



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

STÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIF



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie.

قسم : الميكروبيولوجيا.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Écologie et environnement

Spécialité : Écologie microbienne

Intitulé :

**La tuberculose extra-pulmonaire à l'unité de la tuberculose
laboratoire de microbiologie CHU Dr. Benbadis Constantine.
Étude rétrospective de deux ans.**

Présenté et soutenu par : HARIECHE Roumeissa

Le : 09/07/2019

TALEB Hind

Jury d'évaluation :

Président du jury : SAMRA Zahia (Pr. – Univ3 Constantine)

Rapporteur : OULMI Lamia (MCB - UFM Constantine 1)

Examineurs : MEZIANI Meriam (MAA - UFM Constantine 1)

*Année universitaire
2018 - 2019*

Remerciements

Nous voudrions tout d'abord adresser toute notre gratitude à notre encadreur Madame L. OULMI. Maître de conférences à l'Université des Frères Mentouri-Constantine 1, pour l'aide qu'elle a fournie et les connaissances qu'elle a su nous transmettre. Nous la remercions également pour sa disponibilité et la qualité de ces conseils.

Nous tenons à remercier avec une plus grande gratitude Madame Z. SAMRA, Professeur à l'université de Constantine 3 de l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury de notre soutenance.

Nous remercions également, Mademoiselle M. MEZIANI Maître assistante à l'Université des Frères Mentouri-Constantine 1 d'avoir bien voulu accepter d'examiner notre travail.

Table des matières

Remerciement

Résumé

Introduction.....1

Etude bibliographique

1. La tuberculose extra-pulmonaire.....	3
2. L'épidémiologie.....	3
3. Le mode de transmission.....	4
4. Les Mycobactéries.....	5
4.1 La classification et la nomenclature des mycobactéries.....	5
4.2 Les caractères bactériologiques des mycobactéries.....	5
5. Les caractéristiques générales de Mycobacterium tuberculosis.....	7
5.1 Les caractères morphologiques.....	7
5.2 Les caractères culturels.....	7
6. Les formes de la tuberculose extra-pulmonaire.....	8
6.1 La Tuberculose ganglionnaire.....	8
6.2 La tuberculose ostéo-articulaire.....	9
6.3 La méningite tuberculeuse.....	9
6.4 La tuberculose abdominale.....	10
6.5 La tuberculose uro-génitale.....	10
6.6 La tuberculose miliaire.....	10
7. Le diagnostic microbiologique de la tuberculose.....	10
8. Le traitement de la tuberculose.....	11

Materiel et méthode

1. Lieu et la date de l'étude.....	12
2. La réception des prélèvements.....	12

3. L'enregistrement des échantillons	12
4. La conduite à tenir en unité de BK et mesure de sécurité	12
5. La recherche des mycobactéries par examen microscopique.....	12
5.1 La préparation des frottis.....	13
5.2 La coloration à l'auramine.....	13
5.3 La coloration à la fuchsine de Ziehl Neelsen	14
6. La recherche des mycobactéries par cultures	15
6.1 Les échantillons prélevés de sites stériles.....	15
6.2 Les échantillons prélevés de sites non stériles.....	15
6.3 La culture sur le milieu lowenstein Jensen.....	15
7. Culture avec le système automatisé.....	16
7.1 Préparation du complexe d'antibiotique.....	17
7.2 Culture	17
7.3 Lecture.....	18
8. Étude rétrospective	18

Résultats et discussion

1. Résultats de l'étude prospective	19
1.1 Recueil des échantillons	19
1.2 Résultats de l'examen microscopique	20
1.3 Résultat des cultures	20
2. Résultats de l'étude rétrospective	22
2.1 Paramètres épidémiologique de la population étudiée	22
2.2 Répartition des cas positifs selon le sexe.....	26
2.3 Répartition des cas positifs selon la nature des échantillons et leur structures d'envoi..	26
Conclusion.....	29
Référence bibliographique.....	30

Annexes

Liste des figures

Figure 1: <i>M. tuberculosis</i> après coloration par Ziehl Neelsen.....	6
Figure 2: <i>M. tuberculosis</i> après coloration par l'auramine	6
Figure 3: Culture de <i>M. tuberculosis</i> sur Lowenstein.....	8
Figure 4: Une adénopathie de 3×3 cm au niveau sus - claviculaire	8
Figure 5: Ostéite tuberculeuse (Mal de pott).....	9
Figure 6: Trois prélèvements extra pulmonaires dans des écouvillons d'un même patient accompagnés de la fiche d'envoi.....	12
Figure 7: Mesure de sécurité en unité de BK CHU Dr. Benbadis de Constantine	13
Figure 8: Le flacon du complexe d'antibiotique.....	17
Figure 9: Le supplément de croissance.....	17
Figure 10: Photographie de l'automate	17
Figure 11: Fréquences des analyses extra pulmonaires.....	20
Figure 12: Examen macroscopique des cultures après 72 jours d'incubation à 37 °C.....	21
Figure 13: Examen microscopique après coloration Zeihl Neelson	21
Figure 14: Le nombre d'échantillons réceptionné au niveau de l'unité de la tuberculose par mois (du Février 2017 au Décembre 2018).....	23
Figure 15: Comparaison des deux sexes durant les deux ans.....	23
Figure 16: Histogramme représentant le nombre d'échantillons prélevé de sites stériles au cours des années 2017 et 2018.	25
Figure 17: Histogramme représente les échantillons non stériles durant les deux ans.....	26
Figure 18: Nombre de cas positifs selon le type.d'échantillon.....	28
Figure 19: Les cas positifs selon le service médical.....	28

Liste des tableaux

Tableau 1: Nombre d'échantillons réceptionnés lors de l'étude prospective selon la nature du prélèvement.	19
Tableau 2: Cas positifs déclarés en mois de mars et avril de l'année 2019.	22
Tableau 3: Nombre d'échantillons extra pulmonaire par mois, analysé à l'unité de la tuberculose CHUC durant les deux années 2017- 2018.....	23
Tableau 4: Le nombre d'échantillons réceptionné par mois selon le sexe des patients	24
Tableau 5: Le nombre d'échantillons par nature durant les deux années de l'étude.	24
Tableau 6: Le nombre des cas positifs selon le sexe des patients	26
Tableau 7: Cas positifs durant les deux ans	27

Liste des abréviations

BK :	Bacilles de Koch
BCG :	Bacilles de Calmette et Guérin
OMS :	Organisation mondiale de la santé
TEP :	Tuberculose extra pulmonaire
CHU :	Centre Hospitalier Universitaire
VIH :	Virus d'immunodéficience humaine
BAAR :	Bacille acido-alcoolo- résistant
PCR :	Polymérase chaine réaction
LCR :	Liquide céphalorachidien
BBT :	Bleu de bromothymol

Résumé

La tuberculose est une maladie infectieuse provoquée par des mycobactéries du complexe tuberculeux principalement *Mycobacterium tuberculosis*. Elle touche principalement les poumons mais peut aussi atteindre d'autres organes. La tuberculose extra pulmonaire est beaucoup plus problématique dans les pays en voie de développement, notamment en Afrique. Nos travaux ont consisté en une étude réalisée pendant deux mois dans l'unité de la tuberculose du laboratoire de bactériologie CHU Dr. Benbadis Constantine. Durant cette période, 92 échantillons extra-pulmonaires ont été examinés par les techniques conventionnelles de la microbiologie. Cinq cas positifs ont été déclarés, tous de sexe féminin. L'étude rétrospective descriptive a porté sur 1215 échantillons extra pulmonaires diagnostiqués entre le 1^{er} février 2017 et le 31 décembre 2018. Seulement 15 cas positifs ont été déclarés avec un pourcentage de 1,23%. Huit cas de sexe masculin et sept cas de sexe féminin. Dans notre étude nous avons pu détecter six cas positifs grâce à l'utilisation de l'automate BD BACTEC MGIT 960 qui offre un système spécifiquement dédié aux mycobactéries des résultats fiables et rapides grâce une détection précoce de la croissance.

Mot clés: *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculose extra pulmonaire, ZiehlNeelsen, Auramine

Abstract

Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex mainly *Mycobacterium tuberculosis*. It mainly affects the lungs but it can also affect other organs. Extra-pulmonary TB is much more problematic in developing countries, especially in Africa. Our work consisted of a study carried out for two months in the tuberculosis unit of the laboratory of bacteriology CHU Dr. Benbadis Constantine. During this period, 92 extra-pulmonary specimens were examined by conventional microbiology techniques. Five positive cases were reported, all female. The retrospective descriptive study included 1215 extra-pulmonary samples diagnosed between 1thFebruary, 2017 and December 31th 2018. Only 15 positive cases were reported with a percentage of 1.23%. Eight male cases and seven female cases. In our study we were able to detect six cases thanks to the use of the BD BACTEC MGIT 960 automat, which offers a system specifically dedicated to Mycobacterial with reliable and fast results thanks to an early detection of growth.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, extra pulmonary tuberculosis, Ziehl Neelsen, Auramine

ملخص

السل هو مرض معدي ناتج عن *Mycobacteries*، وبصورة رئيسية *Mycobacterium tuberculosis*، والتي تصيب الرئتين بشكل رئيسي ولكن يمكن أن تصل أيضًا إلى الأعضاء الأخرى، كالعقيدات والعظام (سل خارج رئوي). يعتبر هذا المرض إشكالية كبيرة في البلدان النامية. يتألف عملنا من دراسة أجريت لمدة شهرين في مختبر البكتيريا في المستشفى الجامعي بن باديس قسنطينة؛ حيث تم اختبار 92 عينة عن طريق تقنيات ميكروبيولوجية تقليدية، للكشف على وجود عصيات مقاومة للأحماض والكحول. وجدنا خمس حالات إيجابية معظمها حالات نسائية. أجرينا أيضًا دراسة رجعية وصفية لمدة عامين (2017, 2018) على 1215 عينة فوجدنا 15 حالة إيجابية. خلال دراستنا تمكنا من الكشف عن 6 حالات عن طريق استعمال BD BACTEC MGIT 960 مخصص لـ *Mycobactérie* الذي يعطي نتائج دقيقة خلال وقت قصير.

الكلمات المفتاحية: *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculose extra pulmonaire, Ziehl Neelsen

,Auramin

La tuberculose est une maladie infectieuse potentiellement mortelle due à une bactérie dénommée *Mycobacterium tuberculosis* ou bacille de Koch (BK), du nom du médecin, Robert Koch, qui l'a découverte en 1882.

Le Bacille de Koch infecte avec prédilection l'appareil respiratoire : la tuberculose pulmonaire représente un peu plus de 70% des cas de tuberculose, mais la maladie peut toucher tous les organes (le rein, les os, un ganglion).

Malgré l'existence d'un traitement très efficace et d'un vaccin (le BCG), la tuberculose continue de faire des victimes et selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), elle compte parmi les 10 premières causes de mortalité dans le monde. En 2016, l'OMS avait annoncé que 10,4 millions de personnes ont contracté cette maladie, durant cette année et 1.3 million sont mortes. Elle demeure une crise de santé publique et une menace pour la sécurité sanitaire.

En Algérie, il a été constaté ces dernières années une inversion de l'incidence des cas de tuberculose qui s'est traduite par une diminution de 10 points de la forme contagieuse et une persistance d'un niveau relativement élevé de celle en extra pulmonaire (TEP). Sur les 22780 cas recensés en 2017, 15409, soit 67 % des cas, relevaient de la tuberculose extra pulmonaire, dont plus de la moitié représentée par la localisation ganglionnaire et un quart par la localisation pleurale (site web 9). La forte incidence de la maladie en Algérie et l'ignorance des personnes atteintes de cette maladie nous sont amenés à la choisir comme sujet de mémoire.

Au cours de cette étude, nous donnons dans la première partie du mémoire le profil épidémiologique de la maladie, l'agent causal et sa transmission, ainsi que son diagnostic bactériologique et son traitement.

Dans la deuxième partie, nous exposons notre méthodologie de travail basée sur le diagnostic bactériologique des échantillons réceptionnés au niveau de l'unité de la tuberculose du laboratoire de bactériologie CHU Dr. Ben Baddis Constantine.

Notre travail est basé sur deux objectifs :

En premier lieu, le diagnostic bactériologique de la tuberculose par la recherche de *M.tuberculosis* par les techniques microscopiques et après cultures spécifiques.

En second lieu, l'évaluation de la fréquence d'isolement par réalisation de deux études, l'un prospective sur une durée de deux mois et une autre rétrospective descriptive durant une période de deux ans.

1. La tuberculose extra-pulmonaire

La tuberculose est une maladie infectieuse provoquée par le bacille *Mycobacterium tuberculosis*, qui touche le plus souvent les poumons, mais parfois aussi d'autres parties de corps, comme les reins, les ganglions et les os.

La tuberculose fait partie de ce qu'on appelle « maladie de la pauvreté ». Elle se reprend surtout dans les milieux où sévissent les conditions de malnutrition, des mauvaises conditions sanitaires, d'un manque de suivi médical, d'une immunodéficience comme l'infection par le VIH, ou le diabète ou encore un traitement à long terme aux corticoïdes ou aux immunosuppresseurs (Enarson, 1999).

L'infection d'un sujet par le VIH augmente le risque d'être infecté par la tuberculose, elle entraîne une évolution beaucoup plus rapide de l'infection à la maladie, et elle accroît le risque de réactivation d'une tuberculose ancienne. Le risque de voir apparaître une tuberculose-maladie d'un sujet VIH positif est de 5 % à 8 % par an (Enarson, 1999).

2. L'épidémiologie

À l'occasion de la journée mondiale de lutte contre la tuberculose, le 24 Mars 2019, qui s'est tenue à l'institut national de santé publique, le Pr. Merzak G., chef de cabinet du ministre de la santé et de la réforme hospitalière, a indiqué que le nombre de cas de tuberculose extra pulmonaire enregistrés en 2018 a atteint les 16025 cas avec une incidence de 38,4 cas pour 100.000 habitants, dont les trois quarts sont répartis seulement entre deux localisations, ganglionnaire et pleurale.

Pour sa part, le Pr. Ali Halassa S., directeur général du programme national de lutte contre la tuberculose au ministère de la Santé, a relevé l'intérêt de cette journée pour faire le point sur la situation dans le monde et en Algérie et mettre l'accent sur les recommandations aux médecins. Il a également souligné la tendance baissière de la tuberculose contagieuse, qui a enregistré cette année le taux le plus faible depuis l'indépendance avec 13,8 cas pour 100.000 habitants, mettant en exergue la nécessité de renouveler les recommandations et les priorités en matière de lutte contre la tuberculose extra-pulmonaire qui représente actuellement un taux de 69,4 %.

Le spécialiste a également indiqué que les cas de tuberculose pulmonaire sont enregistrés depuis quelques années chez les sujets de plus en plus âgés, précisant que les épidémiologues parlent actuellement de « *vieillissement de la maladie* ». « *Selon les dernières statistiques, la moyenne de la maladie augmente et touche les personnes âgées qui sont généralement fragilisées, et le traitement est moins bon que chez le sujet jeune* », a-t-il expliqué

3. Le mode de transmission

La transmission peut être nosocomiale ou aéroportée (inhalation de noyaux de gouttelettes transportant *M. tuberculosis*, qui sont émises lorsque les patients tuberculeux toussent (Pfyffer, 2007). Après inhalation, quelques bacilles parviennent aux alvéoles pulmonaires (site web5).

Durant la phase pré-immune, les bacilles sont phagocytés dans des macrophages alvéolaires où ils se multiplient. Cette micro colonie bactérienne intracellulaire va aboutir à la lyse des macrophages infectés et à la libération des bacilles qui seront à leur tour phagocyté par d'autres macrophages et par des cellules de l'inflammation. Ainsi, un foyer infectieux primaire est constitué (site web 5).

La défense cellulaire est complétée par une défense immune, impliquant les T-lymphocytes. Cette phase immune nécessite un délai de deux à trois semaines. Elle s'évolue comme suit : quelques bacilles isolés et d'autres phagocytés atteignent le ganglion lymphatique drainant le site infectieux initiale. Dans le ganglion, des T-lymphocytes vont interagir par l'intermédiaire de leurs récepteurs avec les antigènes de *M.tuberculosis*. Ces cellules après être multipliées localement vont migrer dans l'organisme et gagner le foyer infectieux primaire où elles vont déclencher une réaction inflammatoire et aboutir ainsi à la formation de la tuberculose. En fonction des capacités de défense, le foyer infectieux primaire va régresser ou au contraire s'étendre (site web 5).

Dans la majorité des cas, le complexe primaire constitué par le foyer initial et le ganglion satellite va demeurer inchangé, diminuer ou se calcifier (site web 5). Dans un petit nombre de cas les bacilles du complexe primaire vont se disséminer dans l'organisme par la circulation sanguine et pouvoir infecter n'importe quel tissu ou organe (site web 5).

Les autres modes de transmission comprennent l'exposition à des prélèvements d'autopsie, la transmission vénérienne et même la transmission percutanée (**Coggin, 2006**), (**Lauzardo, 1996**). Les animaux infectés peuvent transmettre l'infection aux employés de laboratoire par aérosol, vecteur passif ou morsure. La tuberculose bovine peut survenir à la suite de l'exposition à des bovins infectés (transmission aéroportée, ingestion de lait cru ou de produits laitiers au lait cru) (**Cosivi, 1994**).

4. Les mycobactéries

4.1 La classification et la nomenclature des mycobactéries

Le terme *Mycobacterium* provient de deux racines empruntées au grec « Myces » pour champignon et « Bakterion » petit bâton.

Les bactéries du genre *Mycobacterium* appartiennent à la famille des *Mycobacteriaceae* classée dans l'ordre des Actinomycetales dont le pseudo mycélium rudimentaire se présente habituellement sous forme de petits bacilles, immobile, non sporulés, ayant parfois des éléments renflés, cunéiformes ou ramifiés.

Ces bactéries sont caractérisées par une propriété tinctoriale particulière : l'aptitude à conserver la coloration malgré l'action combinée de l'alcool et des acides dilués : elles sont dites acido-alcool-résistantes.

4.2 Les caractères bactériologiques des mycobactéries

Les mycobactéries sont des bacilles droits ou légèrement incurvés, de 0,2 à 0,6 µm de diamètre sur 1,0 à 10,0 µm de longueur. Ils présentent parfois des renflements ou des ramifications, formant occasionnellement des filaments qui se fragmentent très facilement en éléments bacillaires. Ils sont immobiles et non sporulés (**site web 1**).

Ces bactéries sont difficilement colorées par la coloration de Gram mais sont considérées comme des Gram positif. En fait, leur paroi possède une structure plus complexe que celle des bactéries à Gram positif et sur un frottis coloré par la technique de Gram, ces derniers apparaissent souvent comme non colorés (**site web 1**).

Leur mise en évidence repose sur leur propriété particulière d'acido-alcool-résistance, c'est pourquoi on les appelle des B.A.A.R. (Bacilles Acide-Alcool Résistants) (**site web 1**).

Deux colorations sont utilisées :

La technique de Ziehl-Neelsen, où la fuchsine colore en rouge les bacilles qui conservent cette coloration après traitement par l'acide nitrique ou (sulfurique) dilué et par alcool. Le fond de la préparation est ensuite coloré au bleu de méthylène. Les bacilles acido-alcoolo-résistant s'apparaissent rouges sur fond bleu (figure1). La lecture se fait à l'objectif d'immersion. (**Site web1**).

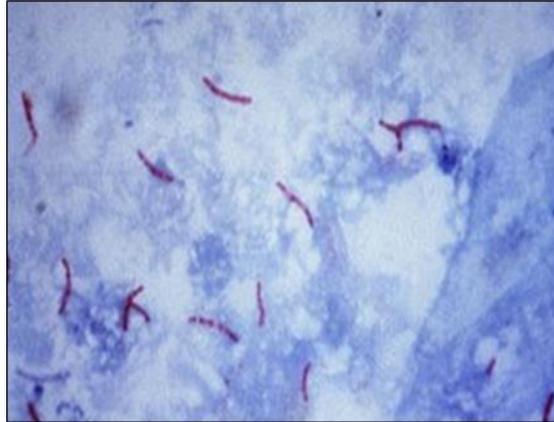


Figure 1 : *M.tuberculosis* après coloration par Ziehl-Neelsen (Site web9)

La technique de Dugommier où l'auramine se fixe sur le bacille et le rend fluorescent, après un traitement au mélange acide-alcool et une contre coloration du fond de la préparation. Cette dernière est examinée au microscope à fluorescence à faible grossissement ($\times 25$). La lame est explorée plus rapidement. Le champ observé étant plus grand qu'à l'immersion, les B.A.A.R apparaissant fluorescents, brillants sur fond noir de la préparation. Ils sont dénombrés par champs microscopique. Le diagnostic est déclaré positif si au moins 1 B.A.A.R est observé pour dix champs (**site web1**).

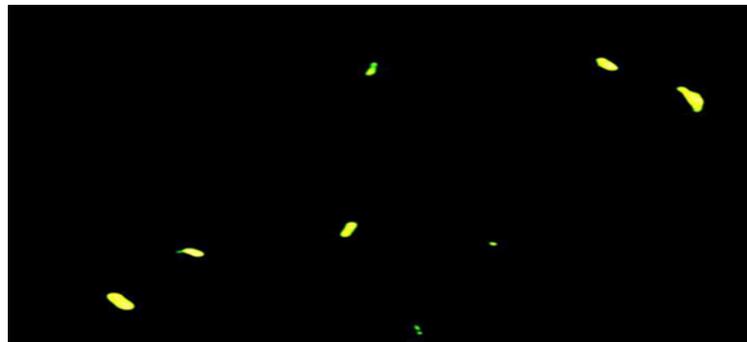


Figure 2 : *M.tuberculosis* après coloration par l'auramine (Site web 10)

Les mycobactéries se caractérisent par une paroi riche en lipides (60 % des constituants) ce qui explique partiellement les propriétés tinctoriales, la pathogénicité et la résistance à divers antibiotiques (**site web1**).

La paroi est constituée de trois couches. La plus interne est formée d'un peptidoglycane sur lequel est fixé un polymère de molécules d'arabinose et de galactose (arabinogalactane) qui s'attachent par des liaisons S ester à des acides mycoliques situées dans la couche intermédiaire. La partie externe de la paroi est formée d'une matrice de phospholipide, de molécules amphiphiles, de protéines (**site web 1**).

Le complexe *Mycobacterium tuberculosis* comprend les espèces *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* et *M. canetti*. Ces bactéries peuvent provoquer la tuberculose (TB) chez l'homme. Les cas de tuberculose sont dus en grande majorité à *M.tuberculosis*

5. Les caractéristiques générales de *Mycobacterium tuberculosis*

5.1 Les caractères morphologiques

M. tuberculosis est un bacille à extrémités arrondies, a capsulé, a sporulé et immobile. Il se colore mal par les colorations usuelles telles que le Gram ou le bleu de méthylène. Par contre, il se colore par la coloration de Ziehl-Neelsen. Les bactéries apparaissent au microscope optique comme des bâtonnets rouges isolés ou en petits amas (**Benamrouche, 2015**).

5.2 Les caractères cultureux

C'est une bactérie aérobie stricte à pH optimale de 6.9. Il nécessite pour sa culture des milieux à base d'œuf (milieu de Lowenstein-Jensen) avec temps de croissance de 20 heures. Les colonies apparaissent après 21 à 28 jours jusqu'à 48 jours d'incubation à 35-37 °C. Ce sont de petites colonies rondes opaques, de couleur crème. En se développant, elles prennent un aspect rugueux, verruqueux en « choux fleurs » (figure 3) de couleur crème beige à chamois (**Benamrouche, 2015**).



Figure 3 : Culture de *M.tuberculosis* sur Lowenstein (Site web 11)

M.tuberculosis est très sensible à la chaleur, à la lumière solaire, aux rayons X, aux ultraviolets, à l'eau de javel et à l'alcool (**Benamrouche, 2015**).

Il résiste au froid (+4 °C), vit plusieurs années à -70 °C et résiste à la dessiccation (**Benamrouche, 2015**).

6. Les formes de la tuberculose extra-pulmonaire

6.1 La tuberculose ganglionnaire

Cette forme est la plus fréquente des localisations extra-thoraciques (environ un cas sur cinq). Elles s'observent plutôt chez les enfants (**site web 5**).

C'est la plus commune et se présente sous la forme de tuméfactions indolores (figure 4) dans les ganglions lymphatiques (**site web 6**). Le diagnostic repose sur la biopsie du ganglion par analyse au microscope et mise en culture (**site web 5**).

Les symptômes : hypertrophie douloureuse d'un ou plusieurs ganglions lymphatiques (adénopathie) (**site web4**).



Figure 4 : Une adénopathie de 3×3 cm au niveau sus-claviculaire. (Site web 12).

6.2 La tuberculose ostéo-articulaire

Appelée aussi Maladie de Pott, s'attaque quant à elle aux os et plus précisément à la colonne vertébrale, aux hanches et aux genoux. Elle peut se traduire par une déformation de la colonne vertébrale ou des douleurs aux articulations (**site web 6**).

Le début est souvent insidieux, accompagné d'une tuméfaction et d'une inflammation locale modérément douloureuse. La limitation des mouvements apparaît assez rapidement, incitant alors le malade à consulter (**site web 7**).

Le diagnostic repose sur une radiologie, un scanner, une IRM pour visualiser les lésions articulaires et osseuses, la biopsie et l'analyse du contenu d'un abcès artériel ou osseux révélant la présence des bacilles de Koch (**site web 5**).



Figure 5 : Ostéite tuberculeuse (Mal de Pott) (Site web 13)

6.3 La méningite tuberculeuse

La méningite tuberculeuse, qui apparaît généralement au détour d'une primo-infection non traitée, est l'atteinte des méninges par le bacille de Koch. Les individus à risque sont ceux qui présentent un déficit de l'immunité (**site web 8**).

La méningite se révèle par des signes d'infections plus ou moins marqués, des signes méningés (maux de tête, raideur de la nuque lors de la flexion...) et/ou des signes de localisation neurologiques (paralysie au niveau d'un des nerfs crâniens) (**site web 5**).

La ponction lombaire est l'étape essentielle du diagnostic. La recherche de BK est pratiquement toujours négative à l'examen direct et la confirmation doit se faire par la culture (**site web 5**).

La PCR sur le liquide céphalo-rachidien (LCR) pourrait permettre un diagnostic plus rapide (**site web 5**).

La ponction lombaire avec l'analyse du LCR est généralement peu contributive. Le diagnostic repose surtout sur le scanner et la biopsie dirigée (**site web 5**).

6.4 La tuberculose abdominale

Les manifestations cliniques dépendant de l'organe atteint :

-Tuberculose iléo-caecale : caractérisée par des douleurs, parfois une masse palpable. Un abcès au niveau du rectum (**site web 5**).

-Tuberculose péritonéale : douloureuse, coexistant avec une ascite fréquente (**site web 5**).

Le diagnostic est confirmé par une ponction ou une biopsie (**site web 5**).

6.5 La tuberculose uro-génitale

- Chez l'homme, gonflement d'une bourse, infection de la prostate, difficulté à uriner, la présence de sang dans les urines (**site web 2**).

- Chez la femme, la tuberculose peut être exclusivement génitale avec des douleurs du petit bassin, des troubles des règles et une stérilité (**site web 2**).

Le diagnostic repose sur l'échographie et le scanner, la recherche de BK dans les urines et éventuellement la biopsie (**site web 2**).

6.6 La tuberculose miliaire

La tuberculose miliaire est le résultat d'une dissémination générale par le sang (voie hématogène) du BK (comme lors d'une septicémie) sous la forme de granulomes d'un à deux millimètres de diamètre, rappelant un « grain de mil », et disséminés dans tout l'organisme.

Le diagnostic est basé sur le prélèvement microbiologique et/ou biopsique dans la localisation la plus facilement accessible (**site web 5**).

7. Le diagnostic microbiologique de la tuberculose

Les arguments cliniques, radiologiques et histologiques (anatomopathologiques) ne sont pas spécifiques de la tuberculose et ne peuvent permettre qu'un diagnostic présomptif. C'est la mise en évidence de bacilles de la tuberculose, à savoir *M. tuberculosis* (le plus fréquent), *M. bovis* ou *M. africanum* dans les produits pathologiques qui constitue le

diagnostic définitif. De plus, le suivi bactériologique d'un patient tuberculeux mis sous antituberculeux est indispensable pour confirmer la stérilisation des lésions (**site web 3**).

Les méthodes bactériologiques à mettre en œuvre comprennent la recherche de bacilles acido-alcool-résistants par l'observation microscopique, la mise en culture sur milieux spécifiques.

L'identification par méthode moléculaire ou biochimique des bacilles obtenus en culture et les tests de sensibilité aux antituberculeux.

L'assurance de la qualité et de la reproductibilité de l'analyse microbiologique passe par le contrôle de l'intégrité initiale des échantillons avec la standardisation des conditions de prélèvement, de conservation et de stockage. Le choix de type d'échantillon et le mode de prélèvement est d'une importance capitale (**site web 3**).

8. Le traitement de la tuberculose

L'infection étant bactérienne, le traitement de la tuberculose est basé sur la prise d'une association de quatre antibiotiques : isoniazide, rifampicine, éthambutol et pyrazinamide sur deux mois puis uniquement isoniazide et rifampicine sur les quatre mois suivants.

La prise en charge doit être débutée le plus rapidement possible et suivie scrupuleusement pour être efficace. En effet, en cas de non-respect, le bacille de Koch a des chances de devenir résistant aux antibiotiques, compromettant ainsi sévèrement la guérison.

1. Lieu et la durée de l'étude

Notre stage de fin d'étude s'est déroulé entre le 03 Mars et le 10 Mai 2019. L'étude à portée sur des prélèvements provenant de patients suspectés d'être atteints de tuberculose extra pulmonaire réceptionnés au niveau de l'unité de la tuberculose du laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalo-Universitaire Dr. Benbadis Constantine.

2. La réception des prélèvements

Les échantillons sont réceptionnés au niveau du laboratoire dans des écouvillons ou des seringues. La conformité de ces derniers doit être obligatoirement contrôlée. Chaque échantillon doit être accompagné d'une fiche de renseignements concernant le patient (le nom, le prénom, l'âge, le service, la nature du prélèvement).

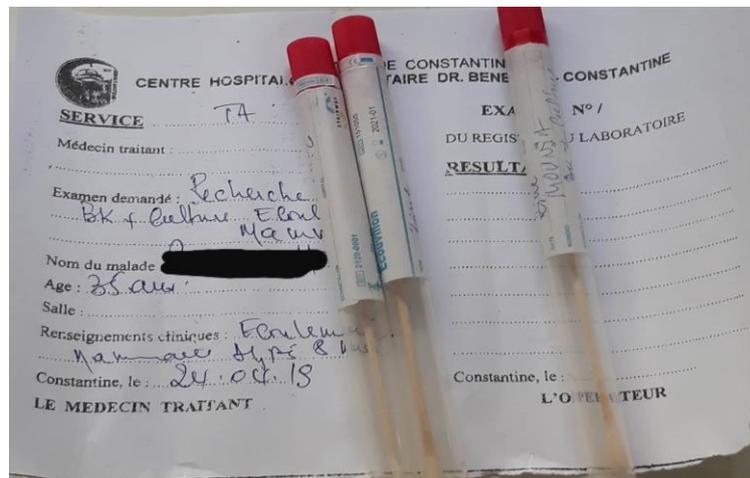


Figure 6 : Trois prélèvements extra pulmonaire dans des écouvillons d'un même patient accompagnés de la fiche d'envoi.

3. L'enregistrement des échantillons

En respectant le numéro d'ordre interne, l'échantillon analysé est enregistré sur le registre de l'unité. Les numéros d'ordre du laboratoire doivent coïncider avec les informations correspondantes sur le formulaire de demande d'examen qui accompagne chaque échantillon. Les informations de chaque patient (le nom, le prénom, le service et la nature du prélèvement) ainsi que la date de réception sont soigneusement notés.

4. La conduite à tenir en unité de BK et mesure de sécurité

Pour éviter toute sorte de contamination au niveau de l'unité, des recommandations de biosécurité sont indispensables. Le manipulateur doit être muni de blouse, de surblouse,

des gants pour mains et de bavette médicale (figure7). La manipulation est obligatoirement effectuée sous une hotte bactériologique.



Figure 7 : Mesure de sécurité en unité de BK CHU Dr. Benbadis de Constantine.

5. La recherche des mycobactéries par examen microscopique

5.1. La préparation des frottis

Tous les échantillons pathologiques portés dans des écouvillons ou des seringues sont transvasés dans des tubes coniques portant le numéro d'ordre de ces derniers.

Au moyen d'un diamant-marqueur, nous avons gravé à une extrémité de la lame le numéro d'ordre et l'identification de la séquence et puis vérifié qu'il y a concordance entre les numéros des lames et ceux des tubes coniques. Pour la préparation des frottis, nous avons utilisé des lames neuves.

Le tube conique est soigneusement ouvert afin d'éviter la génération d'aérosols. L'échantillon est étalé régulièrement sur la zone centrale de la lame grâce à un mouvement continu de rotation. Le frottis ainsi préparé est laissé séché sous la hotte puis fixé sur la flamme du bec bunsen.

5.2. La coloration à l'auramine

Nous avons commencé la coloration en plaçant les lames fixées sur le support de coloration selon leur numéro d'ordre, la face d'étalement vers le haut. Les lames sont couvertes d'auramine phéniquée pendant 20 minutes, puis lavés à l'eau de robinet. Ensuite,

les frottis subissent une décoloration avec le mélange acide-alcool durant 4 minutes, puis lavé à l'eau de robinet.

Finalement, nous avons procédé à une contre coloration en recouvrant les lame avec une solution de permanganate de potassium à 1 %. Après 1 minute d'action, le contre colorant est chassé et les lames sont égouttées en position incliné.

À l'aide d'un microscope à fluorescence, et dans une pièce sombre, les BAAR (Bacilles Acido-Alcool Résistants) apparaissent en vert-jaune brillant sur un fond rouge orangé. Cette coloration nous permet une exploration rapide du frottis (3 à 5 minute). Une première lecture est réalisée à faible grossissement : x 25 pour un dépistage rapide puis une confirmation à G x 40. Il est nécessaire d'examiner au minimum 30 champs avant déclaration d'une lame négative (ou il n'y a pas de BAAR).

La coloration à l'auramine améliore la sensibilité de détection des BAAR mais manque de spécificité (faux positifs), il faut donc obligatoirement confirmer un résultat positif par une coloration de Ziehl Neelson.

5.3. La coloration à la fuchsine de Ziehl Neelson

La première étape de la coloration consiste en une coloration à chaud avec de la fuschine phéniquée de Ziehl filtrée sur papier. À l'aide d'un coton monté sur une tige, trempé dans l'alcool et flambe, on chauffe les lames recouvertes de fuschine. Il faut immédiatement arrêter de chauffer dès l'émission de vapeur. On laisse agir trois minutes, ensuite on chauffe une deuxième fois, puis une troisième fois en laissant agir à chaque fois pendant trois minutes. Après les dix minutes de coloration, les lames sont rincées l'eau de robinet.

La deuxième étape consiste à couvrir la lame d'acide sulfurique dilué au quart (à 25 %) pendant trois minutes. Après lavage à l'eau, on recouvre la lame avec de l'alcool à 95° pendant 5 minutes puis rinçage à l'eau. Le frottis est alors légèrement rose ou incolore, l'étape est considérée comme une décoloration.

La dernière étape est dite l'étape de la contre coloration. On couvre la lame de bleu de méthylène. Après 30 secondes à 1 minute, on lave et on laisse à séché.

L'examen microscopique est réalisé avec un microscope optique à l'objectif d'immersion. Nous avons examiné au moins 100 champs par lame, ce qui requiert environ

15 minutes avant de déclarer la négativité d'une lame. Les BAAR apparaissent roses sur fond bleu.

6. La recherche des mycobactéries par cultures

6.1. Les échantillons prélevés de sites stériles

Les échantillons stériles tel que le liquide céphalorachidien (LCR), le liquide d'ascite, le liquide pleural, le liquide péricardique et les liquides synoviaux ne subissent pas une décontamination. L'ensemencement se fait directement sur milieu Lowenstein - Jensen (LJ).

6.2. Les échantillons prélevés de sites non stériles

Les échantillons non stériles tels que les urines, le pus et les biopsies doivent subir une décontamination avant leur mise en culture. Cette étape a pour but d'éliminer la flore commensale des échantillons qui envahirait les milieux de culture avant la détection des mycobactéries. Pour se faire, nous avons versé l'échantillon dans un tube conique et nous avons ajouté quelques gouttes de NaOH à 6 % et puis quelques gouttes de bleu de bromothymol (BBT). Après 30 à 45 minutes d'incubation à 37 °C, nous avons ajouté quelques gouttes de NaOH à 6 % puis du H₂SO₄ à 4 %.

Pour les biopsies (échantillons solides) tels que les biopsies coliques, nous avons tout d'abord broyé l'échantillon avec du sable stérile dans un mortier stérile. Par la suite, nous avons ajouté 2 ml d'acide sulfurique à 4 % plus 2 gouttes de bleu de bromothymol. Après dix minutes d'action à température ambiante, la neutralisation est faite avec de la soude à 6 % jusqu'au virage à un vert clair.

6.3. La culture sur le milieu lowenstein Jensen

Lowenstein Jensen (LJ) est un milieu d'enrichissement, sélectif à base d'œuf qui permet le bon développement des mycobactéries. Les géloses, de couleur verte, sont présentées sous forme incliné dans des tubes à vis.

La technique d'inondation est adoptée comme technique d'ensemencement afin d'augmenter la probabilité de croissance des bactéries dans l'échantillon. Après l'inondation, nous avons dévissé légèrement les tubes durant les premières 48 heures afin de permettre l'évaporation de l'excès d'humidité, et puis les incubées durant 72 jours à 37 °C.

Après 48 heures d'incubation le contrôle de la qualité de la décontamination par la recherche de colonies à croissance rapide et/ou le changement de couleur du milieu de culture est effectué. Ainsi les tubes contaminés sont éliminés tout en les notant dans le registre. Si tous les tubes du même patient sont contaminés un nouveau prélèvement est demandé.

La 1^{ère} lecture est réalisée au 28^{ème} jours d'incubation par la recherche, à l'œil nu, de colonies à la surface des milieux culture. En cas d'apparition de colonies caractéristiques des mycobactéries, un frottis à partir d'une parcelle de colonie est effectué par la méthode de Ziehl-Neelsen pour vérifier la présence de BAAR afin de déclarer la positivité de la culture.

Le résultat quantitatif est donné, par dénombrement de colonies par tube de Löwenstein-Jensen.

Si la culture est négative les tubes sont remis à l'étuve et sont examinés lors de la 2^{ème} lecture après 42 jours d'incubation. La 3^{ème} lecture (la dernière) se fait au 72 jours car certaines mycobactéries mettent beaucoup plus de temps pour apparaître.

7. Culture avec le système automatisé

L'instrument BD BACTEC MGIT 960 utilise une technologie non radiométrique, basé sur la fluorescence. Les micro-organismes présents dans les échantillons métabolisent les nutriments et l'oxygène présents dans le milieu de culture. Les tubes contiennent un détecteur fluorescent qui réagit en fonction de la concentration en oxygène du milieu de culture. Les détecteurs photosensibles de l'instrument mesurent l'intensité de la fluorescence, laquelle correspond à la quantité d'oxygène consommée par les micro-organismes. La détection par l'instrument des micro-organismes se développant dans le milieu de culture est le résultat de la lecture de ces mesures de fluorescence.

La technologie BD BACTEC MGIT est destinée à réduire le délai nécessaire entre la réception d'un échantillon et l'obtention des résultats.

La recherche des mycobactéries sur le milieu de base Middlebrook 7H9 avec indicateur de croissance, nécessite l'addition d'un supplément d'enrichissement OADC et un complexe d'antibiotique PANTA.

Le supplément de croissance est ajouté de façon à apporter les éléments essentiels à la croissance des mycobactéries. L'acide oléique est utilisé par le bacille tuberculeux et joue un rôle important dans le métabolisme des mycobactéries. L'albumine agit comme agent protecteur en liant les acides gras libres peuvent être toxiques pour des espèces de *Mycobacterium*, augmentant ainsi leur récupération. Le dextrose est une source d'énergie.

L'addition du complexe d'antibiotiques BD BBL MGIT PANTA est pour réduire la contamination avant l'inoculation avec un échantillon clinique.

7.1. Préparation du complexe d'antibiotique

Nous avons commencé par une reconstitution d'une ampoule lyophilisée de complexe d'antibiotique BD BBL MGIT PANTA avec 15 ml de supplément de croissance BD BACTEC MGIT.



Figure 8 : Le flacon du complexe d'antibiotique



Figure 9 : Le supplément de croissance

7.2. Culture

Pour la préparation des cultures nous avons marqué les tubes MGIT avec le numéro de l'échantillon. À l'aide d'une micropipette, nous avons ajouté de manière aseptique 0,8 ml de supplément de croissance (complexe d'antibiotique BD BBL MGIT PANTA), ensuite 0,5 ml de la suspension concentrée d'échantillon préparée. Les tubes sont fermés hermétiquement et bien mélangés.



Figure 10 : Photographie de l'automate

Les tubes sont placés dans l'instrument BD BACTEC MGIT 960 pour une incubation ininterrompue jusqu'à l'obtention d'un résultat positif ou la fin du protocole d'analyse (42 jours).

7.3. Lecture

Au bout de 10 jours, les tubes positifs, identifiés par l'appareil doivent être repiqués et des frottis pour tester l'acido-résistance doivent être préparés. Les résultats doivent être notés qu'après avoir évalué la coloration de Ziehl Neelson décrit précédemment.

Si le tube apparaît positif : turbidité non-homogène, des petits grains ou des granules sont visible, il doit être repiqué.

À la fin des six semaines d'incubation, si le tube ne montre aucun signe de positivité, un contrôle visuel est obligatoire avant une destruction et une déclaration d'une culture négative.

8. Étude rétrospective

Nous avons effectué une étude rétrospective allant du 01 janvier 2017 au 31 décembre 2018, soit une période de deux ans. Cette étude a porté sur l'ensemble des échantillons destinés au diagnostic bactériologique de la tuberculose extra pulmonaire. Les données (nom, prénom, service, nature d'échantillon) sont recueillies rétrospectivement à partir des registres fournis par les responsables de l'unité de la recherche du BK au CHU Constantine.

Au cours de nos deux mois de stage (1^{er} Mars au 10 Mai de l'année 2019) au sein de l'unité du BK (laboratoire de bactériologie au CHU Dr. Benbadis), nous avons recherché les bactéries du complexe tuberculeux dans des échantillons extra pulmonaire provenant de différents sites anatomiques. D'autre part, et dans la même structure, nous avons essayé d'établir le profil épidémiologique de la tuberculose extra pulmonaire des deux dernières années (du 2 Février 2017 au 31 Décembre 2018).

1. Résultats de l'étude prospective

1.1. Recueil des échantillons

L'étude prospective a porté sur 92 échantillons provenant de patients suspectés d'être atteint d'une tuberculose extra pulmonaire. Nous avons recueilli durant cette période 59 échantillons de patients de sexe féminin et 33 échantillons de patients de sexe masculin.

Les échantillons étaient de 14 nature différente, prélever des sites stériles tel que : liquide céphalorachidien, liquide pleural, liquide d'ascite, liquide articulaire, écoulement mammaire, nodule péritonéale, adénopathie, collection pariétale du flanc gauche, et de site non stérile tel que : les urines, les biopsies, les abcès, les pus, et le prélèvement du cuir chevelu. Le tableau numéro 1 donne le nombre d'échantillons par nature reçus au niveau de l'unité de BK pendant l'étude prospective.

Tableau 1: Nombre d'échantillons réceptionnés lors de l'étude prospective selon la nature du prélèvement.

Type d'échantillon	Nombre échantillons	Pourcentage	Type d'échantillon	Nombre échantillons	Pourcentage
Urine	41	44,56 %	Adénopathie	3	3,26 %
Biopsie	10	10,87 %	Abcès	2	2,17 %
Liquide pleural	9	9,78 %	Écoulement mammaire	2	2,17 %
Liquide D'ascite	7	7,60 %	Liquide péricardique	1	1,08 %
Liquide céphalo-rachidien	6	6,52 %	Collection pariétale du flanc gauche	1	1,08 %
Liquide articulaire	5	5,43 %	Cuir chevelu	1	1,08 %
Pus	3	3,26 %	Nodule péritonéale	1	1,08 %

Le plus grand nombre d'échantillons revient aux urines avec 44,56 % du nombre total d'échantillons reçus, suivi de biopsie avec un pourcentage de 10,87 %, et le liquide

pleural avec 9,78 %, puis le liquide d'ascite avec 7,60 % puis liquide céphalorachidien avec 6,52 % puis le liquide articulaire avec 5,43 %. Les échantillons les moins fréquents ne dépassent pas les 3,26 %. La figure numéro un fait ressortir la fréquence des échantillons d'urines dans les analyses extra pulmonaire de l'unité avec une fréquence moindre pour les biopsies et les liquides pleural, articulaire et d'ascite (figure 11).

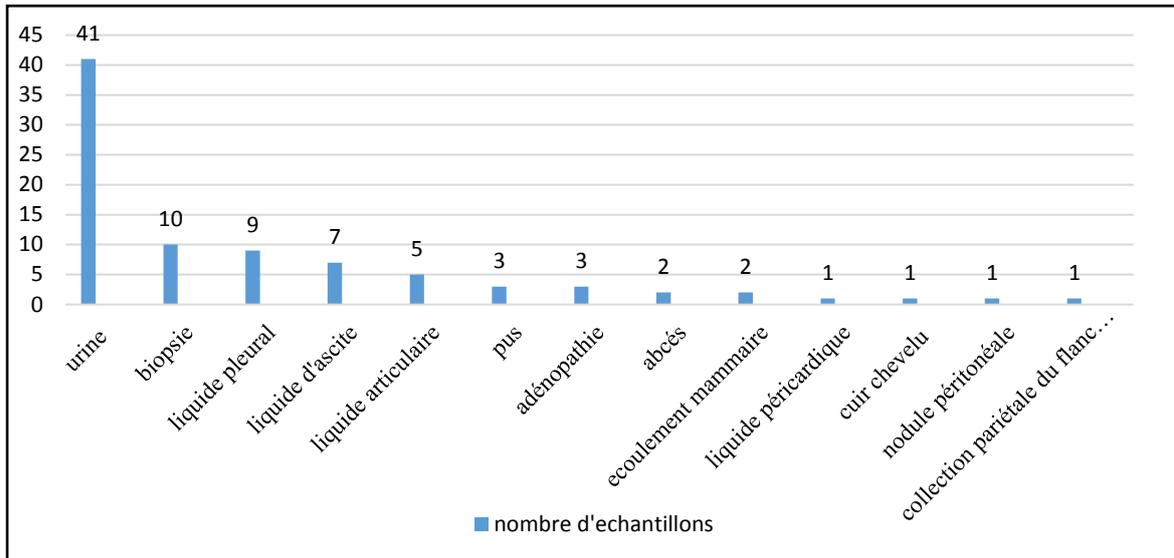


Figure 11 : Fréquences des analyses extra pulmonaire à l'unité de BK.

1.2. Résultats de l'examen microscopique

Après coloration à l'auramine, l'examen microscopique des frottis nous indique la présence des bacilles jaunes fluorescents sur un fond noir. L'action conjointe de l'acide dilué et de l'alcool n'empêche pas les BAAR à retenir le colorant d'auramine. Cette propriété est utilisée pour la détection des BK par microscopie sur des frottis de produits pathologiques. L'acido-alcool-résistance des bacilles est l'un des critères de définition du genre *Mycobacterium*, il leur est conférée par leur paroi dont la composition est particulièrement complexe (riche en lipides principalement les acides mycoliques). Durant notre période de stage, aucune lame de frottis confectionnée d'échantillons extra pulmonaires n'a présentée des BAAR.

1.3. Résultat des cultures

Après 72 jours d'incubation à 37 °C, l'examen macroscopique des cultures sur Lowenstein Jensen, indique la présence, dans certains tubes, des colonies blanc-ivoire (figure 12), rugueuses et adhérentes au milieu d'un diamètre de 2 à 4 millimètres d'un aspect en chou-fleur.



Figure 12: Examen macroscopique des cultures après 72 jours d'incubation à 37 °C. (a) Culture indénombrable. (b) : Culture dénombrable.

Après la coloration de Ziehl Neelson des frottis confectionnés à partir des colonies présentes sur LJ ou bien prélevés des tubes MGIT, l'examen microscopique nous a confirmé la présence des bacilles souvent d'aspect granuleux et parfois regroupés en faisceaux ou en cordes, et souvent flexueux pour les formes longues de 2 à 4 μm . Les bactéries apparaissent en couleur rose sur un fond bleu déclarant ainsi la positivité des cultures en faveur de *Mycobacterium tuberculosis*.

La figure suivante montre les BAAR avec leur propriété acido-alcool résistance c'est-à-dire leur capacité à former des complexes stables avec des colorants basiques (fuschine) qui persistent malgré la double action de décoloration de l'alcool et des acides forts.

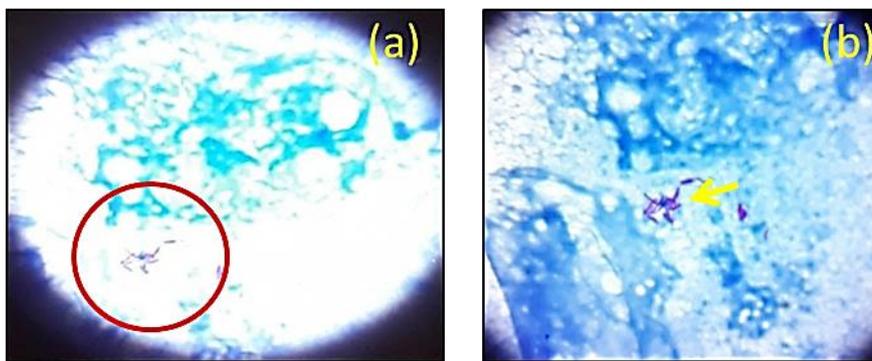


Figure 13 : Examen microscopique après coloration Zeihl Neelson (grossissement X 100). (a) : Amas de bacille ; (b) : Agrandissement de la zone encadrée en rouge en figure a.

En combinant les résultats des examens microscopiques aux résultats des cultures, nous avons pu déclarer seulement cinq cas positifs contre un total de 92 échantillons extra pulmonaire examinés avec un pourcentage de 5,43 %, ce qui confirme la pauvreté des échantillons extra pulmonaire en bacilles tuberculeux.

Tous les cas positifs sont des patients de sexe féminin séjournant aux différents services du CHUC (tableau 2). Le mois de mars a eu une prédominance en termes de cas positifs avec un nombre de quatre.

Les colonies de *M. tuberculosis* ont été isolées de quatre échantillons différents (voir le tableau suivant). 40 % des cas ont été identifiés à partir des liquides céphalo-rachidiens.

Tableau 2 : Cas positifs déclarés en mois de mars et avril de l'année 2019.

Service	Mois	Nature de l'échantillon	Nombre de colonies
Pédiatrie	Mars	Liquide articulaire	MGIT ⁺
Neurologie	Mars	Liquide céphalorachidien	MGIT ⁺
Chirurgie	Mars	Nodule péritonéale	5 colonies
Infectiologie	Mars	Liquide céphalorachidien	MGIT ⁺
Médecine Interne	Avril	Collection pariétale du flanc gauche	MGIT ⁺

MGIT⁺ : résultats positifs sur appareil MGIT

Toutes les cultures positives sur MGIT ont été confirmées par un examen microscopique après coloration spécifique de Ziehl Neelson. D'autre part elles seront comparées avec les résultats des cultures sur LJ.

La culture avec le système BD BACTEC MGIT 960, nous a été d'une grande aide. Nous avons pu confirmer 80 % cas d'infection avec *M. tuberculosis* en utilisant l'automate BD BBL MGIT contre seulement 20 % par culture sur LJ. Cette technique de culture a prouvé son efficacité et sa grande sensibilité à détecter la présence des mycobactéries dans les échantillons pauci bacillaires.

2. Résultats de l'étude rétrospective

2.1. Paramètres épidémiologiques de la population étudiée

Durant les deux années 2017 et 2018, l'unité de la tuberculose a enregistré la manipulation de 1215 échantillons d'origine extra pulmonaire pour une recherche spécifique de BK. Un nombre de 581 échantillons ont été analysés durant l'année 2017 et 634 échantillons durant l'année 2018.

Le plus grand nombre d'échantillons réceptionnés a été enregistré pour le mois de Décembre de l'année 2018 avec un nombre de 76. Le nombre le plus bas a été enregistré en mois de Mai de la même année avec 22 échantillons (tableau 3).

Tableau 3 : Nombre d'échantillons extra pulmonaire par mois, analysé à l'unité de la tuberculose CHUC durant les deux années 2017- 2018

	Jan	Fév	Mars	Avril	Mai	Juin	Juil	Aout	Sept	Oct	Nov	Déc
2017		66	75	69	54	27	66	42	35	62	36	49
2018	49	48	49	42	22	28	68	66	52	72	62	76

La figure 14 nous confirme que la maladie n'a pas de relation avec les saisons.

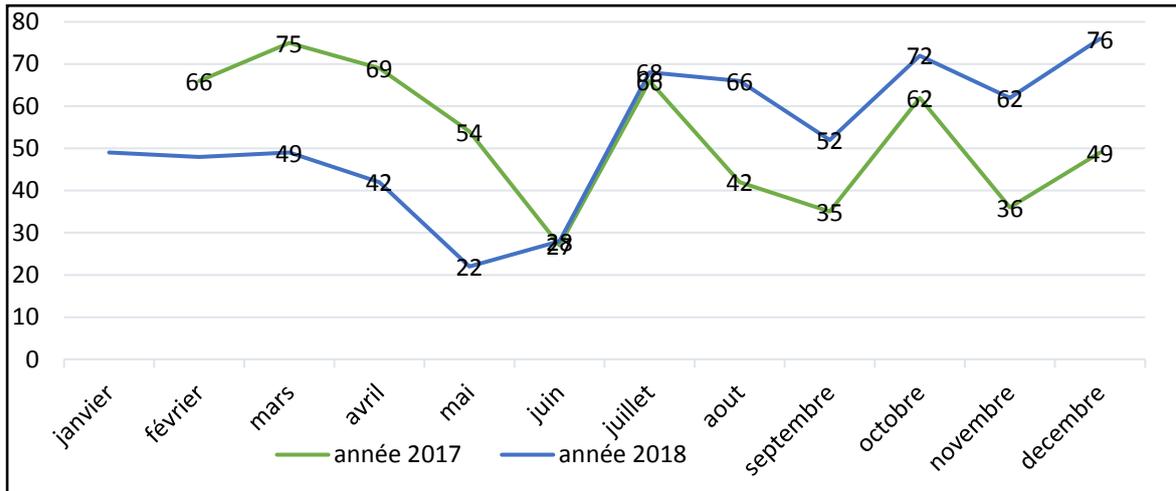


Figure 14 : Le nombre d'échantillons réceptionnés au niveau de l'unité de la tuberculose par mois (du Février 2017 au Décembre 2018).

Parmi 1215 échantillons 690 sont de patient de sexe féminin et 525 sont de patients de sexe masculin. Comme il est illustré sur la figure numéro deux, le nombre des prélèvements provenant des femmes et majoritairement plus élevé que celui des hommes et cela est valable pour les deux années.

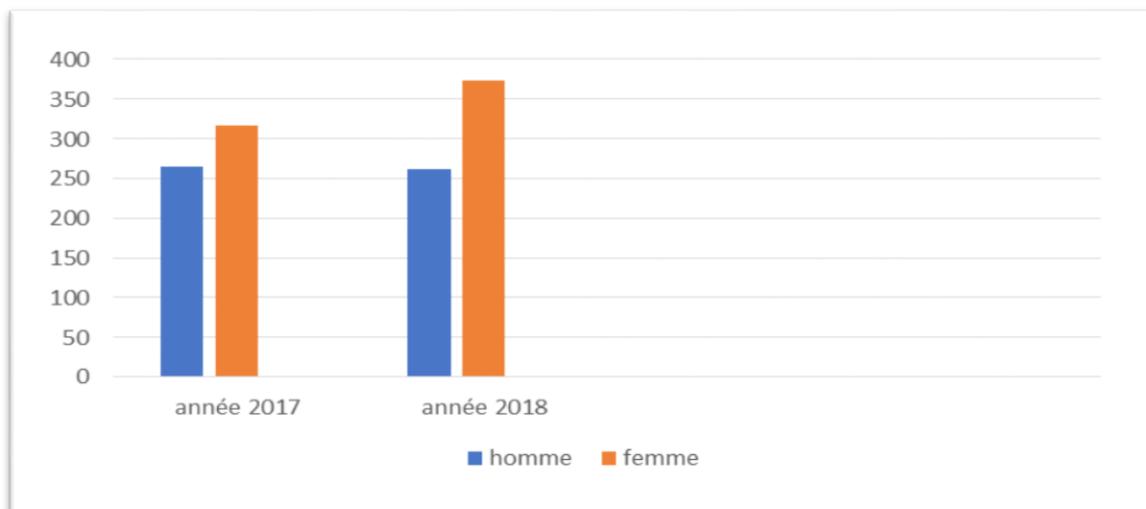


Figure 15 : Comparaison des deux sexes durant les deux ans.

Le tableau numéro quatre donne le nombre d'échantillons analysé par mois selon le sexe des patients.

Tableau 4: Le nombre d'échantillons réceptionné par mois selon le sexe des patients.

	Jan	Fév	Mars	Avril	Mai	Juin	Juil	Aout	Sep	Oct	Nov	Déc
♀	34	71	77	57	41	17	77	59	48	73	54	82
♂	15	43	47	54	35	38	57	49	39	61	44	43

Parmi les échantillons les plus recueillis au niveau de l'unité, les urines occupent la première place devant les autres types d'échantillons avec 35,06 % suivi du LCR avec 19,91 % puis le liquide pleural avec 12,09 % et en fin le pus avec 10,12 %. Les échantillons moyennement recueilli représentent 4,20 % des prélèvements, il s'agit des biopsies, des abcès, des ADP et des liquides d'ascite. Les échantillons réceptionnés uniquement au cours de l'année 2018 comme les moelles osseuses et les écoulements mammaire ne dépassent pas les 0,08 % du total des échantillons (tableau 5).

Tableau 5 : Le nombre d'échantillons par nature durant les deux années de l'étude.

Echantillon	Année		Nombre total
	2017	2018	
Urine	189	237	426
LCR	120	122	242
Liquide pleurale	71	76	147
Liquide synovial	9	20	29
Abcès	23	21	44
Liquide ascite	42	32	74
Adénopathie	19	23	42
Biopsie	28	23	51
Pus	69	54	123
Liquide péricardique	1	6	7
Écoulement mammaire	0	6	6
Sang de règle	0	1	1
Liquide broncho alvéolaire	0	1	1
Ulcération cutanée	0	1	1
Liquide des branches	0	1	1
Collection axillaire	0	1	1
Fistule anale	0	1	1
Ponction de genou	0	2	1
Muqueuse rectale	0	1	1
Moelle osseuse	0	1	1
Collection péritonéale	0	3	3

D'après le tableau 3 il ressort que parmi un 624 échantillons prélevé de sites stériles, les échantillons du LCR viennent en tête des échantillons stériles avec 57,21 % et ce surtout pendant l'année 2018 avec 37,98 % suivi des échantillons du liquide pleural qui est similaire pendant les deux années de l'étude avec 23,56 % puis ceux du liquide d'ascite avec 11,86 % et des adénopathies avec 6,73 % du liquide synovial avec 4,64 % en fin viennent les échantillon du liquide péricardique avec 1,12 %. Ce dernier avec la membrane péritonéale est présent uniquement au cours de l'année 2018 (figure16).

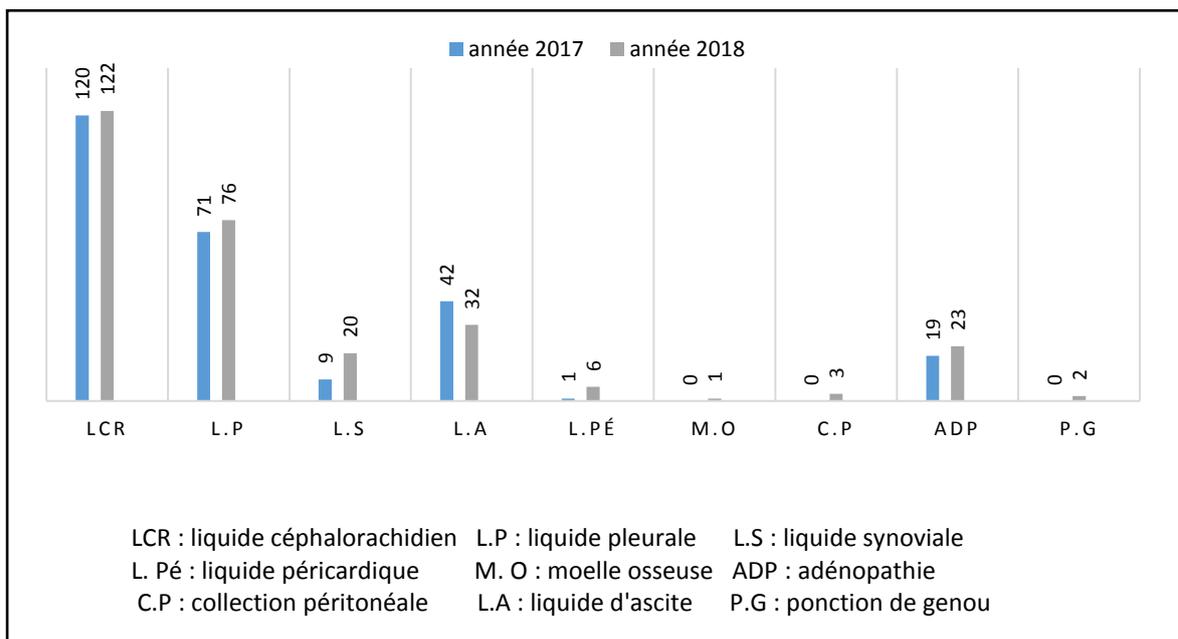


Figure 16 : Histogramme représentant le nombre d'échantillons prélevé de sites stériles au cours des années 2017 et 2018.

En ce qui concerne les 649 échantillons prélevés de sites non stériles, l'urine a pris le dessus sur les autres échantillons avec 65,63 %. Parmi ses derniers 36,52 % correspondent à l'année 2018. Les échantillons de pus avec 19,95 % viennent en seconde position suivies des biopsies et les abcès d'ailleurs très proches. Finalement les autres échantillons tel que le sang des règles, le liquide broncho-alvéolaire, les écoulements mammaire les ulcérations cutanées, la fistule anale et la muqueuse rectale ne dépassent pas les 0,15 % (figure 17).

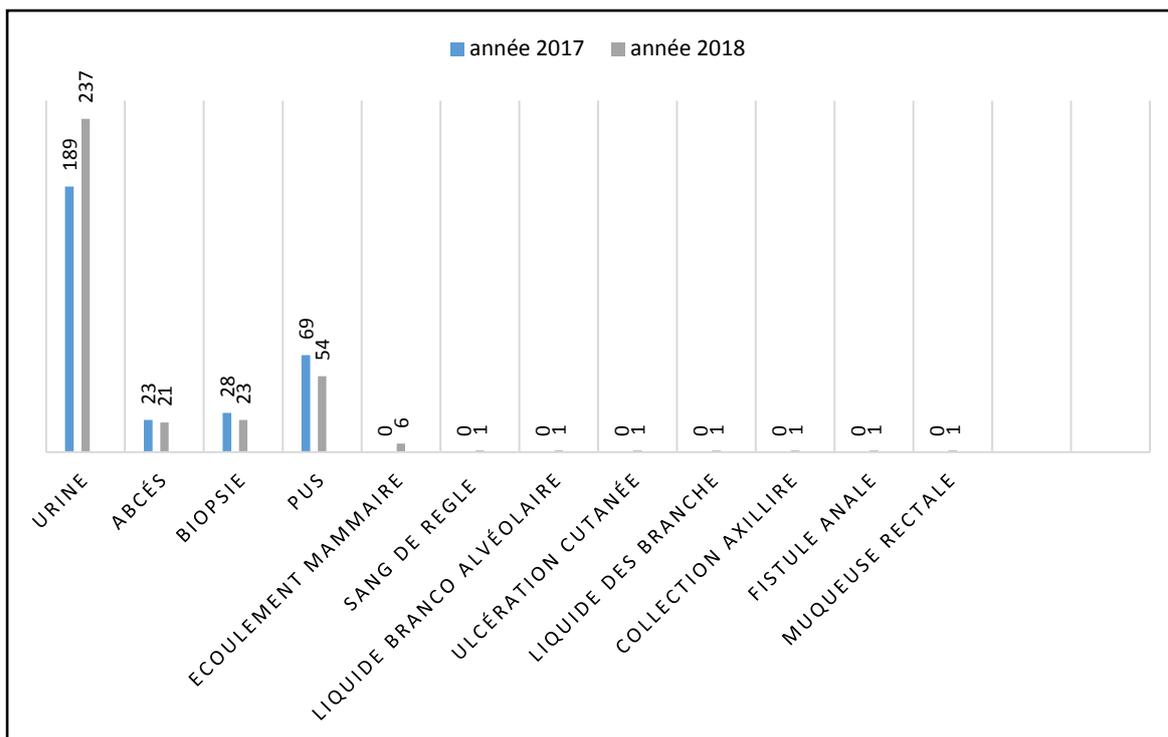


Figure 17 : Histogramme représente les échantillons non stériles durant les deux ans.

2.2. Répartition des cas positifs selon le sexe

L'analyse microbiologique des échantillons a révélé 15 cas positifs en faveur d'une tuberculose (tableau 6) réparties comme suit : 4 cas en 2017 et 11 cas en 2018 dont huit cas sont de sexe masculin et sept cas de sexe féminin.

Tableau 6: Le nombre des cas positifs selon le sexe des patients

Sexes	Cas positif 2017	Cas positif 2018	Total
Homme	3	5	8
Femme	1	6	7

2.3. Répartition des cas positifs selon la nature des échantillons et leur structures d'envoi

Le tableau 7 regroupe les cas positifs avec la nature des échantillons sur lesquels ont été détecté et les services d'envois.

Tableau 7: Cas positifs durant les deux ans

Années 2017					Année 2018				
Sexe	Service	Mois	Nature du prélèvement	Nombre de colonies	Sexe	Service	Mois	Nature du prélèvement	Nombre de colonies
♂	CTX	Avril	Pus	300 colonies	♀		Avril	Pus	+ 50 colonies
♀	CTX	Aout	LCR	200 colonies	♂	4FA	Mai	LCR	+ 50 colonies
♂	CTX	Sep	Abcès	60 colonies	♂	4FA	Mai	LCR	10 colonies
♂	CTX	Mai	LCR	60 colonies	♂	Gastro	Aout	Urines	12 colonies
Service : CTX : infectiologie Gastro : gastrologie 4FA : pédiatrie TA : traitement ambulatoire Nature d'échantillons : LCR : liquide céphalorachidien ADP : adénopathie L. pleural : liquide pleurale					♀	TA	Sep	Abcès	100 colonies
					♂	CTX	Sep	Abcès	100 colonies
					♂	TA	Sep	Urines	+9 colonies
					♀	TA	Sep	ADP	+17 colonies
					♀	TA	Oct	ADP	MGIT +
					♀	TA	Oct	L.pleural	MGIT +
					♀	CTX	Nov	Abcès	11 colonies

Parmi les six types d'échantillons la plupart des cas positifs appartiennent aux échantillons des LCR et des abcès avec quatre cas pour chacun d'eux. Deux LCR sont prélevés durant l'année 2017 et deux au cours de l'année 2018. Un abcès prélevé de l'année 2017 et trois l'année 2018. Quant à l'adénopathie deux échantillons seulement ont été reçu l'année 2018 et aucun l'année 2017. Deux cas d'urines ont été obtenu l'2018, et deux cas de pus un en 2017 et un en 2018. En fin un seul cas de liquide pleural en 2018 (figure18).

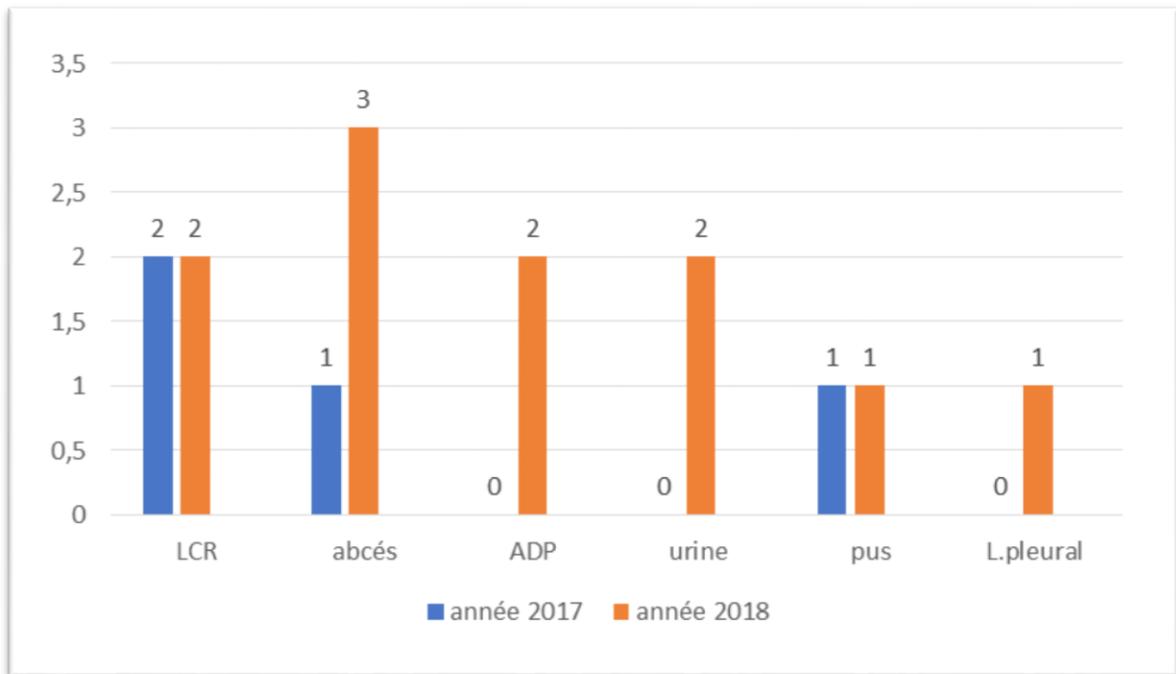


Figure 18: Nombre de cas positive selon le type d'échantillon.

La plupart des cas positifs font partie du service infectiologie avec six cas, suivi du service traitement ambulatoire avec cinq cas, service pédiatrie deux cas et un seul du service de gastrologie.

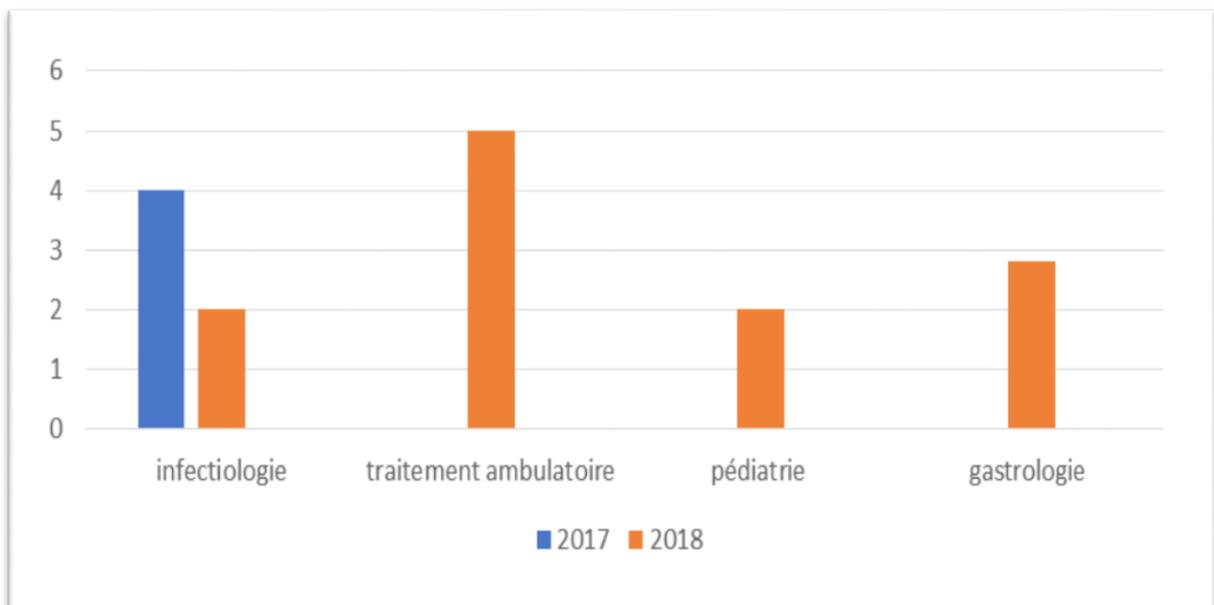


Figure 19: Nombre de cas positive selon les services

Durant deux mois de stage au niveau du CHU Ben Baddis du 1^{er} mars 2019 jusqu'au 10 mai de l'année 2019, 92 échantillons différents ont été examinés. Les échantillons étaient de 14 natures différentes. 44.56 % étaient des urines, 13.04 % étaient des liquides pleuraux, 10.86 % étaient des biopsies. Les liquides céphalo- rachidien et d'ascite étaient avec des pourcentages proche ente 6 et 7 %, les abcès et les liquides articulaires avec le même pourcentage 5.43 %, et le reste des échantillons comme les adénopathies, des écoulements mammaires, les nodules péritonéaux étaient avec des pourcentages faible inférieur à 3 %.

Parmi ces échantillons, cinq ont été déclarés positif, un liquide articulaire, deux LCR, un nodule péritonéal et le dernier d'une collection péritonéale de flan gauche. Ces échantillons appartenaient à cinq patients différents. Nous avons remarqué une prédominance du sexe féminin avec 64,13 % contre 35,86 % de sexe masculin.

Pour l'étude rétrospective nous avons pu colliger 1215 dossiers des patients ayant consulté durant les deux dernières années 2017 et 2018. Le nombre des patientes était de 690 supérieurs à celui des patients qui était de 507. L'analyse des résultats a montré que l'échantillon le plus examiné était l'urine avec un pourcentage de 35,06 % du nombre total d'échantillons reçus au niveau de l'unité.

Au terme de cette étude, 15 cas positifs ont été déclarés avec un pourcentage de 1,23 %. Huit cas de sexe masculin et sept cas féminin.

Notre étude fait apparaitre clairement que les techniques conventionnelles de microscopie et de culture demeurent indispensables pour le diagnostic de certitude de la tuberculose maladie. Mais le problème demeure en l'absence de détection précoce de la tuberculose et d'un traitement long qui oblige le patient à ne pas suivre ce traitement, ce qui entraîne une résistance aux médicaments antituberculeux.

Ait-Khaled N. et Enarson D. (1999). Tuberculose : manuel pour les étudiants en médecine. Stop TB Initiative & International Union against Tuberculosis and Lung Disease. Organisation mondiale de la Santé. Genève.

Dr. N. BENAMROUCHE. (2015). Faculté de médecine d'Alger. Cours de Microbiologie pour les étudiants de 3^{ème} année.

Coggin, J. H. J. (2006). Bacterial Pathogens. In Flemming, D.O., and Hunt, D.L (Ed.), Biological Safety: Principles and practices 4th ed. Washington D.C.: ASM Press.93-114.

Grange J. M.; Daborn C. & Cosivi O. (1994). HIV-related tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*. European Respiratory Journal, 7(9), 1564-1566.

Lauzardo, M. and Rubin, J. (1996). Mycobacterial Disinfection. In S. S. Block (Ed.), Disinfection, Sterilization, and Preservation 5th ed. Philadelphia P.A.: Lipincott Williams and Wilkins.513-528.

Pfyffer G.E. (2007). *Mycobacterium*: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Landry, M.L., Jorgensen, J.H. and Pfaller, M.A., Eds., Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition, American Society for Microbiology Press, Washington DC, 543-572.

Web graphie :

Site web 1 : Cours mycobactéries <http://microbia.free.fr/TS2ABM/Mycobacteries/Cours-Mycobacteries.pdf>, 6-16-2019,7.42

Site web 2:<https://www.pourquoidocteur.fr/MaladiesPkoidoc/740-Tuberculose-une-des-maladies-contageuses-les-plus-meurtrieres-au-monde>

Site web 3: "<https://www.em-consulte.com/rmr/article/143749>"

Site web 4:"<http://sante.lefigaro.fr/sante/maladie/tuberculose/quels-sont-signes>"

Site web 5:"<http://www.medecine.ups-tlse.fr/DCEM2/MODULE7/item106/indexI1.htm>"

Site web 6 :"https://www.ohmymag.com/sante/tuberculose-symptomes-definition-traitement-transmission-de-quoi-s-agit-il_art99675.html"

Site web 7: "<https://therapeutesmagazine.com/tuberculose-osteo-articulaire/>"

Site web 8: https://www.vulgarismedical.com/encyclopediemedicale/meningite_tuberculeuse/examen-medical

Site web 9: https://en.wikipedia.org/wiki/Ziehl%E2%80%93Neelsen_stain

Site web 10: <http://microbia.free.fr/TS2ABM/Mycobacteries/Cours-Mycobacteries.pdf>

Site web 11: <http://www.bacteriainphotos.com/Mycobacterium%20tuberculosis.html>

Site web 12: <https://www.revmed.ch/RMS/2012/RMS-356/Lymphadenite-tuberculeuse-cervicale-et-reaction-paradoxe-diagnostic-et-traitement>

Site web 13 : [https://www.semanticscholar.org/paper/HistoricalaspectsOfPott%E2%80%93Disease\(spinalTuli/b318959f0ca5c67c528cd102b2188ad7e14bd2fd/figure/4](https://www.semanticscholar.org/paper/HistoricalaspectsOfPott%E2%80%93Disease(spinalTuli/b318959f0ca5c67c528cd102b2188ad7e14bd2fd/figure/4)

Annexe 1 : Réactifs de Ziehl-Neelsen**-La fuchsine phéniquée de Ziehl**

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

-Le bleu de méthylène

Bleu de méthylène	20 mg
Phénol aqueux	22 mL
Alcool à 95°	100 mL
Eau distillée	500mL

-Acide sulfurique à 15%

H ₂ O distillée	850 mL
H ₂ SO ₄	150 mL

Annexe 2 : réactif du BD BACTEC MGIT 960**-BD BBL MGIT**

Formule approximative par litre d'eau purifiée

Bouillon de base Middlebrook7H9 modifié.....	5,9 g
Peptone de caséine.....	1,25 g

-Supplément de croissance BD BACTEC MGIT

Formule approximative par litre d'eau purifiée

Albumine bovine.....	50,0 g
Dextrose.....	20,0 g
Stéarate de polyoxyéthylène(POES).....	1,1 g
Catalase	0,03 g
Acide oléique.....	0,1 g

-L'ampoule de BD BBL MGIT PANTA

Formule approximative par ampoule lyophilisée PANTA

Polymixine B.....	6000 unités
Amphotéricine B	600 µg
Acide nalidixique.....	2400 µg
Triméthoprime	600 µg
Azlocilline.....	600 µg

Année universitaire : 2018/2019

Présenté par : HARIECHE Roumeissa
TALEB Hind

**LA TUBERCULOSE EXTRA-PULMONAIRE À L'UNITÉ DE LA
TUBERCULOSE LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE CHU DR. BENBADIS
CONSTANTINE. ÉTUDE RÉTROSPECTIVE DE DEUX ANS**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Ecologie microbienne

Résumé

La tuberculose est une maladie infectieuse provoquée par des mycobactéries du complexe tuberculeux principalement *Mycobacterium tuberculosis*. Elle touche principalement les poumons mais peut aussi atteindre d'autres organes. La tuberculose extra pulmonaire est beaucoup plus problématique dans les pays en voie de développement, notamment en Afrique. Nos travaux ont consisté en une étude réalisée pendant trois mois dans l'unité de la tuberculose du laboratoire de bactériologie CHU Dr. Benbadis Constantine. Durant cette période, 92 échantillons extra-pulmonaires ont été examinés par les techniques conventionnelles de la microbiologie. Cinq cas positifs ont été déclaré, tous de sexe féminin. L'étude rétrospective descriptive a porté sur 1215 échantillons extra pulmonaires diagnostiqués entre le 1^{er} février 2017 et le 31 décembre 2018. Seulement 15 cas positifs ont été déclarés avec un pourcentage de 1,23 %. Huit cas de sexe masculin et sept cas de sexe féminin. Dans notre étude nous avons pu détecter six cas positifs grâce à l'utilisation de l'automate BD BACTEC MGIT 960 qui offre un système spécifiquement dédié aux mycobactéries des résultats fiables et rapides grâce une détection précoce de la croissance.

Mots clés : *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculose extra pulmonaire, Ziehl Neelsen, Auramine.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de génie microbiologique et applications

Jury d'évaluation :

Président du jury : SAMRA Zahia (Pr. – Univ3 Constantine),
Rapporteur : OULMI Lamia (MCB - UFM Constantine 1),
Examineur : MEZIANI Meriam (MAA - UFM Constantine 1).

Date de soutenance : 09/07/2019