen (ZN). Cette méthode est rapide, spécifique, mais le test souffre d'un manque de sensibilité important car la détection n'est fiable qu'à partir de 10 000 bacilles par ml lorsqu'elle est utilisée dans les programmes antituberculeux. **(Ängeby et al., 2004)**

La culture, plus sensible que la bacilloscopie des crachats, utilisée pour confirmer le diagnostic de certaines formes de tuberculose, permet d'identifier précisément l'espèce mycobactérienne en cause. Cependant cette technique est délicate, **(Ilboudo, 2013)** Elle permet de détecter 10 bacilles par ml mais la lenteur de la technique est un réel handicap et nécessite des procédures spéciales de sécurité dans les laboratoires. **(Vincent, 2013)**

On a prétendu que la sensibilité de l'examen microscopique direct des frottis d'expectoration peut être améliorée lorsque l'expectoration est liquéfiée par l'hypochlorite de sodium (NaOCl), habituellement connu dans les ménages sous le nom d'eau de javel, après concentration par centrifugation avant la coloration pour les bacilles acido-résistants.

Ce travail a pour but de déterminer la situation épidémiologique de la tuberculose pulmonaire dans la wilaya de Guelma.

Egalement, nous allons déterminer l'apport réel de la technique de concentration des crachats par la solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) 5% comparée à celui de l'examen microscopique des frottis direct dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire, et recherche des bacilles dans les crachats salivaires, depuis **01/01/2015** jusqu'à **30/04/2015**.

I-1 Définition

La tuberculose est une maladie infectieuse contagieuse et non immunisante à déclaration obligatoire qui s'attaque habituellement aux poumons, mais parfois aussi à d'autres parties du corps, comme les reins, les ganglions et les os, avec des signes cliniques variables. Elle est provoquée par une mycobactérie du complexe *tuberculosis* correspondant à différents germes et principalement à *Mycobacterium tuberculosis* (ou bacille de Koch ou BK).

Autrefois, la tuberculose était souvent mortelle et on lui donnait le nom de « consommation », de nos jours, le traitement par antibiotiques permet d'en guérir. (2)

I-2 Histoire de la maladie

<p>Origine de la maladie :</p>	<p>-Le bacille de la tuberculose a existé il y a 15000 à 20000 ans. On l'a trouvé en reliques d'Egypte antique, d'Inde, et de Chine. Parmi la tuberculose spinale de momies égyptiennes, connue sous le nom de maladie de Pott a été trouvé par des archéologues. (3)</p> <p>-En 2400 Avant J.C : première reconnaissance officielle de l'existence de la tuberculose.</p> <p>-En 460 avant J.-C., Hippocrate identifiait la phtisie (mot grec signifiant « consommation ») comme étant la maladie la plus répandue à cette époque et qu'elle est presque toujours mortelle. (4)</p>
<p>La découverte de la tuberculose :</p>	<p>-En 1546 : Girolamo Tracastoro était le premier à expliquer dans son livre « De Morbis Contagiosis » que la tuberculose était contagieuse et que cette contamination ne se transmettait pas seulement du malade mais aussi à partir des habits et de la literie de ce dernier.</p> <p>-En 1679 : Séylvius de la Boe en Hollande a eu à établir le lien causal entre les symptômes et la maladie.</p> <p>-En 1810 : Carmichael publiait que la tuberculose bovine se transmettait à l'homme par la consommation de la viande ou du lait infecté</p> <p>-En 1865 : Jean Antoine Villemin fournissait les preuves expérimentales de la transmission de la tuberculose entre l'homme et l'animal (bovin, lapin).</p> <p>-En 1882 : Robert Koch qui devait revenir le mérite de la découverte du bacille, Il établissait d'une façon définitive l'étiologie bactérienne de la tuberculose et démontrait que le Bacille spécifique existe dans les crachats de tous les phtisiques et dans toutes les excréments provenant de l'homme et l'animal tuberculeux. Enfin il fournissait la preuve que ce microbe pouvait être décelé facilement là où il existait grâce aux artifices de coloration, Dès lors ce bacille est appelé Bacille de Koch (BK) ou <i>Mycobacterium tuberculosis</i>. Pour Koch, la maladie chez l'homme et l'animal était causée par le même</p>

	<p>organisme.</p> <p>-En1898 : Theobald Smith fit la distinction entre <i>M. bovis</i> et <i>M. tuberculosis</i> sur la base de leurs caractéristiques culturelles in vitro et l'étude de leur virulence. Avec la découverte de l'agent causal, la lutte contre la maladie pouvait réellement commencer. (Prof et al. 2004)</p>
Vaccin pour la tuberculose :	<p>-En 1921 : Mise au point du vaccin contre la tuberculose : le BCG, par A. Calmette et Camille Guérin.</p> <p>- En 1950 : Le BCG est rendu obligatoire. (Fanny, 2013)</p>
Diagnostique de la tuberculose :	<p>-En 1883 : Ziehl et Neelsen mettent au point la coloration du bacille tuberculeux par la fuchsine phéniquée, cette coloration du B.K résiste à la décoloration par l'acide et l'alcool. (Grosset, 1998)</p> <p>-En 1890 : description de l'Intradermo Réaction (IDR) par R. Koch. (Fanny, 2013)</p> <p>-En 1896 : Bouchard décrit les premières applications des rayons X sur l'étude de la tuberculose pulmonaire. (Mathys, 2010)</p> <p>-En 1998 : Le génome complet de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> est séquencé. (Bouizem et Chellali, 2010)</p>
Traitement anti-tuberculeux :	<p>-En 1944 : Le traitement de la tuberculose par les antibiotiques a été effectif grâce aux travaux de Selman A. Waksman qui a purifié la streptomycine à partir du <i>Streptomyces griseus</i>. Cependant cette monothérapie à la streptomycine a rapidement engendrée des mutants résistants ce qui suscitera la mise au point de nouveaux antibiotiques.</p> <p>-En 1949 : Isoniazide.</p> <p>-En 1952 : Pyrazinamide.</p> <p>-En 1954 : Cyclosérine.</p> <p>-En 1955 : Ethambutol.</p> <p>-En 1962 : Rifampine ou Rifampicine. (Prof et al. 2004)</p>

I-3 Epidémiologie de la tuberculose

I-3-1 Au niveau mondial

- La tuberculose est l'une des maladies, dues à un agent infectieux unique, des plus meurtrières au monde ; elle se situe en seconde position juste après le VIH/sida.

- En 2013, 9 millions de personnes ont développé la tuberculose et 1,5 million en sont mortes.
- Plus de 95% des décès par tuberculose se produisent dans les pays à revenu faible et intermédiaire, et la maladie est l'une des cinq principales causes de décès chez les femmes âgées de 15 à 44 ans.
- En 2013, on estime que 550 000 enfants sont tombés malades de la tuberculose et 80 000 enfants séronégatifs pour le VIH sont morts de la tuberculose.
- La tuberculose est une cause majeure de décès chez les personnes vivant avec le VIH et est responsable d'un quart de tous les décès.
- En 2013, près de 480 000 personnes ont développé une tuberculose multi résistante (tuberculose MR). Le nombre de personnes développant la tuberculose chaque année est, selon les estimations, en diminution très lente ce qui signifie que le monde est sur la bonne voie pour atteindre l'objectif du Millénaire pour le développement consistant à inverser la tendance de la maladie d'ici à 2015.
- Le taux de mortalité par tuberculose a chuté de 45% entre 1990 et 2013.
- Près de 37 millions de vies ont été sauvées entre 2000 et 2013 grâce au diagnostic et traitement de la tuberculose. (5)

I-3-2 Au niveau de l'Algérie (Fig. 1)

La tuberculose en Algérie enregistré un recul et une baisse par rapport aux années précédentes, avec 21 000 cas et 190 décès dus à l'infection. Le rapport épidémiologique sur la prévalence de la tuberculose en Algérie, fait état d'une régression consistante dans la propagation des indicateurs épidémiques, arrêtée à 21 000 cas. Selon les résultats du rapport, le taux de tuberculose est dans les régions de l'Ouest de 83,8 pour 100 000 habitants, suivi par les régions centrales de 62,8, et les régions de l'est, atteignant 61,6 par 100 000 habitants.

La surveillance épidémiologique fait ressortir que la tuberculose affecte les femmes à raison de 61% à un taux d'infection par rapport à 3 femmes et 1 homme, et le nombre estimé de victimes à 56 cas par 100 000 habitants, tandis que la tuberculose extra pulmonaire enregistre une hausse de 1,05% par rapport aux années précédentes (6). Sur les 22.153 cas de tuberculose diagnostiqués en 2014, l'incidence était de 57,2% pour toutes les formes confondues de la tuberculose. (7)

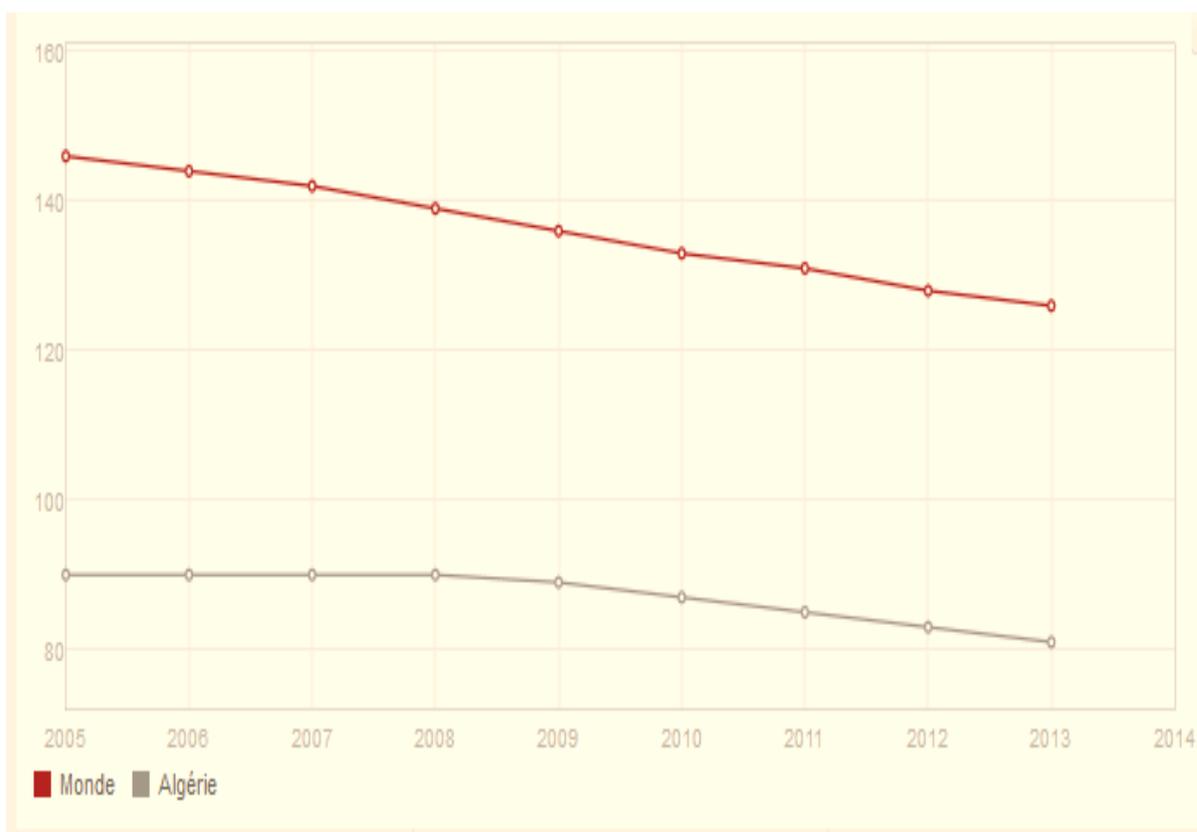


Figure 1 : Incidence de la tuberculose (pour 100 000 personnes). (8)

II-1 Les mycobactéries

Les mycobactéries sont des micro-organismes responsables de maladies chez l'homme et chez les animaux. En bactériologie, on distingue classiquement les *mycobactéries tuberculeuses* responsables de la tuberculose, des mycobactéries non tuberculeuses. (Martin et Denis, 2011)

M. tuberculosis atteint particulièrement les poumons (tuberculose pulmonaire) mais peut aussi atteindre tous les organes (tuberculose extra pulmonaire). (Meyssonnier, 2012)

II-1-1 Taxonomie du genre Mycobactéries

En 1954, Runyon classe les mycobactéries en quatre groupes :

Groupe 1 : Mycobactérie à croissance lente, photo-chromogène.

Groupe 2 : Mycobactérie à croissance lente, Scoto-chromogène.

Groupe 3 : Mycobactérie à croissance lente, non chromogène.

Groupe 4 : Mycobactérie à croissance rapide, pigmentées ou non.

Dans la pratique les mycobactéries sont classées en mycobactérie tuberculeuse (*M. tuberculosis* complexe) et mycobactéries non tuberculeuse. (Gilles, 2000)

Les mycobactéries appartiennent à la famille des *Mycobacteriaceae*, ordre des *Actinomycetales*, classe des *Schizomycètes*. Cette famille contient un seul genre : *Mycobacterium*.

Le genre *Mycobacterium* compte actuellement plus de 100 espèces (Fig. 2). L'espèce type est *Mycobacterium tuberculosis* dont la séquence entière du génome est maintenant complètement décryptée. (Lompo, 2014)

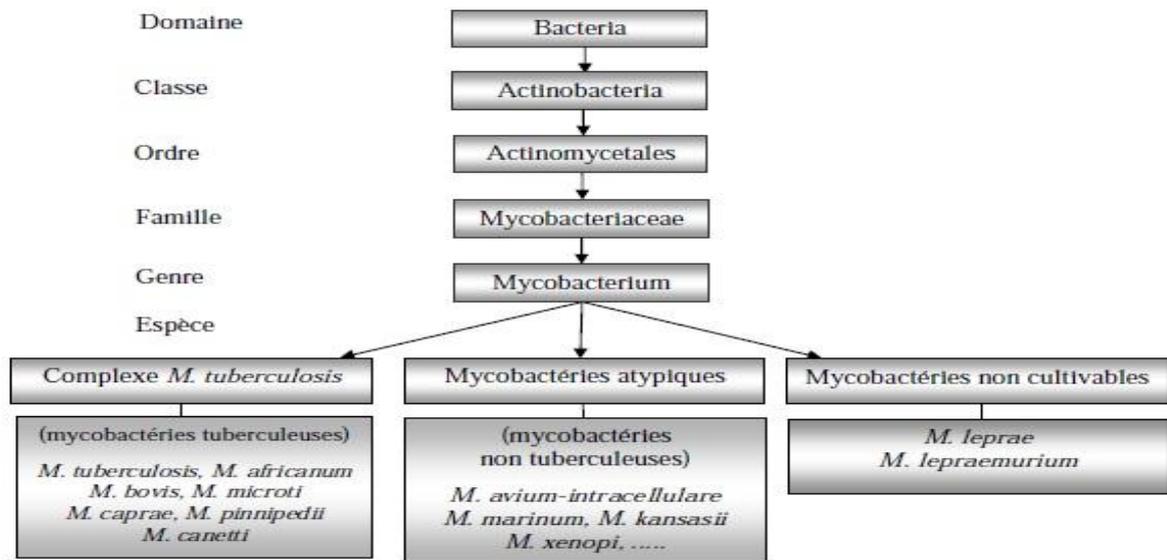


Figure 2 : Taxonomie des mycobactéries. (Mathys, 2010)

II-1-1-1 Les mycobactéries non tuberculeuses

Les mycobactéries non tuberculeuses et non lèpres dites aussi mycobactérie atypique, sont des germes peu pathogènes regroupés en centaine d'espèces et sous espèces. Ces mycobactéries non tuberculeuses ont pour réservoir naturel de l'environnement.

Les principales mycobactéries atypiques pouvant être pathogènes pour l'homme sont : *M. avium*, *M. marinum*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*. (Bertrand, 2009)

II-1-1-2 Mycobactéries des lèpres

M. leprae est l'agent étiologique de la lèpre qui se traduit chez l'homme par une affection cutané-nerveuse. Chez la souris, *M. leprae murium* est responsable de la destruction progressive des extrémités nerveuses et des lésions cutanées importantes. (Lompo, 2014)

II-1-1-3 Les mycobactéries tuberculeuses

Les bacilles tuberculeux ou *Mycobacterium tuberculosis* complexe regroupent les espèces obligatoirement pathogènes pour l'homme :

A/ Mycobactérium Bovis : est le principal agent causal de la TBb. Il peut également infecter d'autres animaux domestiques et sauvages, *M. bovis* est fréquemment identifié comme agent causal de la TB chez l'homme. La contamination se fait par voie aérienne au contact avec les animaux malades ou par absorption de lait de vache contaminé. (Boukary et al., 2011)

B/ Mycobactérium Africanum : désigné comme bacille tuberculeux africain, présente des caractères intermédiaires entre ceux de *M. tuberculosis* et *M. bovis*. C'est un parasite strict de l'homme en Afrique occidentale et centrale. (Bendadda, 2003)

C/ Mycobactérium tuberculosis : est la mycobactérie qui est le plus souvent à l'origine de la tuberculose chez l'être humain, la tuberculose pulmonaire (la plus répandue) est presque toujours due à *M. tuberculosis*. (Barben et al., 2012)

Les principales différences entre ces mycobactéries tuberculeuses sont résumées dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : Les différences des mycobactéries tuberculeuse (Gille et Pierson, 2014)

	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. bovis</i>
Culture (semaines)	2 à 4	5 à 10	6 à 12
Pathogène surtout	Pour l'homme	Pour l'homme	Pour l'homme et bovin
Présence	Partout	En Afrique noir	Partout
Pénétration plutôt	Respiratoire	Respiratoire	Digestive
1^{er} organe cible	Poumon	Poumon	Rein

II-1-2 Caractéristiques des mycobactérium tuberculosis

II-1-2-1 Caractères morphologiques

A/ propriétés tinctoriales

Mycobacterium tuberculosis présente sous la forme d'un fin bâtonnet, de 1 - 10 µm de long et 0,2 - 0,6 µm de large.

Les bacilles tuberculeux sont rectilignes ou légèrement incurvés, aérobies ou micro aérophiles, immobiles, non sporulant. La croissance de *M.tuberculosis* va permettre la formation des éléments bacillaires ou coccoïdes, et particulièrement lente avec un temps de doublement de 12 à 24h. (Desiré, 2013)

B/ particularités structurales

L'enveloppe mycobactérienne est constituée de trois éléments majeurs : la membrane cytoplasmique (assemblage de lipides associés à des protéines pour former une bicouche

lipidique asymétrique) entourée d'une paroi cellulaire riche en lipides et en sucres, elle-même encerclée d'une capsule de polysaccharides de protéines et d'une faible quantité de lipides

(Fig. 3). Ainsi, du cytoplasme vers l'extérieur de la bactérie, on distingue : le peptidoglycane, l'arabinogalactane et les acides mycoliques. (Koumba Yoya, 2010)

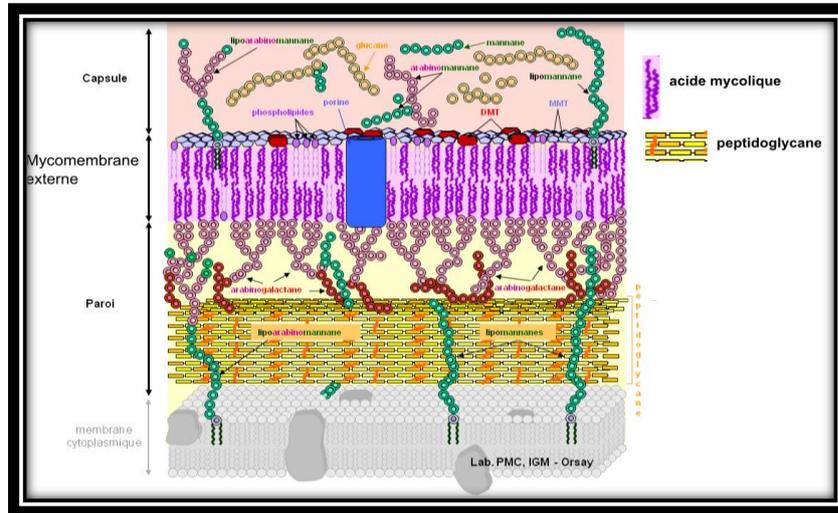


Figure 3 : La paroi cellulaire de *M. tuberculosis*. (9)

II-1-2-2 Caractères physiopathologiques

Ne libérant au cours de sa multiplication aucune substance toxique, la virulence de *M. tuberculosis* est liée à sa capacité de survie et de multiplication à l'intérieur des macrophages de l'organisme hôte. *Mycobacterium tuberculosis* est toujours pathogène et ne se comporte jamais en saprophyte. Il est responsable d'infections pulmonaires et d'infections extrapulmonaires. (Lompo, 2014). La multiplication est la plus intense dans des organes oxygénés comme le pautment, le rein et l'épiphyse osseuse. (Gilles, 2000)

II-1-2-3 Caractères cultureux

Mycobacterium tuberculosis se caractérise par ses exigences de culture et sa lenteur de croissance, il ne pousse pas sur les milieux de culture ordinaire. Seuls ceux qui contiennent du sérum, de la glycérine, de la pomme de terre glycéinée, de l'œuf de l'albumine bovine permettent une culture abondante.

Sur ce milieu, il donne des colonies de teinte crème beige, sèches, à surface rugueuse, en choux-fleurs. Le temps de division de *Mycobacterium tuberculosis* étant de 20 heures en moyenne, les cultures ne seront positives qu'après 3 à 4 semaines d'incubation à 37°C.

Strictement aérobie, la température optimale de croissance est comprise entre 35° à 37°C. Au-dessous de 30°C et au-dessus de 41°C la croissance est totalement inhibée.

Le pH des milieux de culture peut être compris entre 6 et 8, avec optimum légèrement au-dessous de la neutralisation soit entre 6,7 et 6,9. (Nouvel, 2005)

II-1-2-4 Caractères biochimiques

M. tuberculosis est aérobie strict, catalase positive et 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. La positivité de cette épreuve est spécifique de *M. tuberculosis*. (Bactériologie, 2003)

II-1-2-5 Caractères génomiques

Le génome de *M. tuberculosis* souche de référence H37Rv a été séquencé et annoté. Le séquençage du génome montre que le chromosome de *M. tuberculosis* est circulaire et contient 4411529 paires de bases avec un pourcentage en guanine et cytosine d'environ 65,6% et 3924 gènes codant des protéines. (Desiré, 2013)

II-1-2-6 Résistance aux agents physiques et chimiques

A/ Agents physiques

Les mycobactéries sont classées parmi les bactéries pathogènes non sporulées les plus thermorésistantes. Elles sont détruites à la chaleur humide en 30 minutes à 65°C, 10 minutes à 72°C ou 2 minutes à 100°C. Les bacilles tuberculeux sont sensibles à la lumière solaire, aux rayons Ultra-violet (UV) et aux radiations ionisantes. Le sang, le sérum et autres protéines protègent les bacilles contre les rayons UV. Par contre, ils sont moyennement résistants au froid et à la dessiccation.

B/ Agents chimiques

Les mycobactéries sont résistantes à la plupart des désinfectants usuels. Elles résistent aux antiseptiques hydrosolubles (mais sont sensibles aux produits liposolubles, comme alcool, éther). Elles résistent aux enzymes des phagocytes. Cependant, elles sont généralement sensibles aux désinfectants chlorés, iodés, formolés et crésolés. En effet, le bacille tuberculeux peut être détruit par le phénol à 2%, le crésol à 3% pendant 4 heures, alors qu'il est détruit par la teinture d'iode en 5 minutes. (Zida, 2012)

II-1-2-7 Propriétés d'acido-alcool-résistance

Les mycobactéries se distinguent par leur capacité à garder certaines colorations (fuchsine, auramine) même en présence d'agents solubilisant de ces molécules : l'acide et l'alcool.

Une acido-alcool-résistance partielle existe aussi dans un certain nombre de genres capables de synthétiser des acides gras particuliers : les acides mycoliques.

Ces acides mycoliques confèrent aussi aux mycobactéries (*M. tuberculosis*) leur grande résistance à des agents chimiques puissants (détergents antiseptiques, solutions très acides ou très alcalines). (Gilles, 2000)

II-1-2-8 Survie à l'extérieur de l'hôte

L'organisme peut survivre pendant des mois sur des surfaces inertes sèches. Il peut survivre dans des excréments de coquerelle pendant 8 semaines, dans les crachats sur une tapis (19 jours) et sur du bois (plus de 88 jours), dans de la terre humide ou sèche (4 semaines) et dans l'environnement pendant plus de 74 jours s'il est protégé de la lumière. (10)

III-1 Les différents types de la tuberculose

III-1-1 La tuberculose extra-pulmonaire

A partir d'une localisation pulmonaire initiale (primo-infection), *M. tuberculosis* peut essaimer dans l'organisme au cours d'une phase silencieuse (via les systèmes lymphatique et sanguin, créer de nouveaux foyers infectieux et provoquer une tuberculose extra-pulmonaire), en générale au début de l'infection. Une TB évolutive peut donc se développer au niveau de nombreux autre organe en dehors des poumons, en particulier ganglions lymphatiques, méninges, vertèbre, articulation, reins, peau, miliaire, génitaux et cavité abdominale.

Les formes EP peuvent survivre à tous âge. Les jeunes enfants et les patients infectés par le VIH sont plus susceptibles de développer une TBEP.

Ces affections présentent des caractéristiques cliniques variées. Toutefois, leurs caractéristiques communes sont : une évolution s'accompagnant d'une altération de l'état général et l'absence de réponse aux traitements symptomatiques ou anti-infectieux non spécifiques. (Varaine et Rich, 2014)

La Tuberculose miliaire résulte d'une dissémination hémotogène diffuse des mycobactéries, reste l'une des formes les plus graves et de pronostic réservé, même sous traitement adéquat, atteignant non seulement les deux poumons, mais encore tous les principaux viscères. (Zellweger, 2014)

III-1-2 La tuberculose pulmonaire

Désigne tout cas de tuberculose confirmé bactériologiquement ou diagnostiqué cliniquement dans lequel le parenchyme pulmonaire ou l'arbre trachéo-bronchique est touché. (Black et Lim, 2014)

III-1-2 -1 Mode de transmission et développement

La transmission du bacille est interhumaine et s'effectue essentiellement par voie aérienne. La source de l'infection est un patient ayant une TB pulmonaire (TBP) ou laryngée, qui expectore des bacilles. En toussant, en parlant ou en éternuant, le patient produit de fin gouttelettes infectieuses. Elles peuvent rester en suspension dans l'air pendant plusieurs heures, selon l'environnement. La contamination se produit lors de l'inhalation des gouttelettes infectieuse. La lumière solaire, les rayons UV et la ventilation sont des moyens efficaces de décontamination de l'environnement.

La contagiosité d'un patient est liée à la quantité de bacilles présents dans ses crachats. Les patients positifs à l'examen microscopique direct des crachats sont de loin les plus contagieux. Ceux positifs à la culture mais négatifs à l'examen microscopique sont moins contagieux. Les patients dont la microscopie et la culture de crachats sont négatifs ne sont habituellement pas contagieux.

Les patients souffrant de primo-infection ne sont pas contagieux. Les cas de TB extra pulmonaire (TBEP) ne le sont qu'exceptionnellement. En général, les enfants sont moins contagieux que les adultes, probablement parce qu'ils toussent peu, produisent peu de crachats et ont une charge bacillaire plus faible.

On estime qu'un patient atteint de TB à frottis positif non diagnostiquée et non traitée contamine 10 à 20 personnes par an (avec des variations selon le style de vie et l'environnement). (**Varaine et Rich, 2014**)

III-1-2-2 Primo-infections

La primo-infection se produit lors de la première exposition à *M. tuberculosis*. Les gouttelettes (contenant *M. tuberculosis*) sont si fines qu'elles échappent aux défenses du tapis mucociliaire des bronches et se logent dans les alvéoles terminales des poumons. (**Sidhom et al., 2014**)

Les bacilles de Koch peuvent rester latents dans l'organisme pendant des semaines, des années voire des décennies sans provoquer de symptômes, ni de maladie.

En effet, si le système immunitaire de la personne infectée est suffisamment résistant, il empêche que les microbes se réveillent, se multiplient et provoquent la tuberculose maladie. C'est la primo-infection. A ce stade, la personne infectée ne présente aucun symptôme et n'est pas contagieuse. (**11**)

A/ Primo-infection de forme latente

Les seuls symptômes sont les réactions cutanées à la tuberculine qui, de négatives, deviennent positives, traduisant ainsi l'apparition de l'allergie tuberculinique.

Dans la forme latente, un examen clinique ne découvre aucun signe général, physique, biologique, radiologique ou bactériologique. Et ce n'est qu'après une surveillance au moins clinique, aidée au besoin d'examens répétés (radiographiques en particulier) que l'on peut parler de tuberculose latente et s'abstenir de traiter.

B/ Primo-infection de forme patente

En plus des réactions cutanées à la tuberculine, elle s'accompagne des signes et des perturbations souvent discrets.

L'infection tuberculeuse induit des modifications biologiques et des lésions histologiques. Le « chancre d'inoculation » est la lésion qui répond au premier contact de l'organisme avec le BK, à l'inflammation non spécifique succède une infiltration, puis un nodule, pouvant évoluer vers la nécrose caséuse qui, dans le meilleur des cas, s'enkyste et parfois se calcifie sans que le BK puisse essaimer. **(12)**

III-1-2 -3 Tuberculose active

La tuberculose post-primaire peut se déclarer plusieurs années après la primo-infection, par suite de la réactivation d'une infection tuberculeuse latente. Il peut s'agir d'une réaction à un facteur déclencheur, comme un affaiblissement du système immunitaire dû à une infection par le VIH. La réaction immunitaire du malade entraîne une lésion pathologique qui est généralement localisée, s'accompagnant souvent d'une destruction du tissu pulmonaire et de la formation de cavernes.

La tuberculose touche en général les poumons (80-85%), mais peut s'attaquer à n'importe quelle partie de l'organisme. Les caractéristiques de la TBP post-primaire sont une destruction étendue des poumons avec la présence des cavernes, et des cultures et/ou frottis d'expectoration positifs. Cette forme de tuberculose est souvent beaucoup plus contagieuse que la primo-infection tuberculeuse. **(Ben Kheder, 2014)**

Les sujets immunodéprimés, transplantés ou surtout infectés par le VIH ont un risque élevé de développer une tuberculose active. Leurs défenses immunitaires sont incapables de limiter la réactivation des bacilles viables au niveau des lésions de primo-infection. **(Gilles, 2000)**

On définit ainsi les groupes à risque :

- Groupes socio-économiques défavorisés
- Populations étrangères pour lesquelles, à pourcentage comparable, l'incidence tuberculeuse est trois à quatre fois plus forte.
- Anciens tuberculeux de l'ère pré anti biothérapeutique n'ayant pas reçu de chimiothérapie spécifique.

- Personnels soignants très exposés au cours de leurs activités professionnelles au sein d'établissements contaminés.
- Les exclus sociaux (fréquence de l'intoxication tabagique, alcoolique).
- Les sujets séropositifs pour le VIH.
- Les immunodépressions diverses : néoplasie, hémopathie, traitements à base de cortisone, immunodépresseurs, transplantations d'organes.
- Les sujets dialysés chroniques ; et les diabétiques.
- Les toxicomanes et les détenus. (**Bouizem et Chellali, 2010**)

III-2 Diagnostic de la tuberculose pulmonaire

III-2-1 Diagnostic clinique-radiologique

Le diagnostic de tuberculose repose sur des critères bactériologiques (cas confirmés) ou sur des critères cliniques et radiologiques (cas suspects ou non confirmés). Les symptômes et les signes de la tuberculose dépendent de la localisation et de l'extension de la maladie et diffèrent en fonction du stade évolutif.

III-2-1-1 Les signes cliniques

Certains signes de tuberculose pulmonaire sont assez spécifiques : Toux prolonger (plus de 2 semaines et produisant des crachats verts, jaunes ou sanglants), Expectoration et douleur thoracique, Perte de poids, Anorexie, Fatigue, Fièvre modérée, et des sueurs nocturnes.

Le signe le plus caractéristique est l'hémoptysie (présence de sang dans les crachats). (**Varaine et al., 2010**)

III-2-1-2 Radiologie pulmonaire

Permet de mettre en évidence les formes pulmonaires de la maladie. Les anomalies radiologiques peuvent être très variables. On observe en générale la présence d'infiltrats (zones blanches sur la radiographie). (**Fig. 4**)



Figure 4 : Image radiologique de la tuberculose pulmonaire. (13)

III-2-2 Diagnostic bactériologique

III-2-2-1 Différents prélèvements (Forme pulmonaire)

- Expectoration spontanée : en cas de toux productive.
- Tubage gastrique : trois prélèvements trois jours de suite, le matin au réveil, à jeun avant le lever du patient lors d'une hospitalisation.
- Fibroscopie bronchique avec aspiration des sécrétions bronchiques ou du produit du lavage broncho-alvéolaire. (Ripault et al., 2005)

III-2-2-2 Diagnostique direct

A/ Examen microscopique

Depuis plus de 125 ans, l'examen microscopique direct demeure un outil très simple et rapide renseignant sur la présence de BAAR dans les échantillons biologiques. (Guillet et al., 2014).

L'examen microscopique des crachats permet d'identifier de manière rapide et fiable les patients atteints de TB pulmonaire si la charge bacillaire est supérieure à 5000 bacilles/ml de crachat. De plus, il n'est pas possible de distinguer *M. tuberculosis* des mycobactéries non tuberculeuses (MNT) en raison du manque de spécificité de l'examen.

En pratique, les techniques de coloration sont basées sur le caractère acido-alcool-résistant du bacille (BAAR). Les deux méthodes de coloration les plus courantes, sont la coloration de Ziehl-Neelsen et la coloration à l'uramine. (Varaine et Rich, 2014)

a- La coloration de Ziehl-Neelsen (ZN)

La technique d'examen est basée sur le caractère acido-alcool-résistant du bacille (BAAR). Traité par la coloration de Ziehl-Neelsen (ZN), le bacille retient le colorant rouge (fuchsine)

et résiste à la décoloration à l'alcool-acide. La méthode de référence est la méthode de ZN à chaud. Comparée à la culture, cette méthode est spécifique mais peu sensible, en particulier chez les patients Co-infecté par le VIH.

L'examen peut être quantifié en utilisant une classification basée sur le nombre de BK identifiés par champ. (Varaine et al., 2010)

b- La coloration à l'Uramine

La coloration à l'uramine a l'avantage de permettre une lecture plus rapide de la lame. Elle est recommandée dans les laboratoires dont l'activité est importante. Cette technique doit être réalisée par des techniciens et expérimentés. Elle nécessite un microscope à fluorescence (à ultraviolet). (Varaine et Rich, 2014)

c- Techniques fluidification-concentration

Au cours de la dernière décennie, de nombreux chercheurs ont suggéré qu'il est possible d'améliorer significativement les performances de l'examen microscopique des frottis d'expectoration si l'expectoration est liquéfiée avec l'un ou l'autre réactif chimique et ultérieurement concentrée par centrifugation ou sédimentation avant la coloration pour la recherche des bacilles acido-résistants.

Le procédé le plus largement étudié est la liquéfaction de l'expectoration par l'hypochlorite de sodium (NaOCl) habituellement connu dans les ménages sous le nom d'eau de Javel. (Ängeby et al., 2000)

B/ Amplification génique

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. (Ait-Khaled et Donald, 1999)

C/ Culture

a- Culture en milieux solide

La culture sur le milieu solide de Löwenstein-Jensen est la méthode de référence permettant de confirmer le diagnostic de tuberculose si l'examen microscopique directe est négatif. Elle permet également de déterminer la sensibilité aux antituberculeux et de différencier *mycobacterium tuberculosis* et mycobactéries atypiques. Mais l'isolement des BAAR en culture, quel que soit le prélèvement (liquide biologique, expectoration) est longue : elle peut prendre 3 à 6 semaines pour devenir positive. Les colonies sont d'abord plates et transparentes, puis bombées, le diamètre ne dépasse pas 1mm. (Zellweger, 2014)

b- Culture en milieux liquide

Le recours aux milieux liquides permet une détection plus rapide de la croissance des mycobactéries, et donc un diagnostic plus rapide. Selon les systèmes, la détection de la croissance des mycobactéries repose soit sur la consommation d'oxygène, soit sur le dégagement de CO₂. Le délai de détection des mycobactéries est alors de 8 à 30 jours, en général entre 2 et 3 semaines. La lecture se fait grâce à des techniques de fluorescence (Tubes MGIT, système Bactec) ou de colorimétrie (système MB Redox, Bact/Alert).

Lorsque la culture apparaît positive, il convient de vérifier qu'il s'agit de mycobactéries par l'examen d'un frottis coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen. Par ailleurs, selon la législation, une culture sur milieu solide effectuée en parallèle est obligatoire. (Deschaseaux, 2005)

III-2-2-3 Diagnostic indirect

A/ L'intradermo réaction à la tuberculine (IDR)

La réaction cutanée à la tuberculine est l'expression d'un phénomène d'hypersensibilité retarder vis-à-vis de certains antigènes de *M. tuberculosis*.

Une réaction positive chez un individu indique qu'il a été infecté mais ne permet pas de déterminer si l'infection est latente ou évolutive. de plus, il est impossible de déterminer si la réaction est dus à *M. tuberculosis* ou à une autre mycobactérie.

L'IDR est réalisée en injectant 5 unités internationales de tuberculine par voie intradermique stricte, à la face palmaire (interne) de l'avant-bras. (Fig. 5)

La lecture s'effectue 48 à 72 h après l'injection. Elle doit être effectuée par un personnel de santé formé. La réaction est la zone l'induration (perception d'un œdème à la palpation) autour du point d'injection. Le diamètre de l'induration est mesuré transversalement à l'aide

d'une règle. Ne pas mesurer la zone érythémateuse (rouge) autour de l'induration, car celle-ci ne constitue pas la réaction mais uniquement la zone indurée.

La tuberculine utilisée pour le test cutané est également connue sous le nom de dérivé protéique purifié (DPP). L'IDR est parfois appelée test tuberculique ou test de Mantoux. (Varaine et Rich, 2014)

La positivité de l'IDR témoigne d'un contact avec le bacille tuberculeux ou une vaccination par le BCG.

Une réaction est jugée négative lorsque le diamètre d'induration est < 5 mm, et positive lorsque le diamètre d'induration est ≥ 5 mm. (Antoine et Che, 2013)



Figure 5 : Intradermo réaction à la tuberculine. (14)

B/ Test de libération de l'interféron gamma (TLI)

Ces tests *in vitro* de l'immunité cellulaire détectent l'interféron. Les personnes exposées une fois au complexe *M. tuberculosis* ont dans le sang des lymphocytes qui maintiennent la mémoire de l'antigène d'amorçage de la TB. L'addition *in vitro* de l'antigène de la TB au sang entraîne la stimulation rapide des lymphocytes T (mémoire) et la libération de l'interféron gamma, qui est un marqueur spécifique de l'activation de la réponse immunitaire.

Il n'y a pas, avec les TLI, de réaction croisée avec le BCG et la plupart des mycobactéries environnementales. Toutefois, ces tests offrent dans l'ensemble peu d'avantages sur l'IDR et peuvent être moins sensibles chez les patients Co-infectés par le VIH. (Varaine et Rich, 2014)

C/ Test de sensibilité aux médicaments

La détermination de la sensibilité des souches aux antituberculeux majeurs nécessite qu'un antibiogramme soit systématiquement entrepris dès l'isolement et l'identification de la souche. **(Deschaseaux, 2005)**

Il consiste en l'observation de la croissance mycobactérienne sur milieu de Löwenstein-Jensen (milieu à l'œuf) contenant différentes concentrations d'antibiotiques testés. Ce test est long, étant donné la lenteur de croissance de *M. tuberculosis*. Pour obtenir l'antibiogramme, il faut compter environ 4 semaines après l'identification de la bactérie. Ce délai peut être réduit de moitié par la réalisation de l'antibiogramme en milieu liquide du type BACTEC. **(Desiré, 2013)**

L'antibiogramme s'effectue selon la méthode des proportions et consiste à détecter le pourcentage de mutants résistants dans la population de bacilles isolés chez le patient par comparaison à une culture témoin sans antibiotique. Les cinq antituberculeux majeurs seront toujours testés : Isoniazide, Rifampicine, Ethambutol, Streptomycine et Pyrazinamide.

III-2-2-4 Méthodes de biologie moléculaire

Actuellement, les techniques biochimiques tendent à être remplacées par des techniques de biologie moléculaire pour permettre un diagnostic d'espèce rapide. Les nouveaux kits de biologie moléculaire permettent à partir de la culture d'identifier les principales espèces mycobactériennes tel :

- **Le test Accuprobe de GenProbe**

Permet à partir d'une colonie l'identification des *mycobactéries du complexe tuberculosis*. Les mycobactéries renferment de l'ARN ribosomal qui est détecté par hybridation avec des sondes spécifiques d'ADN monocaténaire. Cette technique rapide, réalisable en 2 heures, constitue un bon test du dépistage pour différencier les mycobactéries tuberculeuses des mycobactéries atypiques.

- **Le test Geno Type MTBC**

Est un test génétique de différenciation du complexe *tuberculosis* à partir de la culture, il permet en 4 heures l'identification de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*. Cette méthode comprend une extraction de l'ADN suivie d'une amplification par PCR et d'une hybridation avec des sondes spécifiques. Sa sensibilité est un peu supérieure à celle du test Accuprobe. **(Deschaseaux, 2005)**

III-3 Le traitement

Le traitement de la tuberculose est basé sur l'application d'une chimiothérapie basée sur l'association de plusieurs antibiotiques antituberculeux. La durée de cette chimiothérapie a considérablement diminué depuis 1960 ; initialement de 18 à 24 mois, elle est actuellement de 6 à 8 mois et constitue « la chimiothérapie de courte durée ». Les médicaments antituberculeux essentiels sont au nombre de cinq : Isoniazide, Rifampicine, Pyrazinamide, Streptomycine, Ethambutol. Le thioacétazone est classé dans la liste complémentaire des médicaments essentiels.

Aucun d'entre eux n'est suffisamment efficace pour détruire tous les bacilles tuberculeux se trouvant chez un malade ; c'est pourquoi l'association de plusieurs médicaments antituberculeux est indispensable pour obtenir la guérison définitive d'un malade. **(Ait-Khaled et Donald, 1999)**

III-3-1 Traitement de la tuberculose latente

Lorsqu'une tuberculose latente (primo-infection) est mise en évidence chez un patient, un traitement prophylactique peut être proposé. Cette décision de chimio-prophylaxie est une mesure individuelle qui doit viser tout particulièrement les jeunes enfants, les adolescents, les sujets immunodéprimés, et les individus ressèment contaminées.

Le traitement prophylactique classiquement recommandé est l'isoniazide en monothérapie, à la dose de 5 mg/kg par jour pendant 6 mois. Ce traitement permet, chez l'immunocompétent, de réduire l'incidence de la tuberculose-maladie de 50 à 65 %.

Parfois, une bithérapie (isoniazide et rifampicine ou rifampicine et pyrazinamide) est prescrite pendant 3 mois.

L'administration d'un traitement prophylactique ne peut se faire qu'après avoir vérifié l'absence d'une maladie tuberculeuse par radiographie pulmonaire et examen bactériologique. En effet, si un patient atteint de maladie tuberculeuse est traité par monothérapie, le risque de sélectionner un mutant résistant sera élevé. **(Mathys, 2010)**

III-3-2 Traitement de la tuberculose active

Le schéma de traitement est identique quelle que soit la forme de tuberculose : (2(RHZE)/4(RH)). Cette codification internationale signifie qu'il existe une première phase de deux (2) mois avec quatre antituberculeux RHZE, suivie d'une deuxième phase de quatre (4) mois avec deux antituberculeux RH. L'hospitalisation est nécessaire si l'état général du

patient est altéré ou en cas de complications. Doivent bénéficier du régime de deuxième ligne ou de retraitement les patients classés comme rechute, échec ou reprise de traitement.

Ces patients étant fortement suspectés de porter des bacilles résistants, le régime associe cinq (5) antituberculeux pendant deux (2) mois puis quatre (4) antituberculeux (sans la Streptomycine) pendant un (1) mois et pendant cinq (5) mois la Rifampicine, l'Isoniazide et l'Ethambutol, toujours sous supervision.(**Desiré, 2013**)

Objectif

L'objectif de ce travail est de faire le point sur l'efficacité et les potentialités pour l'amélioration de l'identification des bacilles avant et après traitement des expectorations par l'hypochlorite de sodium à 5% (NaOCl) dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire.

I- Matériel et méthodes

I-1 Méthodologie

Comparaison de la méthode directe et de la méthode à l'hypochlorite de sodium lors des recherches de BAAR.

I-2 Cadre d'étude

L'étude pratique a été effectuée au laboratoire de l'unité contre la tuberculose et les maladies respiratoires UCTMR, ex DAT, de la wilaya de Guelma, c'est une étude transversale descriptive pendant 4 mois (de Janvier à Avril 2015).

I-3 Population étudiée

Tous les patients pour lesquels une recherche de BAAR dans les crachats est prescrite (dépistage ou contrôle en cours de traitement) sont inclus.

Lorsque des prélèvements séquentiels sont réalisés, chaque échantillon est inclus individuellement dans l'analyse comparative.

I-4 Recueil et conservation des crachats

Elle consiste à :

- ✓ mettre le malade en confiance et lui expliquer le motif de l'examen. Il est absolument indispensable d'expliquer au malade la manière de ramener l'expectoration du plus profond possible des bronches, en lui montrant comment tousser.
- ✓ remettre un crachoir au malade et lui montrer comment il doit recueillir les crachats le lendemain matin et le ramener au laboratoire.
- ✓ vérifier que le crachoir est bien fermé dès réception.
- ✓ les crachats sont recueillis en plein air, le plus loin possible d'autres personnes. Si les conditions le permettent, une salle isolée, bien aérée et bien ventilée pourrait être utilisée.
- ✓ contrôler la qualité et la quantité des crachats (2 à 5 ml de volume contenant des particules solides).

- ✓ les crachoirs sont gardés dans un endroit aussi frais que possible. S'il est prévu de faire des cultures à partir de ces échantillons, ils doivent être conservés au réfrigérateur à +4°C.
- ✓ trois échantillons de crachats (soit une série) sont demandés au malade à chaque fois qu'un cas de tuberculose est suspecté.

I-5 Etiquetage et enregistrement de l'échantillon de crachats

L'étiquette doit porter le nom et prénom du malade et le numéro du dossier. Elle doit être collée sur le corps et jamais sur le couvercle du crachoir. Les fiches de renseignements de chaque prélèvement sont mises dans une enveloppe à part.

Il consiste à mentionner dans le registre du laboratoire, les renseignements demandés : N° d'ordre, date, nom et prénom(s) du malade, sexe, âge, adresse, nom de l'unité de soins, motif de l'examen, résultats de l'échantillon. Ces informations (excepté le N° d'ordre) figurent sur le bulletin du malade qui doit accompagner l'échantillon au laboratoire.

I-6 Matériel de laboratoire

Il est composé de :

- **Pour la microscopie** : un microscope binoculaire, des réactifs et des consommables (alcool, acide sulfurique, fuchsine, bleu de méthylène, hypochlorite de sodium 5% (NaOCl), filtres, lames, porte-lames, anse de platine, bec bunsen, tubes conique, et porte-tubes).
- **Pour la culture** : milieu usuel (Löwenstein-Jensen), bleu de méthylène, soude NaOH, acide sulfurique, écouvillon, vortex, et centrifugeuse.

I-7 Protocole technique

Au laboratoire, les produits d'expectoration sont classés en fonction de leur aspect macroscopique. Les crachats salivaires ne sont pas éliminés et les crachats hémoptoïques sont éliminés d'emblée et font l'objet d'une demande de nouveau prélèvement car ils ne permettent pas en général une bonne mise en évidence des BAAR.

I-7-1 Préparation du frottis d'expectoration pour l'examen direct

• 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.

• Préparation des frottis (Fig. 6 et 7)

- ✓ 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.
- ✓ 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.
- ✓ Passer l'anse métallique à la flamme en le portant au rouge et la laisser refroidir.
- ✓ Prélever une parcelle de crachat en choisissant si possible une parcelle purulente.
- ✓ L'étaler par un mouvement continu de rotation, sur une longueur de 2 cm et une largeur de 1 cm en commençant par le milieu de la lame. Le frottis doit être mince et régulier.
- ✓ Placer la lame sur le porte- lames, frottis tourné vers le haut et laisser sécher à l'air ambiant.
- ✓ Flamber l'anse métallique pour la stériliser avant de prendre un autre crachoir.
- ✓ Préparer les autres lames de la même façon.



Figure 6 : Prélèvement avec l'anse une parcelle du crachat purulent.



Figure 7 : Etalement de la parcelle purulente sur la lame.

• Fixation du frottis (Fig. 8)

- ✓ S'assurer que le frottis est bien sec.
- ✓ Prendre avec une pince chaque lame par sa partie gravée, frottis tourné vers le haut.
- ✓ Passer la lame 3 fois (en 3 à 5 secondes) à travers la flamme du bec bunsen.



Figure 8 : Fixation du frottis.

Le frottis est ensuite coloré par la coloration de **Ziehl-Neelsen à chaud**.

I-7-2 Préparation du frottis après traitement d'expectoration par l'hypochlorite de sodium (NaOCl)

Le reste de l'échantillon (expectoration) est concentré par l'hypochlorite de sodium à 5% (NaOCl).

- ✓ L'expectoration est mélangée avec une quantité égale de NaOCl à environ 5% dans le flacon de prélèvement.
- ✓ Le mélange est homogénéisé par agitation pendant 30 secondes.
- ✓ Incubation 15 minutes à température ambiante ensuite transvaser dans un tube conique (15ml) à usage unique.
- ✓ Après une sédimentation pendant une nuit (18heurs) à température ambiante (**Fig. 9**) une suspension du culot est étalée sur lame, séchée, et colorée comme décrit dans la méthode directe. (**Ongkhammy et al., 2009**)

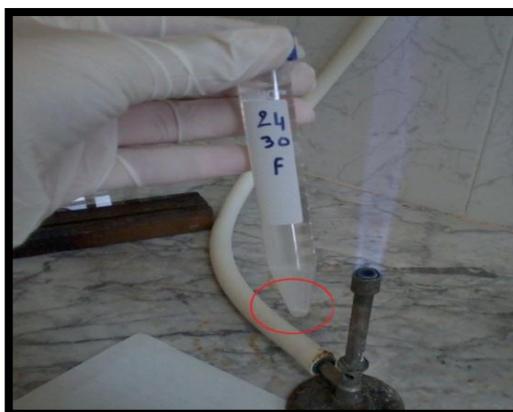


Figure 9 : Culot après sédimentation 18h.

I-7-3 Coloration de Ziehl-Neelsen à chaud

1er étape : Coloration par la fuchsine (Fig. 10)

- ✓ Placer la lame fixée sur la barre métallique au-dessus de l'évier, le frottis tourné vers le haut.
- ✓ Recouvrir le frottis de la solution de la fuchsine phéniquée filtrée.
- ✓ Chauffer doucement la face inférieure de la lame jusqu'à émission de vapeurs, au moyen de la flamme d'un coton monté sur une tige métallique trempé dans l'alcool et flambé.
- ✓ Laisser agir 10 minutes tout en répétant le chauffage de la lame 2 fois toutes les 3 minutes. Eviter l'ébullition et le dessèchement du colorant. Si nécessaire, ajouter de la fuchsine pour que la lame soit toujours recouverte.
- ✓ Rejeter le colorant. Laver immédiatement à l'eau ordinaire, autant que possible à l'aide d'un flacon et non sous le jet du robinet qui pourrait détacher le frottis.

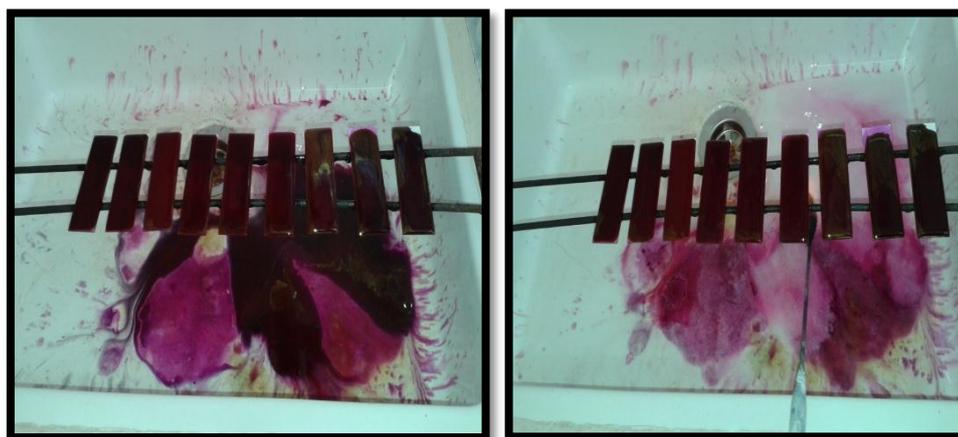


Figure 10 : Coloration de Ziehl-Neelsen à chaud.

2ème étape : Décoloration par la solution d'alcool-acide (Fig. 11)

- ✓ Rejeter l'eau qui couvre la lame.
- ✓ Recouvrir d'acide sulfurique dilué au $\frac{1}{4}$ et laisser agir pendant 3mn.
- ✓ Laver à l'eau courante. Recouvrir d'alcool à 90° et laisser agir pendant 5mn, puis laver.
- ✓ Le frottis est alors incolore ou légèrement teinté en rose.



Figure 11 : Décoloration par l'acide sulfurique dilué au $\frac{1}{4}$ et l'alcool 90%.

3^{ème} étape : contre coloration au bleu de méthylène (Fig. 12 et 13)

- ✓ Recouvrir les frottis de la solution de bleu de méthylène et laisser agir pendant 3mn.

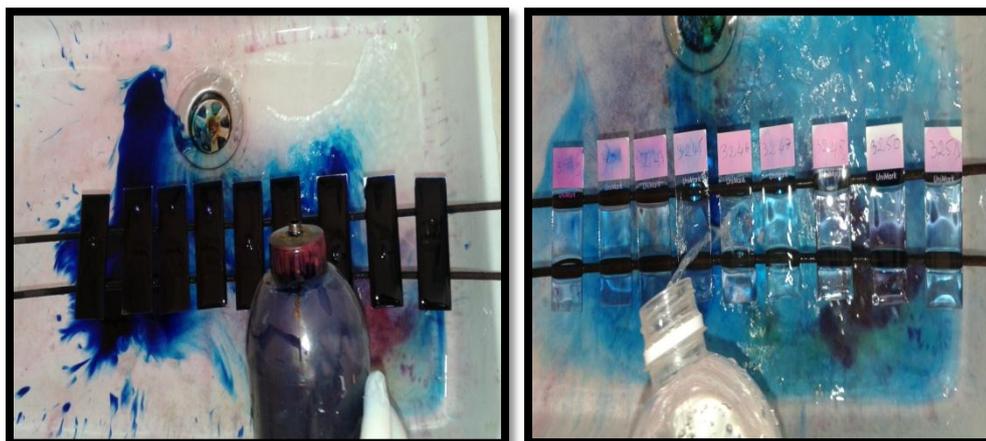


Figure 12 : Contre coloration par la solution de bleu de méthylène.

- ✓ Rejeter le bleu de méthylène et rincer à l'eau ordinaire.
- ✓ Sécher le frottis à l'air ambiant (sur un râtelier) avant de commencer l'examen au microscope. (Lompo, 2014)



Figure 13 : Frottis d'expectoration après coloration de Ziehl-Neelsen à chaud.

I-7-4 Examen microscopique des lames

- ✓ Essuyer les parties optiques (objectifs, oculaires, condenseur) du microscope avec une compresse propre.
- ✓ Allumer le microscope.
- ✓ Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et placer la lame sur la platine, le condenseur étant relevé le plus possible.
- ✓ Faire la mise au point à l'objectif 100 et lire systématiquement champ par champ en allant de la périphérie vers le centre du frottis, en commençant par son coin supérieur gauche (lecture en créneau) (**Fig. 14**)

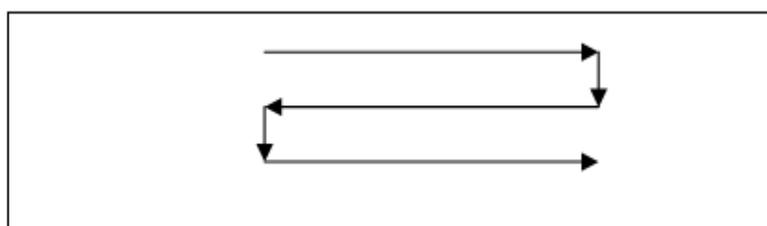


Figure 14 : Schémas de la procédure de lecture.

- ✓ Compter tous les BAAR sur 20 à 300 champs microscopiques selon la richesse du frottis puis noter le nombre sur le cahier de paillasse à côté du N° d'enregistrement de l'échantillon de crachats. Les lames lues doivent être dégraissées au xylène pendant 5 mn. (**P. N. T., 2008**)

I-7-5 Evaluation de la sensibilité de la méthode à l'hypochlorite de sodium par rapport à la mise en culture

Dans notre étude nous avons essayé d'évaluer la sensibilité de la méthode à l'hypochlorite de sodium (NaOCl) en le comparant avec une méthode de référence (gold standard) à savoir la culture.

- **Mise en culture par la Méthode de Petroff à la soude avec neutralisation**
 - ✓ Placer 2 ml d'expectoration dans un tube à centrifuger stérile, bouché à vis.
 - ✓ Ajouter 2 ml de NaOH à 4% et 3 gouttes de solution à 0,2% de bleu de méthylène.
 - ✓ Agiter pendant 15 minutes sur agitateur de vortex.
 - ✓ Porter 30 minutes à l'étuve à 37°C.
 - ✓ Neutraliser jusqu'à virage au vert avec quelques gouttes de SO₄H₂ à 15 %.
 - ✓ Centrifuger à 3000 tours minute pendant 15 minutes puis récupérer le culot. (**Fig. 15**)
 - ✓ Ensemencer le culot dans un tube de Löwenstein-Jensen.



Figure 15 : Centrifugation et ensemencement du culot dans un tube de Löwenstein-Jensen.

- ✓ Porter à l'étuve à 37°C, bouchon à vis incomplètement serré, pour laisser évaporer la partie liquide. Après 48 heures, vérifier l'évaporation puis fermer complètement les tubes.
- ✓ Examiner les tubes de culture une fois par semaine. Les colonies commencent à apparaître après 18 à 21 jours d'incubation, parfois plus tard.

- ✓ Si la culture est positive, la réponse est donnée après la lecture du 28^{ème} jour en notant le nombre de colonies par tube.
- ✓ Les cultures négatives au 28^{ème} jour seront remises à l'étuve et réexaminées tous les 15 jours et ceci jusqu'au 72^{ème} jour. (**Boulhabal et al., 2007**)

II- Résultats

Notre objectif principal étant l'évaluation de la densité bacillaire avec et sans traitement des expectorations par l'hypochlorite de sodium à 5% (NaOCl) dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire. Nous avons jugé utile d'exposer d'abord la situation épidémiologique de la TPM+ dans la région de Guelma.

II-1 Evolution de la tuberculose pulmonaire dans la wilaya de Guelma

Il s'agit d'une enquête rétrospective de type descriptive qui va porter uniquement sur les personnes domiciliées dans la wilaya de Guelma ayant présenté une tuberculose pulmonaire à microscopie positive, mentionnées sur le registre de *l'unité contre la tuberculose et les maladies respiratoires UCTMR* du début de l'année 2008 à la fin de l'année 2014. (**Tab.2, Fig. 16 et 17**)

Tableau 2 : Situation épidémiologique annuelle de tuberculose pulmonaire dans la Wilaya de Guelma à partir de l'année 2008 jusqu'à l'année 2014.

	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
TP	180	140	156	117	119	95	119
TPM+	159	122	136	98	100	74	89
TPM-	21	18	20	19	19	21	30

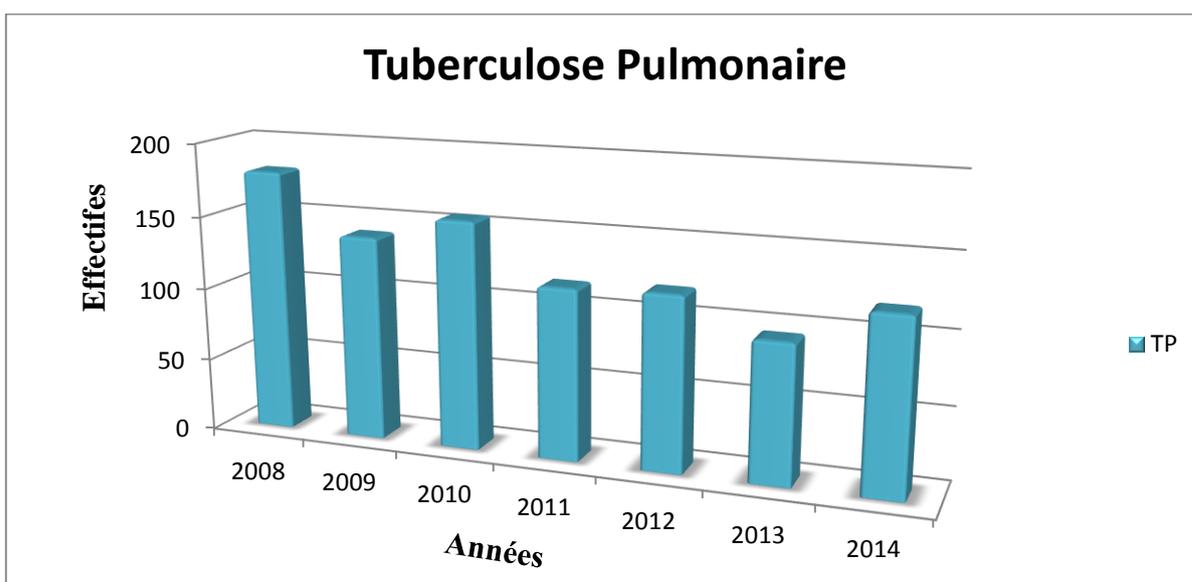


Figure 16 : Evolution de la tuberculose pulmonaire dans la Wilaya de Guelma entre 2008 et 2014.

Les données statistiques annuelles des 7 dernières années montrent une nette diminution de l'incidence de la tuberculose pulmonaire dans la wilaya de Guelma avec des variations annuelles légères.

Dans tous les cas, les crachats des personnes suspectées d'une tuberculose pulmonaire doivent être analysés par un examen microscopique direct.

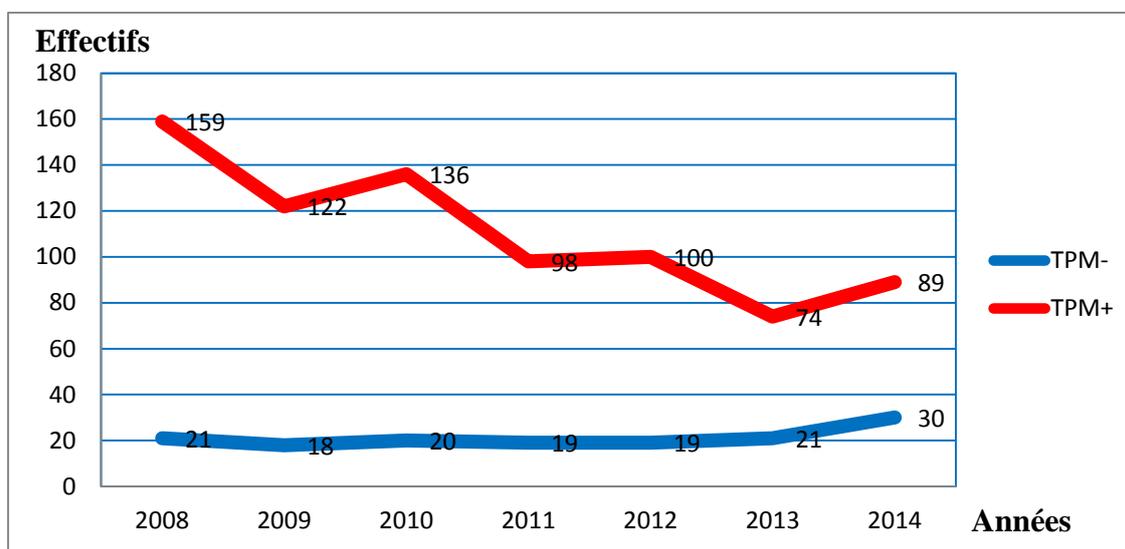


Figure 17 : Evolution de la tuberculose pulmonaire à microscopie positive et négative dans la Wilaya de Guelma de 2008 à 2014.

La proportion des cas de tuberculose pulmonaire à frottis positifs depuis l'année 2008 jusqu'au 2014 présente une diminution continue, le chiffre est passé de 159 cas obtenus en 2008 à 89 cas détectés en 2014.

Cependant, les cas de tuberculose à frottis négatif ou présumé négatif (positif non détecté) sont en augmentation progressive comme la montre figure 17.

II-2 Résultats de l'évaluation de la densité bacillaire avec et sans traitement des expectorations par l'hypochlorite de sodium à 5% (NaOCl) dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire

- **Population étudiée**

Au total, 636 échantillons de crachats recrutés chez 324 patients, ont été analysés, soit une moyenne de 2 échantillons par patient. (**Tab. 3**)

Tableau 3 : Origine des échantillons de crachat

	Patients N= 324		Echantillons N=636	
	N	%	N	%
Sexe				
Masculin	169	52.16%	336	52.83%
Féminin	155	47.83%	300	47.16%
Tranche d'âge (années)				
<10 ans	3	0.92%	6	0.94%
10–19	27	8.33%	44	6.91%
20–29	55	16.97%	108	16.98%
30–39	45	13.88%	83	13.05%
40–49	36	11.11%	89	13.99%
50–59	57	17.59%	125	19.65%
60–69	37	11.41%	70	11.00%
≥70	64	19.75%	110	17.45%
Motif médical				
Dépistage	286	88.27%	557	87.58%
Contrôle après traitement	38	11.72%	79	12.42%

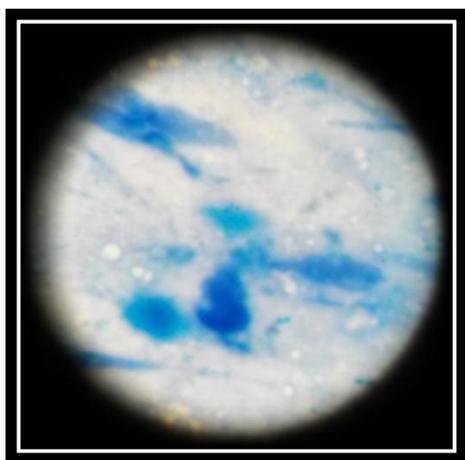
Notre étude a porté sur une proportion masculine de 52%, et féminine de 48%. La tranche d'âge <10 ans est la moins représentée par cette étude avec 0.92%, par contre la tranche d'âge ≥ 70 ans est la plus concernée par cette étude avec 19.75%.

Le motif médical pour le dépistage de la TB pulmonaire représente 88.27% et pour le contrôle après traitement 11.72%.

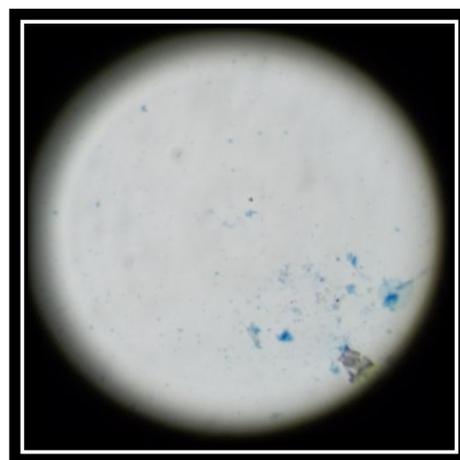
II-2-1 Interprétation des résultats de l'examen microscopique

- **Résultats qualitatifs**

L'examen microscopique est effectué pendant 20 minutes au minimum par frottis (300 champs) (**Fig. 18, 19 et 20**). De manière comparative des champs et de leur contenu au microscope pendant la lecture nous remarquons que :



Directe (-)



NaOCl (-)

Figure 18 : Comparaison des frottis négatifs obtenus par méthode directe simple et par méthode à l'hypochlorite de sodium.

Le champ sur la lame préparée selon la méthode directe simple est très dense et contient beaucoup d'impuretés, cependant le champ sur la lame dont l'échantillon est traité par l'hypochlorite de sodium semble d'une transparence parfaite.

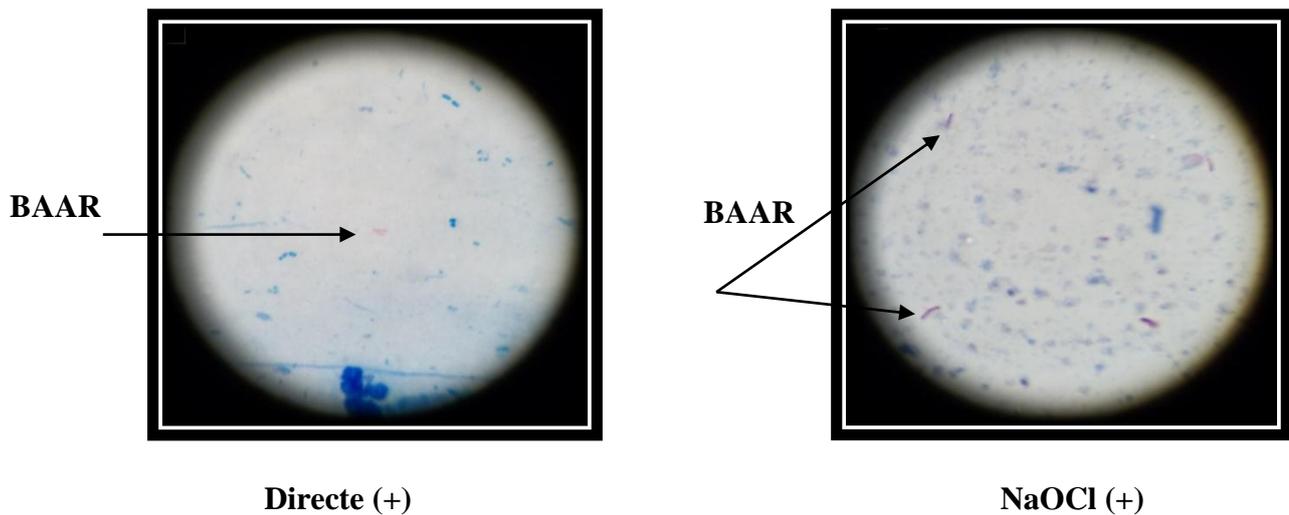


Figure 19 : Comparaison des frottis positif obtenus par méthode directe simple et par méthode à l'hypochlorite de sodium.

Pour les champs des frottis (+) dont l'échantillon préparés par la méthode directe simple, reste toujours dense et le BK est à peine visible, cependant pour le même échantillon mais traité à l'hypochlorite de sodium le champ est d'une transparence meilleure et le BK est nettement visible.

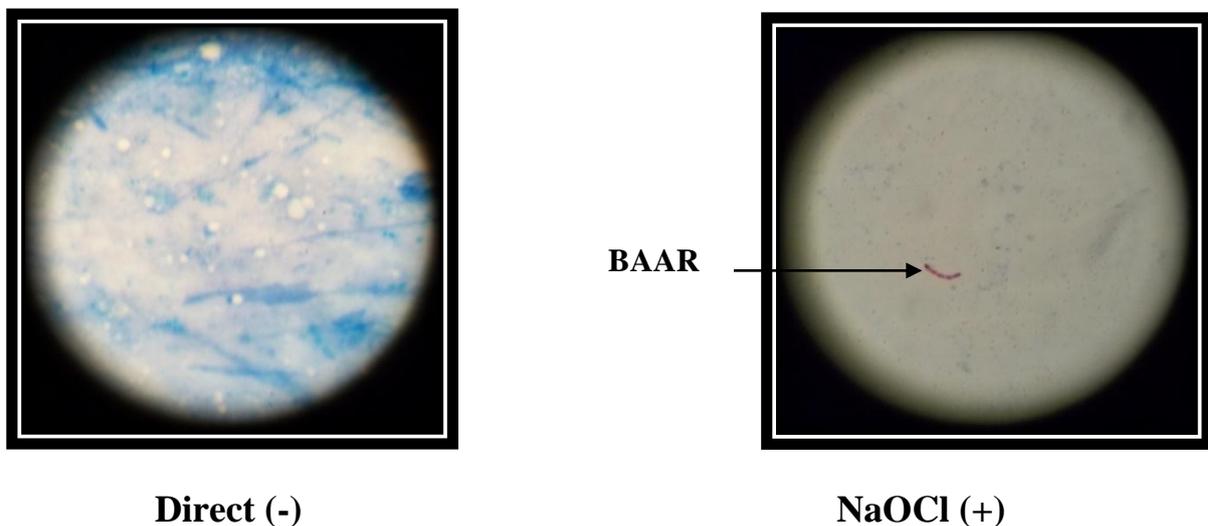


Figure 20 : Frottis déclaré négatif selon la méthode directe simple et réajustée positif par la méthode à l'hypochlorite de sodium 5% (NaOCl).

Cette figure montre bien l'absence des BK sur la lame préparé par la méthode directe porté alors qu'une préparation par l'hypochlorite de sodium montre bien une présence de BAAR.

- **Résultats quantitatifs**

La comparaison des résultats de la méthode directe et la méthode à l'hypochlorite de sodium 5% (NaOCl), pour la recherche des BAAR. (**Tab. 4**)

Tableau 4 : Répartition du taux d'incidence de la tuberculose pulmonaire à microscopie positive/négative.

	MD +	MH +	MD -	MH -	MD +	MH -	MD -	MH +	MD S	MH -	MD S	MH +	Totale
Effectifs	37	432	0	94	58	15	636						
Fréquences	5.82%	67.92%	0 %	14.78%	9.12%	2.36%	100 %						

MD : méthode directe, **MH** : méthode à l'hypochlorite de sodium.

Après application des deux méthodes, 432 frottis sont négatifs (soit 67.92%) et 37 sont positifs (soit 5.82%).

Par contre 94 frottis (soit 14.78%) sont positifs par la méthode à l'hypochlorite de sodium, alors qu'ils ont donné un résultat négatif par la méthode directe simple.

Plus encore, aucun frottis n'a donné un résultat négatif par la méthode à l'hypochlorite de sodium et positif par la méthode directe simple.

Nous avons constaté durant la réalisation de ce travail, qu'un nombre non négligeable d'échantillons réceptionnés ne présente pas les caractéristiques d'un crachat, il s'agit souvent de salives, vu ce nombre, notre curiosité nous a poussé à analyser ces échantillons de salive par la méthode à l'hypochlorite de sodium car selon (le manuel de la lutte antituberculeuse à l'usage des personnels médicaux) il n'est pas recommandé d'analyser ce type d'échantillon. Les résultats du **tableau 4** montrent 15 frottis positifs (soit 2.36%).

- Le **tableau 5** et la **figure 21** montrent les résultats obtenus en fonction de la densité bacillaire de tous les frottis (563 échantillons), préparés par la méthode directe simple et par la méthode à l'hypochlorite de sodium à 5% (NaOCl).

Tableau 5 : Comparaison des résultats de la microscopie avec et sans traitement des expectorations à l'hypochlorite de sodium à 5 %.

		Méthode direct (examen 1)					Total
		Négatif	+/-	+	++	+++	
Méthode à l'eau de Javel (examen2)	Négatif	370	0	0	0	0	370
	+/-	37	25	0	0	0	62
	+	61	25	15	0	0	101
	++	2	5	11	2	0	20
	+++	0	1	2	4	3	10
	Total	470	56	28	6	3	563

Frottis Négatif = pas de BAAR sur au moins 100 champs.

Frottis suspect (+/-) = 1 à 9 BAAR sur 100 champs.

Frottis positif (+) = 10 à 99 BAAR sur 100 champs.

Frottis riche (++) = 1 à 10 BAAR sur au moins 50 champs.

Frottis très riche (+++) = >10 BAAR par champs sur au moins 20 champs.

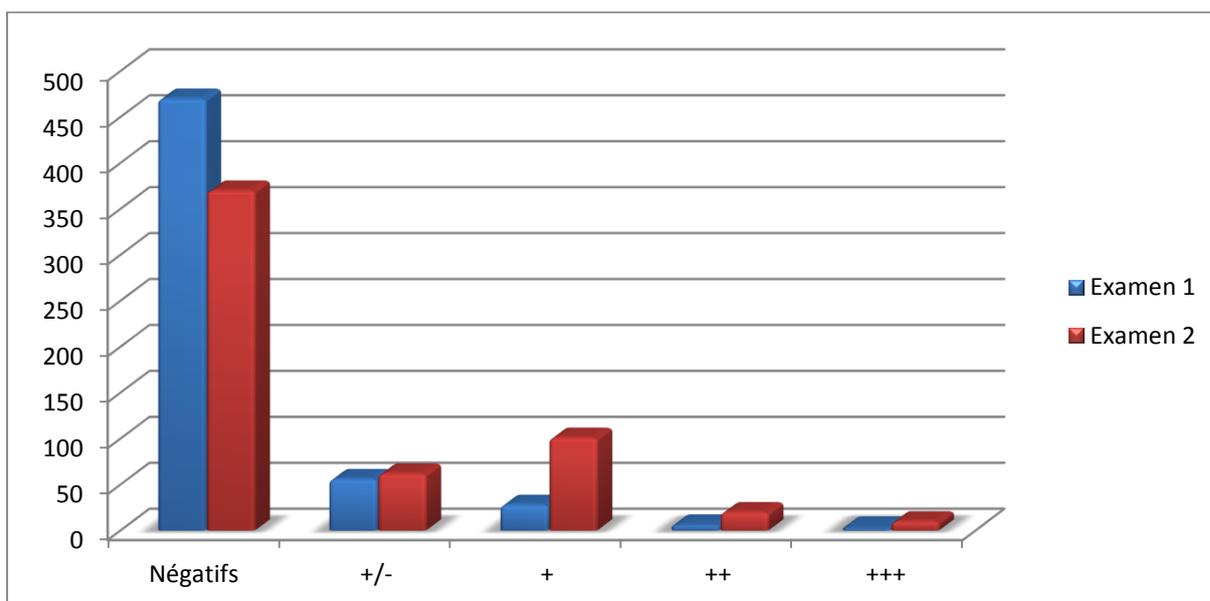


Figure 21 : Comparaison des résultats de la microscopie avec et sans traitement des expectorations à l'hypochlorite de sodium à 5 %.

Ces résultats montrent que le nombre d'expectorations sans bacilles (négatifs) en microscopie directe (méthode directe) était plus élevé qu'après traitement au NaOCl 5% (méthode à l'hypochlorite de sodium).

Les résultats quantitatifs et qualitatifs confirment un gain de positivité significative avec la méthode à l'hypochlorite de sodium, pour les frottis pauci-bacillaires 62 frottis contre 56 frottis, et pour les frottis multi-bacillaires, surtout dans les frottis moyennement positif (+) 101 frottis contre 28 frottis.

- Nous avons fait une étude comparative selon des critères entre les résultats des 37 échantillons à TPM+ traités par la méthode directe et des 146 échantillons à TPM+ traités par la méthode à l'hypochlorite de sodium 5% (NaOCl). (**Tab. 6**)

Tableau 6 : Comparaison de la positivité selon la méthode directe et la méthode à l'hypochlorite de sodium à 5 % en fonction du sexe, de la tranche d'âge et du motif médical.

		Total	TPM+ par la méthode directe	TPM+ par la méthode à l'hypochlorite de sodium	Gain de (+)	Pourcentage (%)
Sexe	masculin	336	23	80	57	16.96%
	féminin	300	14	66	52	17.33%
Tranche d'âge	<15	12	2	05	03	25.00%
	≥15 <45	266	13	51	38	14.28%
	>45	358	22	90	68	18.99%
Motif médical	Dépistage+ NV cas	557	35	128	93	16.69%
	Contrôle après traitement	79	2	18	16	20.25%

Ce tableau nous montre clairement que le gain de positivité obtenu par l'utilisation de la méthode à l'hypochlorite de sodium à 5% est nettement élevé pour les deux sexes (femme 17.33%, homme 16.96%), pour les tranches d'âge inférieures à 15 ans (25%), entre 15-45 ans (14.28%), et aux delà 45 ans (18.99%). Egalement pour le motif médical (nouveaux cas 16.69%, et contrôle après traitement 20.25%) tout ça par rapport aux résultats obtenus par la méthode directe simple.

II-2-2 Résultats de l'évaluation de la sensibilité par la mise en culture sur milieu solide

Dans le **tableau 7** nous présentons les résultats de la culture de 18 échantillons présentant des résultats positifs (**Fig. 22**) et/ou négatifs (**Fig. 23**) par l'utilisation des 2 méthodes.

Tableau 7 : Comparaison des résultats de la culture des échantillons traités par la méthode directe et la méthode à l'hypochlorite de sodium 5%.

		La méthode directe		La méthode d'hypochlorite de sodium	
		TPM+	TPM-	TPM+	TPM-
Culture	+	06	09	15	00
	-	01	02	03	00
Totale		18		18	

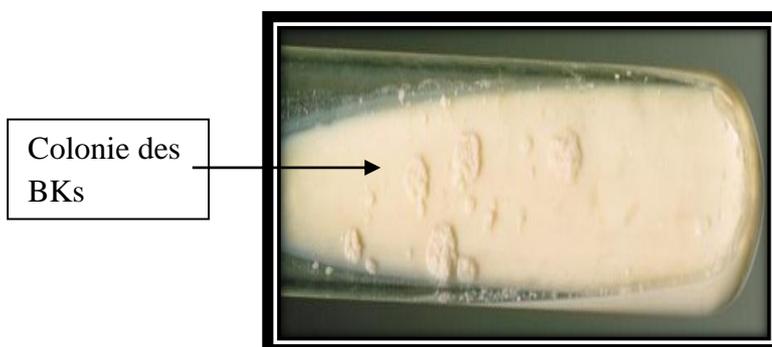


Figure 22 : Culture positive sur milieu solide.

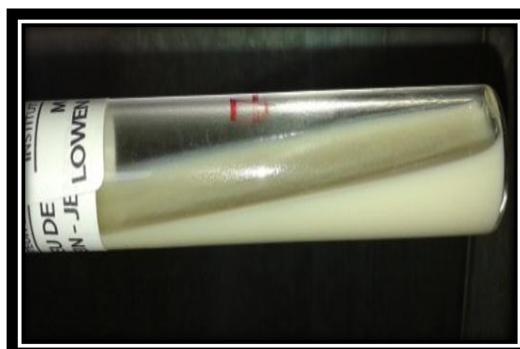


Figure 23: Culture négative sur milieu solide .

Sur 18 cas étudiés et examinés par la méthode directe simple, 6 cas positifs sont avérées positifs après culture, par contre 9 cas négatifs par la méthode directe sont avérés positifs après culture.

Avec l'utilisation de la méthode à l'hypochlorite de sodium 5% (NaOCl) et sur les 18 cas étudiés, 15 cas positifs sont également positifs après culture.

La culture a donné des résultats négatifs pour un cas positif après la méthode directe simple et pour deux cas négatifs par la même méthode. Egalement pour 3 cas positifs par la méthode à l'hypochlorite de sodium.

II-2-3 Recherche des BKs à partir des crachats salivaires

- Dans les 636 échantillons de crachats recrutés on a constaté qu'il y'a 73 échantillons de nature salivaire que nous avons traités par l'hypochlorite de sodium NaOCl à 5 % car ce type d'échantillon est souvent non traité et par conséquent jeté. Ce nombre d'échantillons correspond à 60 patients. Cependant cette étude n'a concerné que 40 patients car 20 patients n'ont présenté qu'un seul échantillon.

Cette étude a porté sur une comparaison des résultats d'une série de trois échantillons provenant de la même personne (crachat ou salive). (**Tab. 8, Fig. 24 et 25**)

Tableau 8 : Comparaison des résultats des crachats salivaires et crachats après traitement à l'hypochlorite de sodium à 5 % (NaOCl).

		Salive			
		TPM+	%	TPM-	%
Crachat	TPM+	06	15%	03	7.5%
	TPM-	04	10%	27	67.5%
Totale		40			

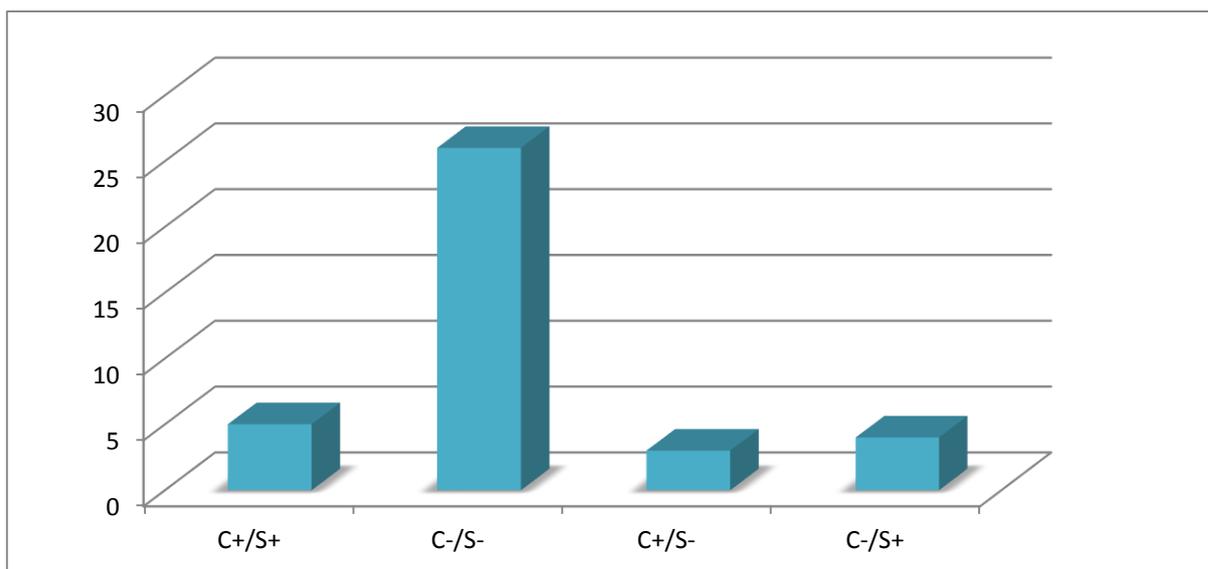


Figure 24 : Comparaison des résultats des crachats salivaires et crachats après traitement à l'hypochlorite de sodium à 5 % (NaOCl).

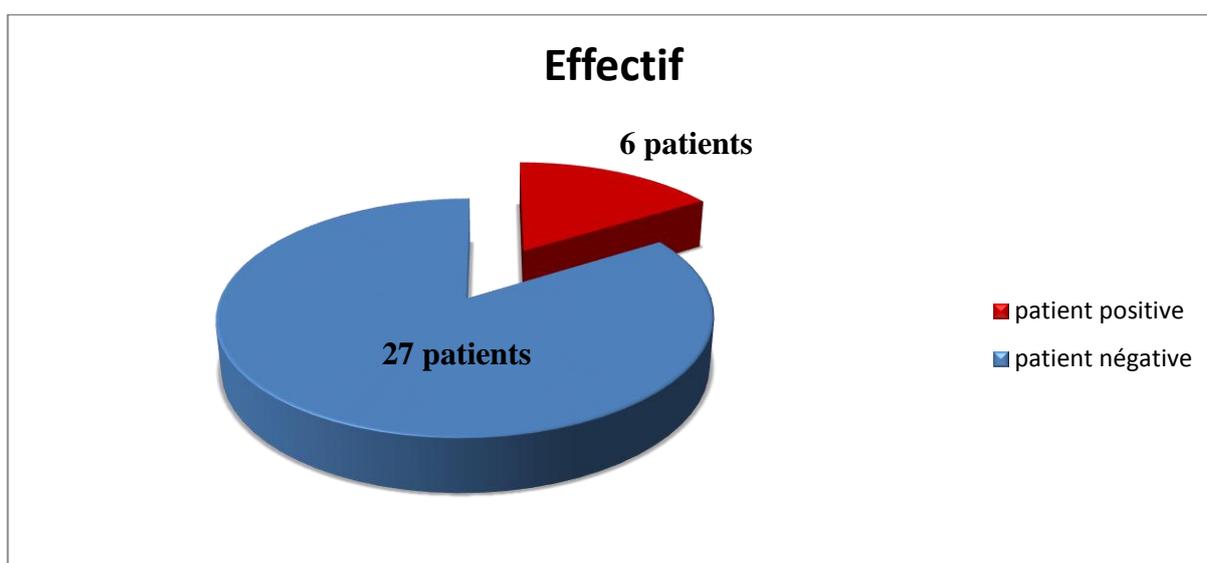


Figure 25 : Répartition des résultats positifs et négatifs identiques des crachats et des salives après traitement à l'hypochlorite de sodium à 5 % (NaOCl).

Sur les 40 patients analysés et comparés on a trouvé 33 patients qui ont présenté un résultat identique à partir des 2 types d'échantillons (crachat et salive) dont 27 patients avec un résultat négatif (salive sans bacille) soit 67.5% et 6 patients avec un résultat positif (TPM+), soit 15 %. 7 patients ont un résultat non identique.

Discussion

Dans de nombreux contextes, la détection microscopique des bacilles acido-alcoolo-résistants dans l'expectoration est le moyen principal dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire (TBP). (Alisjahbana, 2005)

En matière de tuberculose, et après lecture des statistiques étalées sur 7 années nous avons établi que les cas présumés négatifs (positifs non identifiés) restent un risque de contagiosité et de dissémination de la maladie qui représente une menace réelle pour la santé publique.

Cette situation conflictuelle demeure la préoccupation majeure de tous les scientifiques, les chercheurs et les praticiens professionnels de la santé qui ne cessent de poursuivre l'amélioration de la qualité de détection de BK à l'examen direct.

Au cours des 25 dernières années, de nombreuses techniques d'amélioration des tests de laboratoire pour les mycobactéries ont été suggérées et signalées. Peu ou aucune n'ont atteint une large utilisation pour les tests qu'elles pouvaient potentiellement apporter cette amélioration envisagée. La nécessité de nouvelles méthodes à faible coût ne peut pas être négligée, le problème est que les tests les moins susceptibles d'être largement expérimentés et documentés à ce jour sont précisément les techniques de faible coût, dépourvues de promotion par les compagnies commerciales qui préfèrent soutenir financièrement leurs propres produits. (Armand, 2005)

Pour ces raisons, nous proposons un bon exemple d'amélioration du dépistage. C'est le traitement des échantillons à l'hypochlorite de sodium.

Par ce travail, nous présentons une étude comparative concernant la recherche de BK par examen direct selon l'ancienne méthode avec toute ses étapes, et la nouvelle méthode qui comporte le traitement des échantillons à l'hypochlorite de sodium 5% (NaOCl), produit qui sert comme fixateur de BK et va éliminer les impuretés, en vue d'une amélioration de la qualité de lecture et de détection du BK.

Cette étude a été réalisée sur une population de patients composée des deux sexes de tous les âges, comptant un nombre de 324 malades.

La fluidification-centrifugation à l'eau de Javel est une méthode rustique. Si elle connaît quelques adaptations techniques d'un centre à l'autre, celles-ci ne sont pas de nature à influencer les résultats à condition que les paramètres essentiels soient respectés :

- concentration de la solution de NaOCl comprise entre 2% et 5%,
- incubation à température ambiante pendant 15 min.

- Sédimentation pendant 12 à 18 heures ou bien centrifugation pendant 15 à 30 min (3000 t/min). (**Ongkhammy, 2009**)

Dans plusieurs études, de l'eau distillée est ajouté après la réaction à l'eau de Javel car on a suggéré qu'une concentration trop élevée d'eau de Javel serait susceptible d'interférer avec la coloration de ZN, toutefois, le rôle exact de l'eau distillée n'est pas clair.

Outre le fait qu'elle constitue une étape complémentaire, dans beaucoup de contextes, l'eau distillée peut être plus difficile à obtenir que l'eau de Javel. De plus, comme **Yassin et al. 2003** l'ont démontré, elle pourrait ne pas être nécessaire. Elle pourrait aussi probablement être remplacée par de l'eau purifiée par filtration ou même par de l'eau du robinet, s'il est démontré qu'elle ne contient pas assez de mycobactéries pour que celles-ci soient détectées par l'examen microscopique.

Selon **Ongkhammy, 2009**, la centrifugation est souvent considérée comme un obstacle majeur en raison du coût de l'investissement initial et des consommables et du risque de réutilisation des tubes à usage unique, c'est pourquoi nous accordons la préférence à la sédimentation.

Il faut toutefois noter que l'utilisation de la sédimentation a été moins bien étudiée que la centrifugation et que des recherches complémentaires pourraient être nécessaires pour clarifier son rôle.

Contrairement à des auteurs qui ont trouvé que le procédé au NaOCl était dépourvu de risques de contamination au laboratoire, nous avons noté qu'il existe des manipulations à risque qui précèdent le mélange des expectorations à ce produit, notamment le transfert des crachats dans les tubes coniques. Cependant, nous avons essayé de réduire ces risques en ajoutant directement au prélèvement la solution de NaOCl 5% dans le flacon de prélèvement. Après liquéfaction, la quantité nécessaire du mélange serait transférée dans un tube conique.

Bien que le NaOCl soit probablement un des désinfectants les plus couramment utilisés pour les mycobactéries, nous avons eu des difficultés à trouver des données exactes sur les concentrations et les temps d'exposition nécessaires. Selon **Kent et Kubica, 1985** une concentration de 0,1 à 0,5% est suffisante pour tuer *M. tuberculosis* mais la durée nécessaire n'est pas mentionnée. **Best et al. 1990** ont montré qu'une concentration de 1% de NaOCl est suffisante pour tuer en une minute *M. tuberculosis* dans une expectoration. Dans plusieurs articles et revues, les concentrations et les durées d'exposition utilisées (c'est-à-dire environ 2%

pour environ 15 min.) devraient dès lors être suffisantes pour désinfecter efficacement les échantillons. (Ängeby et al., 2004)

Au vu des résultats qualitatifs, nous remarquons bien que le traitement des échantillons par l'hypochlorite de sodium à 5% a bien fixé et concentré les BAAR et a augmenté la densité bacillaire, ce qui signifie la présence nette des bacilles et leur absence dans les frottis analysés par la méthode directe simple. Ces résultats confirment ceux publiés dans 15 des 19 études comparatives.

Le nombre d'expectoration avec bacille (positif) en microscopie directe simple des produits bruts (examen 1) est de 37 échantillons, soit 6.57%, il est nettement supérieur après traitement à l'hypochlorite de sodium 5% (NaOCl) 131 échantillons soit 23.27%.

Le traitement des expectorations par NaOCl 5% a un impact sur l'efficacité du dépistage puisqu'il a « rattrapé » 94 échantillons trouvés BAAR négatifs par la méthode directe, avec un gain de positivité important (17.87%) concernant les échantillons multi-bacillaires (>10 BAAR/champ), surtout dans les frottis positifs (+) (**Tab 5**).

Ces résultats confirment ceux publiés dans 13 études comparatives qui étaient basées sur la comparaison des patients individuels, et d'autres sur des échantillons individuels. (Gains allant de 0.3% à 22%).

La digestion chimique des expectorations a permis de libérer les bacilles des fragments muqueux ou mucopurulents. L'élimination de la substance fluidifiante après sédimentation a concentré les bacilles dans le culot et a augmenté les degrés de positivité des frottis.

A partir des études comparatives selon des critères, nous avons noté en fonction du sexe une nette prédominance de positivité chez le sexe féminin traitée par l'hypochlorite de sodium à 5% (NaOCl). Ce qui indique que :

- 1-la femme en général éprouve des difficultés au crachat.
- 2-le plus souvent les échantillons fournis par la femme sont des échantillons salivaires qui sont généralement non examinés par la méthode directe.
- 3-l'utilisation de la méthode à l'hypochlorite de sodium sur les échantillons fournis par la femme est examinée avec des résultats de positivité remarquable.

Concernant le motif médical : cas suspect de tuberculose encore appelé nouveau cas, dépistage dans l'entourage tuberculeux (familiales, professionnels, scolaires) ou contrôle après traitement, et malgré le nombre des échantillons de contrôle après traitement, il reste réduit par

rapport aux échantillons de dépistage, et là nous remarquons que le gain de positivité obtenu à partir des échantillons après traitement (contrôle) est élevé par rapport au gain de positivité obtenu à partir des échantillons de dépistage.

Ceci explique que le taux de positivité est toujours élevé, lorsqu'on procède par la méthode à l'hypochlorite de sodium et surtout dans les échantillons de contrôle après traitement, en général à la fin de la phase d'attaque, qui se situe entre 2 et 3 mois selon les cas. Cette situation peut éventuellement se justifier par la diminution de la densité bacillaire dans cette période, où le diagnostic par la méthode directe simple est porteur de risques de perturbation, de ce fait, la méthode de concentration par l'hypochlorite de sodium reste le palliatif utile incontournable.

Compte tenu des tranches d'âge, sachant que la TB est une infection de l'adulte jeune et des sujets à immunité abaissée, il ressort en matière de diagnostic et quel que soit les tranches d'âge étudiée (enfants, adultes, jeunes, personnes âgées) que le taux de positivité est élevé par la méthode à l'hypochlorite de sodium 5%.

En se référant aux études de *Farnia et al. 2002* réalisées sur 430 échantillons et de *Gebre et al., 1995* réalisées sur 100 échantillons, nous avons essayé d'évaluer la sensibilité de la méthode à l'hypochlorite de sodium 5% (NaOCl) en la confrontant à une méthode de référence (gold standard) « culture sur milieu solide ». Notre étude est limitée à 18 échantillons positifs en microscopie après traitement des expectorations par l'hypochlorite de sodium, 15 échantillons sont restés positifs, sachant que parmi ces 15 échantillons positifs obtenus, 9 échantillons étaient déclarés comme négatifs par la méthode directe et positifs après traitement à l'hypochlorite de sodium, ce résultat augmente l'efficacité de la méthode à l'eau de javel. Pour les 3 autres échantillons négatifs après culture, il s'agit peut-être de bacilles non viables ou des bacilles non tuberculosis ou des bacilles morts.

L'utilisation de la culture comme méthode pour partager l'intérêt de pratiquer l'une ou l'autre des deux techniques d'analyse (méthode directe simple / méthode à l'hypochlorite de sodium 5%) a montré clairement la place que doit occuper la méthode à l'hypochlorite de sodium dans le diagnostic de la tuberculose.

Nous avons introduit pour la première fois dans la pratique du dépistage de la TB pulmonaire à l'UCTMR, le traitement des crachats salivaires de 40 patients par la méthode de fluidification-sédimentation à l'eau de Javel 5% (NaOCl) et après une étude comparative entre la salive et le crachat d'un même patient nous avons constaté une large reproductibilité du type du résultat obtenu à partir soit des crachats soit des salives (27 négatif↔négatif et 6

positif↔positif). Cette constatation démontre que la salive peut être utilisée comme prélèvement pour la recherche des BKs.

Dans la plus part des travaux qui traitent la recherche des BKs, il est souvent mentionné que le traitement des crachats salivaires n'est pas utile dans le diagnostic de TBP, directive également mentionné dans le manuel de la lutte antituberculeuse à l'usage des personnels médicaux. Effectivement, les frottis salivaires traités par la méthode directe montrent une absence des particules solides, et par conséquent la lame reste transparente et le champ est illisible. Par contre, après traitement par la méthode de fluidification-sédimentation, les frottis des crachats salivaires deviennent nets et lisibles au microscope. Il devient donc nécessaire de concentrer des recherches complémentaires sur l'analyse des crachats salivaires.

Parmi les articles compulsés, de nombreuses variations méthodologiques peuvent expliquer la disparité des résultats : populations cibles, importance des effectifs, analyse par patient ou par échantillon, examen préalable des crachats salivaires, origine, puissance et durée de la centrifugation (ou durée de la sédimentation), temps minimum de lecture par frottis, critères de positivité.

Mais tout en s'accordant sur le fait que la méthode à l'hypochlorite de sodium peut donner une nouvelle dimension à la microscopie dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire, ceci augmente le succès du traitement et contribue à une meilleure performance des programmes de lutte contre la tuberculose.

L'assurance qualité de la bacilloscopie est une composante obligatoire de tout programme national de lutte contre la TB. L'implantation de la méthode à l'eau de Javel, nécessitant une formation in situ, serait une excellente occasion de renforcer les procédures de lutte.

Conclusion

Dans la phase de diagnostic de la tuberculose pulmonaire, les cas présumés négatifs (positifs non identifiés) présentent un risque de contagion et de propagation de la maladie, ce qui constitue une préoccupation réelle pour les responsables de la santé publique. Devant cette situation et sur le plan du diagnostic, l'introduction de nouvelles méthodes devient inévitable.

De ces nouvelles méthodes de diagnostic, notamment celle relative à l'usage de l'hypochlorite de sodium, il ressort des avantages importants tels.

- Assurer un diagnostic bactériologique de qualité garantie, qui va dans le sens de la simplicité, la rapidité et le coût réduit dans l'aire de l'économie de santé.
- Diminuer le risque de contamination au laboratoire.
- Rendre la lecture microscopique des lames plus facile (champ plus clair).
- Détecter même les échantillons pauci-bacillaires.
- Améliorer nettement la densité bacillaire quel que soit l'échantillon (crachat ou salive).

De ce qui précède, une confirmation est obtenue où nous avons abouti à une résultante, confirmant notre action d'étude réalisée sur 636 échantillons de crachats prélevés chez 324 patients échantillons traités par la méthode à l'hypochlorite de sodium, avec un gain de positivité de 17.87%. Aussi, dans une première étude réalisée à partir de la salive (60 patients) souvent éliminée et de ce fait non examinée par la méthode directe simple, nous avons recueilli 6 patients ayant un résultat vrai positif (TPM+).

De ce fait nous pouvons proposer les recommandations suivantes :

- Introduire la méthode de fluidification-sédimentation dans les examens de routine des laboratoires de recherche des BKs.
- S'assurer du degré et /ou de la concentration de l'eau de Javel à utiliser dans la technique de recherche.
- Utiliser une concentration d'eau de Javel destructrice des BKs dans la désinfection des espaces de travail.
- Un échantillon traité à l'eau de Javel ne peut être utilisé pour une culture.

Au volet de la recherche, les perspectives sont assez ambitieuses, nous projetant sur des segments pratiques où il faut concevoir une étude spécifiant l'efficacité de traitement des crachats salivaires par l'hypochlorite de sodium (NaOCl).

Il faut tenir compte de l'efficacité des résultats obtenus sur les crachats salivaires traités par l'hypochlorite de sodium déterminant ainsi la reproductibilité.

Il y a lieu aussi, d'établir une approche comparative sur les résultats des crachats salivaires entre la méthode directe simple et la méthode à l'hypochlorite de sodium. Tous ces résultats nécessitent une confirmation par la méthode de culture.

Ces éléments d'appoint recueillis dans notre synthèse ouvrent la voie à l'amélioration de la phase de diagnostic où le patient n'est plus contraint de fournir exclusivement le crachat, on peut se contenter d'une action sur la salive, et ce moyen favorisera une aisance dans la manipulation et aussi une réduction des risques de contamination.

Références bibliographiques

Ouvrage et thèse

- **Ait-Khaled N. et Donald E.** (1999). Bactériologie de la tuberculose In : Tuberculose manuel pour les étudiants en médecine. France. P 149.
- **Antoine A. et Che D.** (2013). Démarche du diagnostic microbiologique d'une tuberculose. Université Médicale Virtuelle Francophone. P 19.
- **Aubry P.** (2014). La tuberculose : tuberculose et Sida, tuberculoses multirésistantes. Diplôme des pays de médecine tropicale de l'Océan indien. P 9.
- **Bactériologie,** (2003). Université Paris-VI Pierre et Marie Curie Faculté de médecine Pitié-Salpêtrière. p 122.
- **Barben J., Berger C., Bodmer T.** (2012). L'infection à M. tuberculosis. In : Manuel de la tuberculose. Ed : Ligue pulmonaire Suisse. P 93.
- **Bédossa A.** (2003). Mycobactéries. Cahier de formation biologie Médicale N° 29. Bioformat. Paris. P 157.
- **Bendadda O.** (2003). Tuberculose humaine à mycobactirium bovis : Enquête bactériologique et application de la PCR à la détection et l'identification du complexe mycobactérium tuberculosis. Thèse Doctorats. Université Sidi Mohamed Ben Abdallah. P 115.
- **Ben-Kheder A.** (2014). Guide de prise en charge de la tuberculose en Tunisie, programme national de lutte contre la tuberculose. P 84.
- **Bertrand D.** (2009). Mycobactéries atypique In : Traité de pneumologie. 2^e éd. Flammarion médecine science. P 496.
- **Black C. et Lim S.** (2014). Définitions et cadre de notification pour la tuberculose. Organisation mondiale de la Santé. P 41.
- **Bouizem F. et Chellali A.** (2010). La tuberculose en Médecine interne. service de médecine interne. Tlemcen. P 78.
- **Boulahbal F., Agadir F., Halassa A.** (2007). Manuel de lutte antituberculeuse, à l'usage des personnels médicaux. institut nationale de la santé publique. Alger, 270p.
- **Deschaseaux C.** (2005). Epidémiologie moléculaire de la tuberculose : Etude des souches de *mycobacterium tuberculosis* par la technique *IS6110-RFLP*. Thèse pour le Diplôme d'Etat de Doctorat. Université Henri Poincare. Nancy. P 105.

- **Desiré I.** (2013). Diagnostic moléculaire par PCR en temps réel du complexe mycobacterium tuberculosis résistant à l'isoniazide et à la rifampicine. Université d'Ouagadougou. Diplôme d'Etudes Approfondies en Biologie Moléculaire. P 58.
- **Fanny A.** (2013). Rôle du médecin généraliste dans la prise en charge désinfections tuberculeuses latentes du diagnostic de l'infection aux effets indésirables du traitement. Diplôme d'études spécialisées de médecine générale Université de Caen. P 39.
- **Gilles P.** (2000). Mycobactéries : Bacilles de la tuberculose In : **Freney J., Renaud F., Hansen W., et Bollet C.** Précis de : Bactériologie Clinique. Edition ESKA. Paris. P 1692.
- **Grosset J.** (1998) Histoire naturelle du bacille tuberculeux. Springer Verlag. Paris. P 230.
- **Koumba Yoya G.** (2010). Synthèse d'analogues cinnamiques : inhibiteurs potentiels contre Mycobactérium tuberculosis. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse. Université Paul Sabatier. P 250.
- **Lompo B. Y. A.** (2014). Etude des résistances primaire et secondaire du complexe tuberculosis aux anti-tuberculeux dans la région des hauts bassins. diplôme de Master. Université polytechnique de Bobo-Dioulasso. P 71.
- **Martin C. et Denis F.** (2011). Mycobactéries N 38 In : Bactériologie médicale largement revue et actualisée. 2^e éd. Elsevier Masson SAS. P 507-535.
- **Mathys V.** (2010). Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires de résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux agents anti-tuberculeux. Thèse de doctorat Université Libre de Bruxelles. P 224.
- **Meyssonier V.** (2012) Epidémiologie de la tuberculose et de la résistance aux antituberculeux. Santé publique et épidémiologie. thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie- Paris VI. French. P 161.
- **Nouvel L.** (2005). Recherche de marqueurs génétiques de souches de mycobacterium tuberculosis multirésistantes aux antibiotiques en république centrafricain. Thèse de doctorat. Université Paul Sabatier. P 92.
- **Prof H., Weiss N., Gabriela E., Pfyffer.** (2004). La tuberculose Humaine et Animale Au Tchad : Contribution à la mise en évidence et caractérisation des agents causaux et leur implication en santé publique. Faculté de l'Université de la philosophie et des sciences naturelles Basel. P 113.

- **Programme National Tuberculose.** (2008). Guide Technique de Lutte Contre la Tuberculose. Burkina Faso. Ouagadougou. P 119.
- **Ripault, Buisson V., Sobaszek S., Kornabis, Touche, Gehanno S., Rysanek.** (2005). Bacille de Koch (la tuberculose). P 11.
- **Sidhom M., Dhikray, Gamara.** (2014). Guide de prise en charge de la tuberculose en Tunisie. Direction des soins de santé de base. P 81.
- **Varaine F., Hankens M., Grouzard V.** (2010). Tuberculose : Guide pratique à l'usage des médecins, infirmiers, techniciens de laboratoire et auxiliaires de santé. 3^e éd. Médecine sans Frontière - Guidelines. P161.
- **Varaine F. et Rich M.** (2014). Guide pratique à l'usage des médecins, infirmiers, technicien de laboratoire et auxiliaires de santé. Médecine sans frontière. France. P 303.
- **Zellweger J.P.** (2014). Etiologie, transmission et évolution In : Manuel de la tuberculose. Suisse. P 80.
- **Zida S.** (2012). Tuberculose et mycobacterioses atypiques dans la région des Hauts Bassins, Burkina Faso. Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA), Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques. Bobo- Dioulasso : Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso. Institut de Développement Rural, 62p.

Articles

- **Alisjahbana B., Van Crevel R., Danusantoso H., Gartinah T., Soemantri E., Nelwan R., Vander Meer J.** (2005). Donner de meilleures informations au patient au sujet du prélèvement de l'expectoration peut améliorer le diagnostic de la tuberculose par examen microscopique. The Union brève communication Int J Tuberc Lung Dis 9 (7) : 814-817.
- **Ängeby K., Alvarado C., Pineda L.** (2000). Improved septum microscopy for a more sensitive diagnosis of pulmonary tuberculosis. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 5 (9) : 684-687.
- **Ängeby K., Hoffner S., Diwan V.** (2004). La méthode de microscopie à « l'eau de Javel » doit-elle être recommandée pour améliorer la détection des cas de tuberculose ? Revue de la littérature et enquête auprès des personnes-clé. Int J Tuberc Lung Dis 8 (7) : 806-815.
- **Armand V.D.** (2005). L'utilisation de l'eau de Javel tiendra-t-elle ses promesses dans la bacilloscopie des frottis d'expectoration ? Paris. France. The Union Int J Tuberc Lung Dis 9 (6): 700-701.
- **Best M., Sattar S., Springthorpe V., Kennedy M.** (1990). Efficacies of selected disinfectants against Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 28: 2234-2239.
- **Bouchentouf R.** (2012). Les actualités dans la tuberculose Journal Franco Vietnamien de pneumologie. J Fran Viet Pneu 03 (08) : 6-11.
- **Boukary A., Thys E., Mamadou S., Rigouts L., Matthys F., ViasFranch S., Gamatie D., Yenikoye A., Saegerman.** (2011) La tuberculose à Mycobacterium Bovis en Afrique subsaharienne 155, 23-37.
- **Farnia P., Mohammadi F., Zarifi Z.** (2002). Improving sensitivity of direct microscopy for detection of acidfast bacilli in sputum: use of chitin in mucus digestion. J Clin Microbiol, 40: 508-511.
- **Hermani N.** (2014). Tuberculose une lutte universelle. Institut Pasteur du Maroc. Notre Priorité : La promotion de la santé. Maroc. p 8.
- **Gebre N., Karlsson U., Jonsson G., Macaden R., Wolde A., Assefa A., Miorner H.** (1995). Improved microscopical diagnosis of pulmonary tuberculosis in developing countries. Trans R Soc Trop Med Hyg 89. P191-193.
- **Gille Y., Pierson A.** (2014). Mycobactéries, Généralités, Rubrique : Diagnostic des mycobacterioses.

- **Guillet, Caruba C.** (2014). Les nouveaux outils de diagnostic microbiologique de la tuberculose maladie. Société Nationale Française de Médecine Interne. La Revue de médecine interne. Elsevier Masson SAS. P 7.
- **Kent P., Kubica G.** (1985). Public Health Mycobacteriology: A guide for the level III laboratory. Atlanta. Centers for Disease Control. p 31-70.
- **Ongkhammy S., Amstutz V., Barennes H., Buisson Y.** (2009). La méthode à l'eau de javel améliore le dépistage de la tuberculose pulmonaire au Laos. The Union- INT J TUBERC LUNG DIS 13 (9) :1124–1129.
- **Vincent V.** (2013). Diagnostic bactériologique de la tuberculose, Revue Francophone des laboratoires. Elsevier Masson SAS. 2. 449 BIS. 38-43.
- **Yassin M.A. Cuevas L.E. Gebrexabher H. Squire S.B.** (2003). Efficacy and Safety of short Term bleach Digestion of Sputum in Case finding for Pulmonary Tuberculosis in Ethiopia. Int J Tuberc Lung Dis 7: 678-683.

Sites internet

- (1) http://www.who.int/tb/strategy/stop_tb_strategy/fr/. (Consulter le 07.12.2014)
- (2) **La tuberculose définition. Disponible sur :**
http://www.passeportsante.net/fr/Maux/Problemes/Fiche.aspx?doc=tuberculose_pm.
 (Consulter le : 29.03.2015)
- (3) **Histoire de la Tuberculose-News Médical. Disponible sur :**
<http://www.news-medical.net/health/History-of-Tuberculosis-%28French%29.aspx>.
 (Consulter le : 02.01.2015)
- (4) **La tuberculose : aperçu historique de l'antiquité à ce jour. Disponible sur :**
<http://www.aurespneumo.com/doc/comm/pdf/12%20Histoire%20de%20la%20Tuberculose.pdf> (Consulter le 30.01.2015).
- (5) **Tuberculose : Aide-mémoire. Disponible sur :**
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/fr/>. (Consulter le : 25.02.2015)
- (6) www.ennaharonline.com/ar/algeria_news/202264-21.html. (Consulter le : 26.12.2014)
- (7) http://www.huffpostmaghreb.com/2015/03/25/tuberculose-algerie-22000-cas_n_6937094.html. (Consulter le 12.01.2015)
- (8) **Incidence de la tuberculose. Disponible sur :**
<http://donnees.banquemondiale.org/indicateur/SH.TBS.INCD/countries/1WDZ?display=graph>. (Consulter le 25/12/2014)

(9) Particularités structurales. Disponible sur :

https://www.google.com/search?biw=1366&bih=657&noj=1&tbm=isch&sa=1&q=la+paroi+de+mycobact%C3%A9rie&oq=la+paroi+de+mycobact%C3%A9rie&gs_l=img.
(Consulter le : 17.03.2015).

(10) Agence de la santé publique du Canada, Complexe mycobactérium tuberculosis. Disponible sur :

www.phac/aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/tuber/fra.php. (Consulter le 05/03/2015)

(11) Primo-infection. Disponible sur :

<http://www.sante.public.lu/fr/maladies-traitements/029-tuberculose/010-generalites-tuberculose/>(Consulter le 15.03.2015)

(12) Tuberculose. Disponible sur :

<http://www.santesanspasseport.fr/tuberculose/>.(Consulter le 18.03.2015)

(13) FARES, Guide théorique à l'intention des intervenants. Disponible sur :

http://www.fares.be/documents/guide_theorique2006.pdf.(Consultaion le 12 Février 2012).

(15) Intradermoréaction à la tuberculine. Disponible sur :

<https://www.google.dz/search?q=radiographie+de+la+tuberculose+pulmonaire>.
(Consulter le : 14.03.2015).

Résumé

La tuberculose est endémique en Algérie, et la technique de microscope direct largement utilisée dans la détection des BAARs a montré une baisse significative.

La méthode à l'hypochlorite de sodium peut accroître significativement le rendement du dépistage microscopique de la tuberculose pulmonaire.

Dans ce travail réalisé sur 636 échantillons de crachats prélevés chez 324 patients, 37 échantillons (6.57%) sont déclarés BAAR positifs par la méthode directe simple et 131 échantillons (23.27%) sont positifs par méthode à l'hypochlorite de sodium, soit une augmentation du taux de positivité de 17.87%. Aussi, dans une nouvelle étude réalisée sur la salive (73 échantillons) qui est souvent éliminée par la méthode directe simple, nous a donné 58 échantillons négatifs et 15 échantillons positifs.

Les preuves sont assez probantes pour être utiles dans l'évaluation et l'introduction de la méthode à l'hypochlorite de sodium dans l'analyse courante dans les laboratoires participants au PNLT.

Mots clés : Tuberculose; Diagnostic ; Microscopie ; Expectorations ; Hypochlorite de sodium, salive.

Abstract

Tuberculosis is an endemic disease in Algeria for tuberculosis case detection, microscopy had declined in term of significance. The sodium Hypochlorite technique can help biologist to identify the pulmonary tuberculosis using a microscopic examination.

In this study examined 636 sputum samples collected from 324 patients, 37 sputum among them (6.57%) are BAAR positive (by the simple method) and 131 sputum (23.27%) are BAAR positive (using sodium Hypochlorite technique) with a positive growth of about 17.87%.

In addition, 58 negative sample and 15 positive sample were found among 73 spit sample. This results can approve the importance of the sodium Hypochlorite technique in exploring tuberculosis comparing to the simple technique.

Keywords: Tuberculosis; Diagnosis; Microscopy; Sputum; Sodium hypochloride, spit.

المخلص

السل هو مرض مستوطن في الجزائر، و تقنية المجهر المعتمدة للكشف عنه حققت تراجعاً ملحوظاً. تقنية هيبوكلوريت الصوديوم يمكن أن تزيد بشكل كبير عائد الفحص المجهرى للسل الرئوي.

في هذه الدراسة التي أجريت على 636 عينة بلغم التي تم جمعها من 324 مريض تم العثور على 37 عينة إيجابية (6.57%) بالطريقة المباشرة، و 131 عينة إيجابية (23.27%) بطريقة هيبوكلوريت الصوديوم. هذا ما أدى إلى زيادة في إيجابية الفحص المجهرى ب 17.78%.

زيادة على ذلك أجرينا دراسة جديدة على اللعاب (73 عينة) الذي يتم إزاحته أصلاً في التقنية المباشرة فتحصلنا على 58 عينة سلبية و 15 عينة إيجابية.

و هذه الأدلة كافية إلى حد كبير من أجل طلب تطوير و إدماج طريقة هيبوكلوريت الصوديوم في الطريقة في مخابر البرنامج الوطني لمكافحة السل.

كلمات مفتاحية: السل، التشخيص، مجهر، بلغم، هيبوكلوريت الصوديوم، لعاب.

Annexe 1 :

Coloration par la méthode de Ziehl-Neelsen à chaud

Préparation des réactifs

Les préparations utilisant le phénol ont été faites sous une hotte chimique, les vapeurs de phénol étant toxiques.

a) Fuschsine phéniquée de Ziehl

Réactifs : fuschine (10 g), alcool (100ml), Phénol aqueux (55ml), eau distillée (1000 ml).

Technique : broyer dans un mortier la fuschine avec l'alcool a 95°, ajouter le phénol aqueux et compléter à 1000 ml (compléter à 1L) avec de l'eau distillée. Laisser reposer pendant 24 h, puis filtrer.

Répartir la solution dans des flacons de 250ml. Tester et dater ces flacons.

Préparation du phénol aqueux :

Faire fondre au bain-marie 1kg de phénol cristallisé, lorsque la dissolution est totale, ajouter 100ml d'eau distillée, laisser refroidir (le phénol aqueux reste liquide).

b) Bleu de méthylène phéniqué

Réactif : Bleu de méthylène (20g), eau distillée (1000ml).

Technique : broyé au mortier le Bleu de méthylène avec l'alcool (99 ml), compléter a 1000 ml (1L) avec de l'eau distillée. Laisser reposer pendant 24 h, puis filtrer. Répartir la solution dans des flacons de 250ml. Tester et dater ces flacons.

c) Acide sulfurique (H₂SO₄) au ¼

Réactif : Acide sulfurique (pur), eau distillée (1000ml).

Technique : Dans un ballon de 02 litres en verre (PYREX) mettre 750ml d'eau distillée.

Ajouter ensuite très progressivement 250ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) pur.

Comme il se produit un fort dégagement de chaleur, placer le ballon dans un évier rempli d'eau froide ou dans une bassine.

N.B : attention ne jamais mettre l'eau dans l'acide mais toujours l'eau avant l'acide.

d) Alcool absolue 90°

Annexe 2 :

Tableau 2 Résultats de 19 études qui ont comparé la méthode à l'eau de Javel à la méthode directe

Référence	n	Eau de Javel/direct n						Ratio des positifs	% sensibilité	% spécificité
		Total positifs	Total négatifs	Vrais positifs	Vrais négatifs	Faux positifs	Faux négatifs			
Allwood et al. ¹⁰	324 patients	48/29	276/295	-	-	-	-	15/9	-	-
Angeby et al. ¹¹ (I)	303 échantillons	-	-	37/27	241/242	2/1	23/33	-	62/47	99/99
Angeby et al. ¹¹ (II)	971 échantillons	100/75	871/896	-	-	-	-	10/8	-	-
Angeby et al. ¹¹ (III)	1422 échantillons	37/33	1385/1389	-	-	-	-	2.6/2.3	-	-
Aung et al. ¹²	948 patients	293/248	655/700	-	-	-	-	31/26	-	-
Bruchfelt et al. ¹³	509 patients	-	-	106/91	328/331	14/11	62/77	-	63/54	96/97
Famia et al. ¹⁴	430 échantillons	-	-	60/36	355/353	3/5	12/36	-	83/50	99/99
Gebre et al. (I) ¹⁵	100 échantillons	-	-	36/16	48/48	0/0	16/36	-	70/31	100/100
Gebre et al. (II) ¹⁵	500 échantillons	71/39	429/461	-	-	-	-	14/8	-	-
Gebre et al. (III) ¹⁵	103 échantillons	35/16	68/87	-	-	-	-	34/16	-	-
Gebre-Selassie (sed) ¹⁶	200 patients	51/17	149/183	-	-	-	-	26/8	-	-
Gebre-Selassie (cen) ¹⁶	200 patients	60/17	160/183	-	-	-	-	30/8	-	-
Habeenzu et al. ¹⁷	488 patients	-	-	116/66	336/336	0/0	36/86	-	76/43	100/100
Miorner et al. (sed) ¹⁸	545 échantillons	114/91	431/454	-	-	-	-	21/17	-	-
Miorner et al. (cen) ¹⁸	545 échantillons	115/91	430/454	-	-	-	-	21/17	-	-
Saxena et al. ¹⁹	304 patients	96/52	208/252	-	-	-	-	32/17	-	-
Van Deun et al. ²⁰	3287 échantillons	544/510	2743/2777	-	-	-	-	17/16	-	-
Wilkinson and Sturm ²¹	166 patients	-	-	39/38	75/73	2/4	50/51	-	44/43	97/95
Yassin et al. ²²	200 patients	52/35	148/165	-	-	-	-	26/18	-	-

Sed = méthode de sédimentation ; cen = centrifugation