

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2018

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biotechnologie microbienne

Présenté par :

MARDJI Messaouda.

Thème

***EVALUATION DES METHODES DE DIAGNOSTIC
DES PATHOLOGIES MICROBIENNES UTILISEES
DANS LE MILIEU HOSPITALIER EN ALGERIE ET
ETUDE RETROSPECTIVE SUR LA TUBERCULOSE***

Soutenu le : 30/ 06 / 2018

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mr. ARAB A.

MCB

Univ. de Bouira

Président

Mr. CHERGUI A.

MAA

Univ. de Bouira

Promoteur

Mme. MEDBOUA C.

MAA

Univ. de Bouira

Examinatrice

Année Universitaire : 2017/2018



Remerciements

Nous tenons à exprimer notre gratitude et nos remerciements pour le bon dieu le tout puissant de nous avoir donné la force et le courage de terminer nos études

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de monsieur chergui Achour, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Notre vif remerciement pour les membres du jury à commencer par :

Mr.ARAB A pour avoir accepté de présider notre jury et consacré de son temps à la lecture de notre mémoire pour y apporter les meilleurs perfectionnements.

A Meme MEDBOUA C pour sa contribution à ce jury et pour avoir donné son appréciation sur le contenu de ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs et enseignants du département de biotechnologie microbienne de l'université akli mohaned oulhadj de bouira, qui n'ont pas ménagé aucun effort pour nous avoir permis d'acquérir toutes ces connaissances durant notre formation.

Nous ne saurons terminer sans remercier également tous les membres du service de SCTMR, de CTS et de Laboratoire d'urgence de l'EPH lakhdaria. pour leurs aides et conseils et pour nous avoir facilité l'accès au laboratoire et la réalisation de ce travail.

En fin Nos remerciements toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration et l'achèvement de ce travail.





Dédicace



C'est avec toute l'ardeur de mes sentiments que je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents ma mère YESSAD Hadjila et mon père Abdelkader, Pour leur patience, leur amour, leur soutien et leurs encouragements, aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritées ; pour tous les sacrifices qu'ils n'ont cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Que Dieu me les garde et les protège

A mes frères et leurs femmes qui m'ont toujours encouragé et m'ont tendu la main dans les moments difficile.

A mes chères sœurs : zohra, fatiha, fatma, fahima pour leur aide et soutien durant tout mon cursus je vous lui souhaite que du bonheur et de prospérité.

A notre très chères petites : Anis, Imane, Wissam, Nour elyakine, Ferial, Hanna, Meriem, Mammoune, Salaheddine, Youcef.

Exceptionnellement à notre petite étoile Besma sans oubliée
Abdelhak et ryma et sofiane .

A mes chers collègues de travail : Sans votre patience, votre amitiés, votre encouragements et votre aides je ne pouvais pas continue mes études merci beaucoup.

Enfin, je voudrais dédier ce mémoire à toute personnes ayant participé de loin ou de près à la réalisation de ce travaille.



LISTE DES ABREVIATION

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide desoxyribonucleique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ANOFEL : Association française des enseignants et praticiens hospitaliers titulaires de Parasitologie et mycologie médicale.

ARN: Acide ribonucleique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNr : acide ribonucléique ribosomique

ARNt : acide ribonucléique de transfert.

Ag HBs :antigene de surface de l'hepatite B.

BAAR : Bacille Acido-Alcool-Résistant.

BET : Bromure d'éthidium

BCG : vaccin Bilié de Calmette et Guérin

CTS : Centre de transfusion sanguine.

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

ECBU : Examen Cytobactériologique Des Urines.

EPSP : Etablissement l'établissement de proximité de santé public.

GN : Gélose Nutritive.

HBV : Virus de l'hepatite B

HCV : Virus de l'hepatite C

HIV : Virus d'Immunodéficience Humaine.

HRP : Horse Radish Peroxydase

HSV : virus herpés simplex

HBV : Virus de l'hepatite B

HCV : Virus de l'hepatite C

HIV : Virus d'Immunodéficience Humaine.

HRP : Horse Radish Peroxydase.

HSV : virus herpés simplex.

Ig: immunoglobuline.

MB: *Mycobacterium bovis*

MT : *Mycobacterium tuberculosis*

OMS : Organisation Mondiale de la Sante

PCR : Polymerase chain reaction

PVDF : polyvinylpyrrolidone.

RT-PCR : reverse transcription - Polymerase Chain Reaction.

SCTMR : Service de Contrôle de la Tuberculose et des Maladies Respiratoires.

SDS : sodium dodécylsulfate.

SDS-PAGE :sodium dodécyl sulfate – polyacrylamide gel electrophores.

SEM : Scanning Electron Microscope.

TB: Tuberculose.

TBP: Tuberculose pulmonaire.

TEM : Le microscope électronique à transmission.

TEP: Tuberculose extrapulmonaire.

TMB:Tetra methyl bénydine.

TSI : Three Sugar Iron.

Liste des figures

Figure 01: Structure d'une bactérie.....	02
Figure 02 : Classification des virus.....	06
Figure 03 : Principe d'une puce à ADN.....	19
Figure 04 : la réaction de Rivalta.....	27
Figure 05 : Les différentes étapes de la recherche de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dans le prélèvement de crachat. (Coloration de ZIEHL NEELSEN).....	37
Figure 06: Aspect du milieu TSI avec <i>Klebsiella sp</i>	40
Figure07: Test Uréase.....	41
Figure 08 : LCR xanthochromique après coloration de MGG.....	42
Figure 09 : La Distribution des cas de tuberculose selon localisation.....	46
Figure10 : Distribution des cas de tuberculose pulmonaire selon le sexe.....	47
Figure 11: Répartition de tuberculose pulmonaire par tranche d'âge.....	47
Figure 12: Répartition de la tuberculose extra-pulmonaire selon le sexe	48
Figure 13 : Répartition des cas de tuberculose extra-pulmonaires selon la localisation.....	48

Liste des tableaux

Tableau I : Tableau comparatif des propriétés des exotoxines et des endotoxines.....	04
Tableau II: Notation des résultats de Bacilloscope	38
Tableau III: Résultat de l'étude de l'examen cyto bactériologique d'urine.....	40
Tableau IV: les caractères de la souche isolé.....	41
Tableau V: Résultat de l'examen cytologique de Liquide céphalo-rachidien.....	42
Tableau VI: les Différents syndromes biologiques observés après étude des biochimiques, Cytologiques et bactériologiques de LCR.....	43
Tableau VII : Résultat d'examen cytochimique de liquide pleural.....	44

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....	01
Chapitre I : Les agents infectieux	
1. Les bactéries.....	02
1.1. Classification des bactéries.....	03
1.2. Les bactéries pathogènes.....	03
1.3. Le pouvoir pathogène.....	03
2. Les virus.....	05
2.1. Classification des virus.....	06
2.2 Manifestations cliniques liées aux infections virales.....	07
2.3. Oncogenèse virale.....	08
3. Les champignons.....	09
3.1. Organisation interne d'une cellule fongique.....	09
3.2. Classification des champignons.....	09
3.4. Le pouvoir pathogène des champignons.....	10
4. Les parasites.....	10
4.1. Classification biologique des parasites.....	11
4.2. Action du parasite sur l'hôte.....	11
5-Les Mycobactéries.....	12
6-Les prions.....	12
6.1. Relation hôte prion.....	12
Chapitre II : Les nouvelles approches de diagnostic des pathologies infectieuses.	
1. Les techniques moléculaires d'identification microbienne.....	14
2. Les techniques d'hybridations moléculaires.....	14
2.1. Hybridation ADN/ADN (Southern Blot).....	15
2.2. Hybridation ADN/ARN ou northern blotting.....	15
3. Western blot (immune- empreinte).....	16
4- Amplification par Polymérisation en Chaîne (APC) ou "Polymérase Chain Réaction" (PCR).....	16
5. La RT-PCR.....	17
6 .PCR en temps réel.....	17
6.1. Principe.....	17
6.2. Intérêts de la PCR en temps réel.....	18

6.3. Applications.....	18
7. les puces à ADN et analyse du transcriptom.....	19
8. Le microscope électronique.....	19
Chapitre III : Matériel et méthodes	
1. Matériel	
1.1. Matériel biologique.....	20
1.2. Appareillage.....	20
2.Méthode	
2.1. Etude cytobactériologique des urines.....	21
2.2.Etude cytobactériologique de liquide céphalorachidien.....	24
2.3. Examen cytochimique de liquide d'épanchement (le liquide pleural).....	26
2.4. La sérologie infectieuse par la technique enzyme-linked immuno-sorbente assay(ELISA).	
2.4.1. Le dépistage de l'AgHBs.....	27
2.4.2. Le dépistage de l'anticorps de <i>Treponema pallidum</i> l'agent de syphilis.....	30
2.4.3. Le dépistage de l'anticorps de virus d'immunodéficience acquise(VIH).....	32
2.4.4. Le dépistage de l'anticorps de virus de l'hépatite C.....	33
2.5.le diagnostic de la tuberculose par la bacilloscopie.....	35
2.6. Etude rétrospective de la tuberculose.....	38
Chapitre IV : Résultats et discussion	
1. l'examen cytobactériologique des urines.....	39
1.1. L'examen cytologique.....	40
1.2 La galerie biochimique de souche isolée.....	40
2. L'examen cytologique de Liquide céphalo-rachidien.....	42
3. L'examen cytochimique de liquide pleural.....	44
4. La sérologie infectieuse par la technique ELISA	45
5. La recherche de tuberculose pulmonaire par la bacilloscopie.....	45
6. Etude rétrospective sur la tuberculose.....	46
7. Discussion des résultats d'étude rétrospective sur la tuberculose.....	49
Conclusion.....	51
Références bibliographiques.....	52
Annexe	
Résumé	

Introduction générale

Introduction

Les maladies infectieuses incluant les maladies parasitaires sont un problème majeur de santé publique puisqu'elles représentent encore la deuxième cause de mortalité et de morbidité dans le monde (environ 26% de la mortalité globale: 17 millions de décès/an: source OMS), avec des niveaux différents selon les localisations géographiques et le niveau de développement. La mondialisation, les changements environnementaux, sociétaux, culturels et climatiques modulent l'évolution et l'émergence des maladies infectieuses **(Delfraissy et al., 2013)**.

Les maladies infectieuses ont pour origine un ou plusieurs agents infectieux. Cependant, leur expression est fonction du pouvoir pathogène de ces agents, modulé par un ensemble de facteurs variables dans le temps et l'espace: susceptibilité de l'hôte, facteurs génétiques, environnementaux, immunitaires, culturels et sociaux, interaction avec d'autres pathogènes **(Delfraissy et al., 2013)**.

Les découvertes en microbiologie et maladies infectieuses ont des retombées majeures et multiples dans l'identification des microorganismes connus et de nouveaux microorganismes, dans des maladies sans étiologie connue y compris dans l'implication d'affections chroniques types cancer. Elles contribuent de façon centrale aux avancées des connaissances dans tous les domaines des sciences fondamentales depuis la découverte même de l'origine infectieuse des maladies **(Delfraissy et al.,2013)**.

L'une des maladies infectieuses les plus fréquentes à l'échelle mondiale est la tuberculose. **L'OMS 2017** a déclaré 6.3 millions de nouveaux cas de la tuberculose à travers le monde en 2016 avec une estimation de 10.4 millions de cas avec 490000 sont dus à la tuberculose multi résistante, plaçant la tuberculose parmi les 9 premières causes de mortalité mondiale.

L'objectif de notre étude est d'évaluer les différents techniques d'identification microbienne qui nous permettront de diagnostiquer et de dépister les pathologies infectieuses par l'examen des différents prélèvements biologiques (sang, urine, crachat) et la recherche des différents agents pathogènes. D'autre part, afin d'estimer l'impact de la tuberculose dans la région de lakhdaria et kadiria, nous avons mené une étude épidémiologique rétrospective de la tuberculose en Algérie en prenant l'établissement de proximité de santé public de lakhdaria comme exemple.

Chapitre I

Les agents infectieux

Chapitre I : Les agents infectieux

Un agent infectieux est un organisme, le plus souvent microscopique, qui provoque une infection lorsqu'il pénètre et se multiplie dans l'organisme, les bactéries, les virus, les champignons, et les parasites sont des agents infectieux peuvent exister à l'état latent dans l'environnement ou être transmis par des vecteurs : puce, tique, moustique, etc (EFS, 2010).

Il existe également des micro-organismes de taille inférieure à celle des virus appelés les prions (maladie de Creutzfeldt-Jakob). Il existe aussi les mycobactéries qui sont des hybrides entre bactéries et champignons (Stora, 2013).

1. les bactéries

Les bactéries sont des cellules procaryotes, leur ADN n'étant pas localisé dans un noyau. Beaucoup contiennent des structures circulaires d'ADN extra-chromosomique appelées plasmides. Il n'y a pas d'autres organites dans le cytoplasme que les ribosomes.

De nombreuses bactéries possèdent des flagelles, des pili, ou une capsule à l'extérieur de la paroi. À l'exception des mycoplasmes, les bactéries sont constituées d'une paroi complexe, différente selon que la bactérie est de Gram positif ou négatif. Les bactéries ont une membrane cytoplasmique formée d'une bicouche lipidique associée à des protéines. Dans les deux cas, le composant principal de structure de la paroi est le peptidoglycane, un réseau tridimensionnel de chaînes polysaccharidiques (composées de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique) et d'acides aminés (Tony et Pauls, 1999).

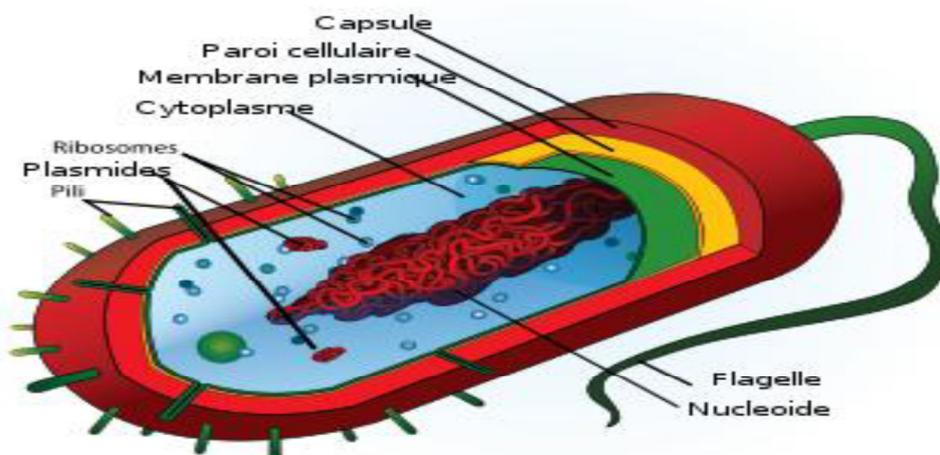


Figure01. Structure d'une bactérie (Le minor et Veron 1989)

1.1. Classification des bactéries

les bactéries peuvent être classées et donc identifiées en fonction de plusieurs paramètres :

- Morphologie microscopique :coque ,bacille,isolé,groupés en deux,en chaînette,en amas.
 - Morphologie macroscopiques :taille-forme-culeur des colonies sur cultureur.
 - Résultat de la coloration de Gram :Gram positif ou négatif.
 - Température de croissance.
 - Besoin respiratoire :aérobie anaérobie stricte,aéroanaérobie facultatif, microaérophile.
 - Mobilité.
 - Présence de spores.
 - Besoins nutritionelle :nécessité des substances Particulieres(**Bouskraoui et al., 2017**).
- et aussi peuvent être classées selon les caractères génotypiques.

1.2. Les bactéries pathogènes

Sont les bactéries qui ont la capacité de provoquer une maladie chez leur hôte on peut distinguer deux types.

- **les bactéries pathogènes spécifiques** : ce sont des bactéries qui provoquent des maladies cliniquement définies et physio- pathologiquement spécifiques.

Exemples : *Salmonella Typhi*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis* (**Delarras, 2014**).

-**les bactéries pathogènes opportunistes** : provoquent des troubles lorsque les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies (on parle aussi de sujets immunodéprimés) ou par modification importante dans leur environnement.

Exemples: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus*, nombreuses *Entérobactéries*, *Enterobacteriaceae* (**Delarras,2014**).

1.3. Le pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène ou pathogénicité d'une bactérie est la possibilité qu'elle a pour provoquer une maladie (**Baudry et al.,2006**).

Le pouvoir pathogène des bactéries s'exprime selon deux grands processus (le pouvoir invasif et le pouvoir toxique) souvent associés, c'est le cas par exemple, chez *Staphylococcus aureus* (**Delarras, 2014**).

1.3.1. Le pouvoir invasif des bactéries

Le pouvoir invasif d'une bactérie est sa capacité à envahir et proliférer rapidement dans les tissus de l'organisme hôte et provoquer une maladie. L'envahissement se fait par trois étapes :

-colonisation et invasion de la peau ou d'une muqueuse notamment par adhésion de la bactérie sur la surface infectés grâce au pili et à l'enveloppe muqueuse pour ensuite atteindre la sous- muqueuse puis les ganglions lymphatiques.

-Les bactéries invasives possèdent généralement des structures d'adhésion aux muqueuses, grâce à des adhésines qui sont des molécules reconnues spécifiquement par des récepteurs des cellules de l'hôte.

-Atteinte des viscères par dissémination sanguine provoquer une bactériémie ou septicémie (Pebret,2003).

1.3.2. La toxinogène ou pouvoir toxique

Les bactéries toxigènes sont des bactéries qui produisent des toxines capables de nuire à l'hôte, même en l'absence du micro-organisme producteur. On distingue deux types de toxines, les exotoxines et les endotoxines. Les exotoxines produites lors de la croissance bactérienne, totalement ou partiellement libérées pendant la croissance du micro-organisme et les endotoxines faisant partie de la paroi bactérienne, et libérées uniquement lors de la destruction du micro-organisme (Baudry et al., 2006).

Les différences entre les exotoxines et les endotoxines sont représentés dans le tableau I
Tableau I:Tableau comparatif des propriétés des exotoxines et des endotoxines (Delarras, 2014)

propriétés	Exotoxines	Endotoxines
-présence dans le milieu de culture	En générale	Non
Nature chimique	Protéines solubles	Complexes glucidolipido-polypeptidiques insolubles
Action de la température.	Thermolabiles, en général.	Thermostables.
Pouvoir toxique	Très élevé	Modéré
Pouvoir antigénique	Très élevé	Faible
Pouvoir vaccinant	Très élevé	Faible
Transformation en anatoxine	Oui	Non

2-Les virus

Les virus sont les plus petits et les plus primitifs des agents infectieux conventionnels. Ils diffèrent de la plupart des bactéries, champignons et protozoaires par le fait qu'ils sont des parasites intracellulaires obligatoires. Les virus ne disposent pas de l'équipement enzymatique nécessaire pour leur réplication. Pour se reproduire, ils doivent donc « pirater » les réserves énergétiques de la cellule hôte, ses acides aminés, ses lipides, ainsi que ses voies métaboliques de biosynthèse. En fait, la plupart des virus possèdent des facteurs qui détournent les processus métaboliques des cellules hôtes, au profit de la production de nouvelles particules virales. Ceci est en partie responsable de la mort des cellules infectées, et contribue aux manifestations cliniques infectieuses (**Tony et Pauls ,1999**).

Les autres différences majeures entre les virus et les micro-organismes plus complexes sont les suivantes :

- un génome viral est constitué d'ARN ou d'ADN, jamais des deux simultanément.
- les bactéries, champignons et protozoaires se reproduisent par scissiparité, tandis que les virus utilisent un mode complexe de désassemblage, réplication et réassemblage au sein de la cellule hôte.
- les virus n'ont ni paroi ni organisation cellulaire, et sont beaucoup plus petits que les autres micro-organismes (**Tony et Pauls ,1999**).

2.1-Classification des virus

La classification des virus est basée sur les caractéristiques de l'acide nucléique, la symétrie de la capsid, la présence ou l'absence d'enveloppe, Le type de l'hôte, Les maladies causées aux plantes ou aux animaux et d'autres propriétés (**Prescott ,2002**).

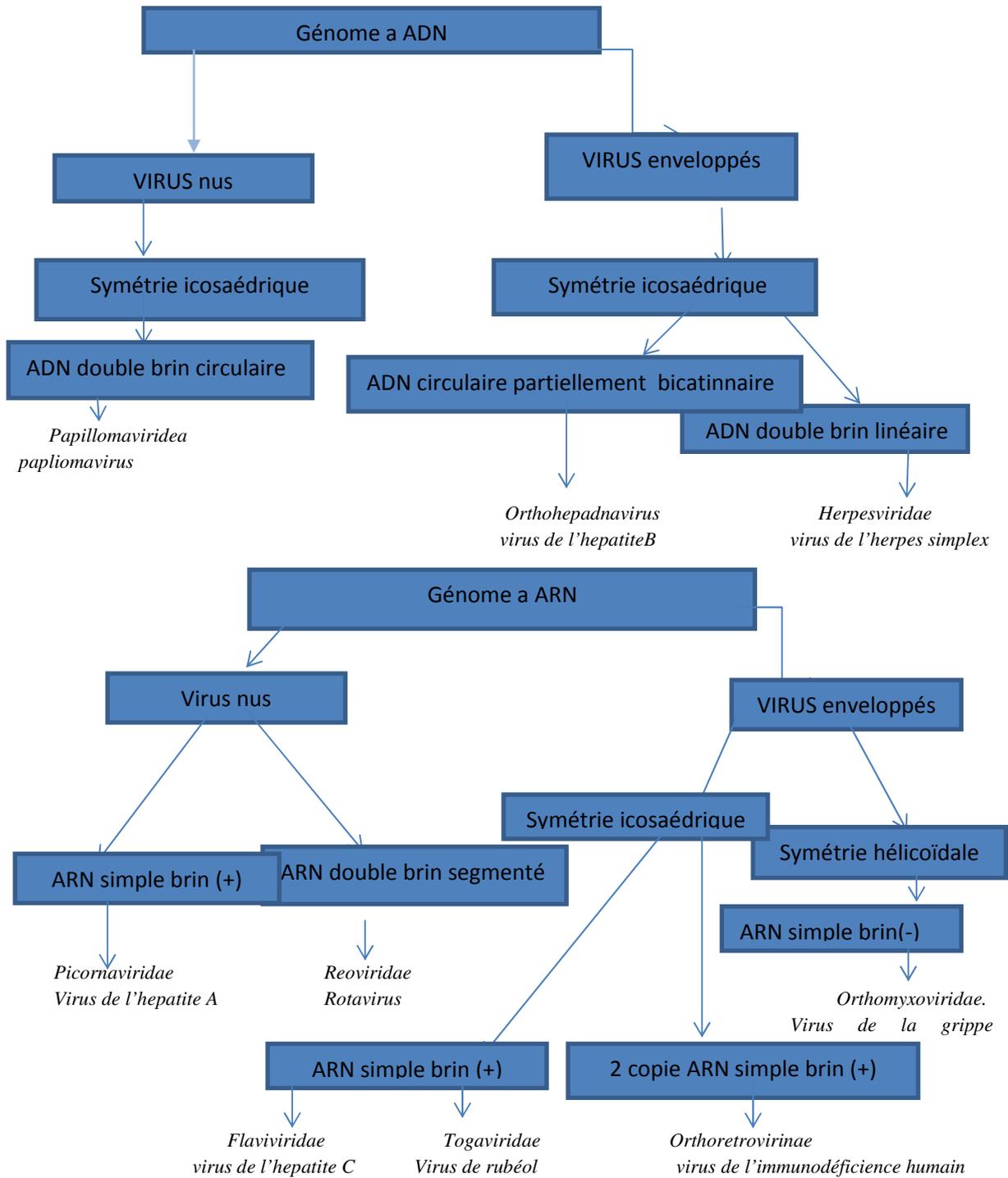


Figure 02. Classification des virus(Bianchi et al., 1999).

2.2. Manifestations cliniques liées aux infections virales

2.2.1. Les infections virales aiguës

Après pénétration dans l'organisme le virus va se multiplier et induire une réponse dans le système immunitaire, cette réponse va permettre d'éliminer définitivement le virus de l'organisme, l'infection virale sera donc transitoire, en concédant les processus de diffusion du virus on distingue des infections aiguës généralisées et des infections aiguës localisées (**Mammette, 2002**).

A. les Infections aiguës localisées : il n'y a pas de diffusion du virus dans l'organisme, les tissus cibles sont situés au niveau de la porte d'entrée. Ces infections sont représentées par :

- les infections respiratoires aiguës exemples (virus de la grippe A et B, virus *parainfluenza*, *adénovirus*, *rhinovirus*, *coronavirus*) sont très fréquentes, touchant les voies aériennes supérieures et inférieures (**Le porrier, 2011**).

-les gastro-entérites (*rotavirus*, *adénovirus*, *calicivirus*) Ces virus entraînent des anomalies non spécifiques de la muqueuse intestinale. Les gastroentérites virales se caractérisent par des troubles digestifs aigus (nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhées hydro-électrolytiques) accompagnés de signes généraux souvent modérés. Elles évoluent généralement de manière bénigne en quelques jours. Mais des formes sévères avec déshydratation sont possibles notamment chez les nourrissons (**Pignatelli et al., 2000; Rambaud et Bouhnik, 1994**).

-des conjonctivites (*adénovirus*, *entérovirus*) elle est souvent précédée d'une infection virale respiratoire et peuvent associer des adénopathies, dont l'atteinte oculaire fait rarement partie d'une infection virale généralisée. Dans la quelle l'œil est le seul organe apparemment atteint. (**Davide et al., 1996**).

B-Infections aiguës généralisées : A partir de la porte d'entrée, il y a diffusion du virus dans l'organisme, par voie lymphatique et sanguine ou dans des rares cas par voie nerveuse. Cette diffusion permet au virus d'atteindre ses tissus ou organes cibles. En générale la durée d'incubation de la maladie peut aller de deux semaines à plusieurs mois (**Mammette, 2002**).

Un exemple d'infection aiguë généralisée à incubation longue : la poliomyélite où, après contagion respiratoire ou digestive et trajet par voie sanguine l'infection, touche les

motoneurons de la corne antérieure de la moelle. Certaines maladies à incubation longue laissent le temps à une vaccination efficace pour enrayer le développement de la maladie si cette vaccination intervient assez tôt après la contamination : cas de la variole, de la rougeole, de l'hépatite B, de la rage, le maximum d'efficacité étant obtenu par l'association au vaccin de l'administration d'immunoglobulines spécifiques (sérovaccination) (Harux,2008).

2.2.2. Les infections virales persistantes

Le virus après une infection aiguë, persiste dans l'organisme du fait que la réponse immunitaire est insuffisante pour éliminer les cellules infectées et bloquer définitivement la réplication virale exemple : l'adénovirus (Le faou,2012).les infections persistante peuvent être à l'origine de maladies grave si le virus apparemment silencieux provoquent des lésions cellulaires ou sont à l'origine de pathologies tumorales survenant des années, voire des décennies, après l'infection initiale(le frere ,2000).

Il existe deux modes de persistance virales : les infections latentes et les infections chroniques.

-Les infections latentes: Certains virus entrent dans un état de latence, au cours duquel le virus ne se réplique pas dans cet état, le virus ne cause pas de maladie, mais de fait de l'absence de peptides viraux, le virus ne peut pas être détecté ni éliminé, des infections latentes de ce type peuvent être réactivées, provoquant ainsi une maladie récurrente. Un exemple est le virus herpès simplex (HSV), responsable des boutons de fièvre (Janeway,1999).

- les infections chroniques : l'infection virale ne guérit pas, le virus persiste dans l'organisme dans laquelle il se multiplie continuellement à des niveaux variables malgré l'existence d'une immunité, l'infection peut persister toute la vie de l'individu (VIH), mais peuvent parfois guérir spontanément (Le Faou, 2012).

2.3. Oncogenèse virale

Les virus oncogènes entraînent une modification génétique définitive de la cellule qui devient une cellule cancéreuse qui prolifère de façon incontrôlée, le génome viral s'intègre à celui de la cellule hôte et il modifie définitivement l'information génétique de cette cellule. Dans toutes les familles des virus à ADN on rencontre des virus oncogènes. Mais parmi les

virus à ARN le seul genre présentant un pouvoir oncogène est le genre oncovirus (Baudy, 2006).

Les virus expriment plusieurs protéines perturbant la régulation de la division cellulaire, la différenciation cellulaire et/ou les mécanismes physiologiques de mort cellulaire programmée, donc soit altère les voies de signalisation cellulaires qui régulent négativement la division cellulaire, soit bloqué l'action des gènes activant la division cellulaire, induisant les différenciations ou la mort programmée des cellules (apoptose). Ces gènes sont considérés comme des véritables freins physiologiques à l'apparition des cellules tumorales de façon imagée (Mammette, 2002).

3. Les champignons

Les champignons ou mycètes constituent un règne très important, dont seul un petit nombre de représentants sont pathogènes pour l'homme. Ce sont des eucaryotes, possédant un noyau et une paroi cellulaire composée de chitine. Les champignons peuvent se présenter sous forme unicellulaire (levure) ou lorsque les cellules s'allongent pour former des filaments ou hyphes qui constituent le mycélium (Tony et Pauls, 1999).

3.1. Organisation interne d'une cellule fongique

La cellule fongique est une cellule eucaryote elle en possède donc les principales caractéristiques à savoir :

- un noyau, délimité par une membrane nucléaire et contenant des chromosomes (leur nombre varie selon les espèces) et de nucléoles.
- des ribosomes, assurant la synthèse des protéines .
- des Mitochondries, qui présentent les mêmes caractéristiques que celles de toute cellule eucaryote (l'ADN mitochondrial permet la synthèse de certaines enzymes respiratoires) (Alexander et al, 2007).

La cellule fongique possède également :

- une grande vacuole, en générale sphérique, qui occupe une grande partie du volume cellulaire elle se divise en même temps que la cellule.
- Un ADN circulaire cytoplasmique ou plasmide souvent associé à la membrane (Alexander et al, 2007).

3.2. Classification des champignons

Les quatre principaux embranchements des champignons vrais (eumycètes) se distinguent par leur mode de reproduction.

-Les zygomycètes peuvent avoir une reproduction sexuée, les zygotes se formant par fusion des extrémités des filaments. On trouve parmi eux les genres pathogènes *Mucor* et *Absidia*.

-Les basidiomycètes possèdent des spores sexuées externes produites par des cellules en forme de massue appelées basides.

-Les ascomycètes forment des spores sexuées à l'intérieur d'un asque; *Piedraia hortae* est un pathogène appartenant à cet embranchement.

- deutéromycètes c'est l'embranchement aussi appelés champignons imparfaits (*Fungi imperfecti*), car on n'a pas pu mettre en évidence chez eux de reproduction sexuée. En revanche, ils forment des spores ou conidies. *Fungi imperfecti* comprennent les genres *Epidermophyton*, *Candida* et *Pityrosporum* (Tony et Pauls, 1999).

3.4. Le pouvoir pathogène des champignons

Les champignons sont reconnus comme pathogènes permanent s'il est observé en dehors de tout contexte d'immunosuppression. Exemple : *Histoplasmoses*, *Blastomyces*, *Coccidioides*. D'autres champignons sont opportunistes, ce sont des champignons accompagnée d'un état d'immunosuppression congénitale ou acquise Exemple: *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Candida*, *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Pneumocystis* (Riper, 2003).

4-Les parasites

Le parasite est un animal ou un végétal qui pendant une partie ou la totalité de son existence, vit aux dépens d'un autre organisme vivant appelé hôte. En fonction de sa localisation dans l'organisme, on distingue l'endoparasite et l'ectoparasite.

L'endoparasite qui vit à l'intérieur de l'hôte peut être :

- tissulaire : *filaires*
- sanguicole : *Plasmodium*
- intestinal : *Ascaris lumbricoides*

L'ectoparasite qui vit en général sur les téguments de l'hôte peut être soit :

- un ectoparasite simple nuisant notamment un parasite gênant par sa piqûre mais n'entraînant pas de maladies parasitaires : *Cimex lectularius* (punaise de lit),
- un ectoparasite agent causal de maladie parasitaire : c'est le cas de *Sarcoptes scabiei*, agent de la gale.
- Un ectoparasite vecteur de maladie parasitaire : *Anopheles gambiae*, vecteur du paludisme. C'est le groupe le plus important des ectoparasites.

4.1. Classification biologique des parasites

On classe les parasites biologiquement et morphologiquement en 4 grands groupes :

-Protozoaire (être unicellulaire doué de mouvement) : selon les cas il se déplace grâce à des plasmodies (rhizopodes), des flagelles, membrane ondulante ou des cils .Ils se présentent sous forme asexuée ou à potentiel sexué, mobile ou enkysté, intra ou extracellulaire.

-Helminthe ou ver (une part des métazoaires) : être pluricellulaire possédant des tissus différenciés.). Ils sont reconnus sous formes adultes des deux sexes sous forme larvaire, embryonnaire ou ovulaire.

-Fungi ou micromycètes : ces derniers constituent un règne à part entière, ce sont des champignons microscopiques identifiés sous forme de spores isolées ou regroupées ou de filaments libres ou tissulaire

-Arthropodes, mollusques, pararthropodes (porocéphale), ou annélides sont des métazoaires, pluricellulaires et possédant des tissus différenciés) Insectes, arachnides mollusques et crustacés, pouvant se présenter sous formes adultes (imago) mâles et femelles, œufs et larves (nymphe) (ANOFEL 2014).

4.2. Actions du parasite sur l'hôte

Les actions du parasite sur l'hôte peuvent être de plusieurs types.

4.2.1. Actions spoliatrices : Elles sont pratiquement constantes puisque tous les parasites se développent aux dépens de leur hôte. Dans la plupart des cas, ces actions spoliatrices sont mineures. Elles n'entraînent des manifestations perceptibles que lorsque les parasites sont suffisamment nombreux, c'est le cas de l'anémie causée par les ankylostomes. Des manifestations peuvent être perceptibles lorsque les parasites détournent à leur profit certaines substances importantes. L'exemple type est l'anémie de type Biermer de la bothriocéphalose liée à une spoliation en vitamine B12 (Dawit et al., 2004).

4.2.2. Actions traumatiques et bactériifères : Toute parasite perforant une muqueuse ou les revêtements cutané peut constituer une porte d'entrée microbienne (amibes et abcès amibien, filaire de Médine et perforation au niveau des malléoles) (ANOFEL ,2014).

4.2.3. Actions toxiques ou allergique : Les sécrétions et les excréments des parasites sont très sauvant toxique par exemple les amibes excrètent des protéines hémolytiques et les ascarises des protéines neurotropes. La mort des parasites provoque la libération telle qu'un choc anaphylactique (Pebret,2003).

4.2.4. Actions mécaniques : Ce sont sans doute les plus nombreuses et elles entraînent des effets microscopiques tels que l'éclatement des hématies parasitées par les plasmodies ou au

contraire des conséquences spectaculaires avec des phénomènes d'occlusion notamment l'occlusion intestinal par un paquet d'ascaris. On peut également observer des phénomènes de compression, c'est le cas avec le kyste hydatique au niveau de foie (ANOFEL, 2014).

4.2.5. Actions inflammatoires : Il y a une irritation tissulaire qui aboutit à la formation de granulomes inflammatoires et à des foyers de scléro-fibrose qui sont des manifestations hépatiques de la bilharziose à *Schistosoma mansoni* (Pebret, 2003).

5. Les Mycobactéries

Étymologiquement, « *Mycobacterium* » signifie « bâtonnet-champignon », car il peut former des extensions filamenteuses présentant parfois des branchements courts. Mais il s'agit des bactéries, car ces organismes n'ont pas de membrane nucléaire, sensibles au lysozyme et aux agents antibactérien dont la composition chimique est de type bactérien (Avril et al., 1992).

Les mycobactéries appartiennent au genre *Mycobacterium* qui regroupe des espèces aérobies à parois riches en acides mycoliques à longue chaîne. acido-alcool-résistantes et à croissance généralement lente (Denis, 2002). Les mycobactéries ne se colorent pas facilement mais une fois colorées résistent à la décoloration par l'acide et l'alcool (Jawetz et al., 1973).

Les Mycobactéries pathogènes spécifiques sont celle de la tuberculose et l'agent de la lèpre, le complexe tuberculosis se subdivise en trois sous-espèces sont *Mycobacterium tuberculosis*, responsable de la tuberculose humaine ; *Mycobacterium africanum* fréquemment isolé chez les tuberculeux en Afrique de l'Ouest et du Centre ; *Mycobacterium bovis* pouvant infecter l'homme et d'autres animaux, est l'agent de la tuberculose bovine. Un mutant de *Mycobacterium bovis*, le Bacille de Calmette et Guérin (BCG) est utilisé comme vaccin (Flandrois et al., 1997).

6. Les prions

Le terme prion est un mot venant de l'anglais Proteinaceous Infectious Only qui signifie particule infectieuse protéique non conventionnelle. Le prion est une protéine de forme anormale qui possède des propriétés infectieuses, il est également appelé agent transmissible non conventionnelle (Crouzilles, 2012). Elle est cependant codée par le génome de l'hôte comme un constituant normal de la cellule mais ayant une conformation tridimensionnelle particulière (Cassuto, 1999).

6.1. Relation hôte prion

La maladie à prion provoque une dégénérescence du système nerveux central qui est toujours fatale. Chez l'homme, il est responsable de la maladie de Creutzfeldt-Jakob qui se caractérise par une démence précoce aboutissant au décès, l'invasion du système nerveux humain par les

prions entraîne l'apparition de zones lacunaires. Ces trous microscopiques sont caractéristiques des tissus infectés, leur donnant une consistance spongieuse (**Crouzilles ,2012**).

Chapitre II

Les nouvelles approches de diagnostic des pathologies infectieuses

Chapitre II : Les nouvelles approches de diagnostic des pathologies infectieuses

1. Les techniques moléculaires d'identification microbienne

L'étude des agents infectieux à l'aide des outils de biologie moléculaire est ainsi devenue indispensable dans certaines indications. La biologie moléculaire est parfois le seul outil capable de détecter un nouvel agent pathogène. Comparée aux techniques de microbiologie classique, la biologie moléculaire présente de nombreux avantages. Le résultat est rapide, sensible et spécifique, permet la confirmation du diagnostic, un traitement adapté et une hospitalisation plus courte. Les infections nosocomiales peuvent être dépistées plus tôt, la source d'infection identifiée, le traitement et la prophylaxie ajustés. Enfin, l'automatisation se développe progressivement, facilitant ainsi la mise en place de ces techniques et améliorant ses performances (notamment sa rapidité d'analyse) tout en diminuant ses inconvénients (**Lamoril et al., 2007**).

2. les techniques d'hybridations moléculaires

L'hybridation moléculaire permet de repérer ou de rechercher une molécule d'ADN ou d'ARN spécifique dans une population hétérogène.

Le principe est de marquer par un traceur radioactif ou chimique la séquence d'ADN connue et purifiée que l'on veut repérer dans une population. Ce fragment monocaténaire marqué constitue la sonde (**Tague et Mussard, 2003**).

Les molécules cibles rendues simple brin (population hétérogène d'acides nucléiques dénaturé) sont au préalable fixées sur une membrane d'hybridation en nylon ou en nitrocellulose. La sonde simple brin et la cible dénaturée sont mises au contact (la membrane est incubé dans des surface contenant la sonde) dans des conditions permettent une renaturation .lorsque la molécule sonde reconnaît son homologue dans la population de molécules cibles. Elles s'hybrident et l'hybride devient marqué par la présence de la sonde. Des lavages appropriés des membranes permettent d'éliminer alors toute hybridation non spécifique et de ne garde que les hybrides sonde/cible recherchés. Dans le cas d'un marquage radioactif, les hybrides sont repérés en plaçant la membrane au contact d'un film auto radiographique, qui ensuite développé comme un film photographique. Dans le cas d'un marquage chimique, l'hybride moléculaires est révèle souvent par test colorimétrique sur membrane (**Tague et Mussard, 2003**).

2.1. Hybridation ADN/ADN (Southern Blot)

Le Southern blot est une technique mise au point pour rechercher des fragments de DNA sur une électrophorèse en les hybridant avec une sonde complémentaire. Après avoir digéré le DNA par une enzyme de restriction, on obtient un mélange de très nombreux fragments de restriction. On soumet ces fragments à une électrophorèse pour les faire migrer dans un gel de haut en bas en fonction inverse de leur taille. On fait un montage pour faire passer les fragments grâce à une montée de tampon imprégnant le gel puis une membrane de nylon où le DNA va se fixer par des liaisons stables. La membrane de nylon avec le DNA fixé est alors mise à incuber dans un sac contenant une solution d'une sonde radioactive complémentaire du fragment de DNA qu'on recherche, à une température assez basse pour que l'hybride se forme mais assez élevée pour que cet hybride soit parfaitement complémentaire. On lave la membrane des molécules de la sonde qui ne sont pas fixées à leur DNA complémentaire, puis on la met en présence d'un film radiographique vierge dans une enceinte opaque pour que la sonde radioactive fixée sur les fragments de DNA complémentaires impressionne le film. On révèle le film où des taches noires (sur le négatif) correspondent aux emplacements où ont migré les fragments d'ADN complémentaires de la sonde. On compare les distances de migration avec des fragments de DNA radioactifs de tailles connues qui servent (**Raisonnier, 2006**).

2.2. Hybridation ADN/ARN ou northern blotting.

Une technique qui permet de détecter la présence d'ARN messagers (ARNm) spécifiques mais également des ARN non codants comme les petits ARN et les ARN ribosomiaux à l'aide de sondes marquées. Les ARN messagers d'un échantillon sont séparés par électrophorèse. La mise en présence du résultat d'électrophorèse avec une sonde radioactive d'ADN complémentaire (ADNc) de l'ARNm recherché entraîne la détection ou non d'un ARN. La présence de l'ARN est révélée par autoradiographie. Cette technique permet de mesurer l'expression relative d'au plus 20 gènes à la fois (**Carpentier, 2006**).

3. Western blot (immuno-empreinte)

Western blot est une technique immunologique qui permet d'analyser l'expression d'une protéine d'intérêt au sein d'un extrait de protéines totales (**Iecomte, 2004**).

L'immuno-empreinte est utilisé pour l'identification d'une protéine donnée de lysat cellulaire, mais il évite l'inconvénient du marquage radio-isotopique de grande quantité des cellules, les cellules non marquées sont traitées par un détergent qui solubilise toutes les protéines cellulaire, puis on sépare celles-ci en faisant migrer le lysat de SDS-PAGE.

Les protéines séparées en fonction de leur taille sont alors transférées du gel sur un support stable, comme une membrane de nitrocellulose. Les protéines spécifiques sont détecté par un traitement avec des anticorps capables de réagir avec des protéines solubilisé par SDS (c'est - à -dire surtout ceux qui peuvent lier des séquences dénaturées), ces anticorps fixés sont ensuite révéle par des anticorps anti-immunoglobulines marqués par un radio-isotope ou une enzyme (**Janeway et Murphy,2018**)

Les immuno-emprentes trouvent de nombreuses applications en recherche et diagnostic clinique, elles sont souvent utilisées dans les tests sérologiques pour la détection d'anticorps contre des protéines spécifiques, par exemple, les différents constituants du virus d'immunodéficience humaine (HIV) (**Janeway et Murphy ,2018**)

4- Amplification par Polymérisation en Chaîne (APC) ou "Polymérase Chain Réaction" (PCR)

Cette technique permet d'amplifier in vitro une séquence nucléotidique présente initialement en une seule ou en quelques copies. Quelques heures suffisent pour amplifier au moins un million de fois l'acide nucléique viral d'un tout petit nombre de virions de telle sorte qu'il soit identifié ensuite facilement par hybridation moléculaire à l'aide d'une sonde marquée (**Saiki et al ; 1985 ; Saiki et al., 1988 ;Mullis 1990 ; Erlich et al., 1991**).

Un cycle de PCR comprend 3 étapes:

- 1- Dénaturation (94-96°C). Les brins d'ADN complémentaires cibles contenant la séquence à amplifier se séparent.
- 2- Hybridation (50-60°C). Les amorces s'hybrident spécifiquement sur chacun des 2 brins d'ADN au niveau de courtes séquences qui flanquent la zone à amplifier.
- 3- Elongation (60-72°C). L'ADN polymérase thermostable synthétise à partir de chaque amorce une copie complémentaire de chaque brin de la séquence.

Ce cycle (dénaturation-hybridation-élongation) peut être répété de 30 à 40 fois ce qui conduit à une augmentation exponentielle du nombre de copies de la séquence cible. Ainsi en partant d'une seule copie, 30 cycles aboutissent à plus de 1 million de copies. Cette partie cyclique de la PCR a été automatisée et est réalisée dans un thermocycleur qui permet d'effectuer les 30 à 40 cycles en une à quelques heures.

Pour cette technique, il est nécessaire d'employer une polymérase capable de fonctionner aux températures élevées (60-72°C lors de l'étape d'élongation) et de résister à des températures de 94-96°C (dénaturation) c'est le cas de l'ADN polymérase provenant du microorganisme *Thermophilus aquaticus* (Taq), présent à l'état naturel dans les sources chaudes (**Saiki et al., 1988, Keohavong et al., 1989**).

5. La RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR)

Est une technique qui permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) à partir d'un échantillon d'ARN. Il s'agit de synthétiser un ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN à l'aide d'une transcriptase inverse ou "reverse transcriptase" (RT) Cette étape qui nécessite la présence d'une amorce pour initier la réaction s'effectue à 37-42°C pendant 30 à 60 min. Elle aboutit à des hybrides ARN-ADN dont le brin d'ADN peut être amplifié par PCR (Iecomte, 2004).

Les produits amplifiés sont visualisés par :

- électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide en présence de bromure d'éthyldium et observation sous ultra-violet. Les fragments sont séparés en fonction de leur poids moléculaire. La révélation des fragments amplifiés après une simple électrophorèse reste la technique la moins sensible et est donc principalement utilisée après RT-PCR

- hybridation moléculaire (dot-blot ou slot blot). Les fragments amplifiés sont déposés sur des membranes (nylon ou nitrocellulose) et révélés par des sondes spécifiques marquées. Cette technique ne fournit aucune information sur la taille des fragments amplifiés mais est plus sensible et plus spécifique qu'une révélation après électrophorèse.

- couplage d'une électrophorèse et d'une hybridation moléculaire (Southern blot). Les fragments amplifiés sont séparés en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse puis transférés sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose pour finalement être révélés par des sondes spécifiques marquées. C'est la technique la plus couramment utilisée car plus sensible et plus spécifique que la révélation après simple électrophorèse, elle permet de contrôler la taille des fragments amplifiés (Schwartzbrod, 2000).

6 .PCR en temps réel

6.1. Principes

La technique de PCR en temps réel est directement inspirée de la PCR classique. Les cycles de PCR successifs induisent une augmentation exponentielle du produit d'amplification, et par conséquent de la fluorescence émise. Pour la détection des amplicons, cette PCR utilise soit l'agent intercalant, soit elle fait appel à des amorces spécifiques du gène à amplifier associées à un système de sondes fluorescentes qui se fixent spécifiquement sur le brin amplifié (Tella, 2003).

6.2. Intérêts de la PCR en temps réel

1. Pour la PCR classique, 2 heures sont nécessaires pour réaliser 30 à 40 cycles alors que 20 à 30 minutes sont nécessaires pour le même nombre de cycles pour la plupart des appareils de PCR en temps réel.
2. Pour les techniques classiques, la détection du produit amplifié se fait, selon différentes méthodes évoquées plus haut qui sont fastidieuses et nécessitent l'utilisation éventuelle de produit cancérigène (BET). De plus, elles favorisent l'électrophorèse et imposent des locaux séparés pour les étapes d'amplification et de post-amplification. A l'inverse, les techniques de PCR en temps réel, permettent une détection spécifique et immédiate de l'amplicon au cours de la réaction de PCR.
3. la PCR en temps réel présente l'avantage de pouvoir quantifier la cible détectée dans l'échantillon biologique.

6.3. Applications

La PCR en temps réel est utilisée pour de nombreuses applications telles que l'analyse d'expression de gènes, de mutations, de génotypage, de détection et quantification rapide d'agents pathogènes, de quantification d'ADN et d'ARN, d'essais d'expression et de distribution pour la thérapie génique(**Tellaa ,2003**).

7. les puces à ADN et analyse du transcriptom

Il s'agit de greffer sur une surface de quelques centimètres carrés des fragments synthétiques d'ADN (les sondes) espacés de quelques micromètres et représentatifs de chacun des gènes étudiés. Ce micro dispositif est ensuite mis au contact des acides nucléiques à analyser, au cours de l'étape d'hybridation. Ces acides nucléiques, appelés cibles, correspondent aux ARNm ou aux ADNc qui ont été préalablement couplés à un marqueur fluorescent ou radioactif. Ce contact entre cibles et sondes conduit à la formation d'hybrides qualifiés par leurs coordonnées, et quantifiés grâce à la lecture des signaux radioactifs (**Reymond ,2004**).

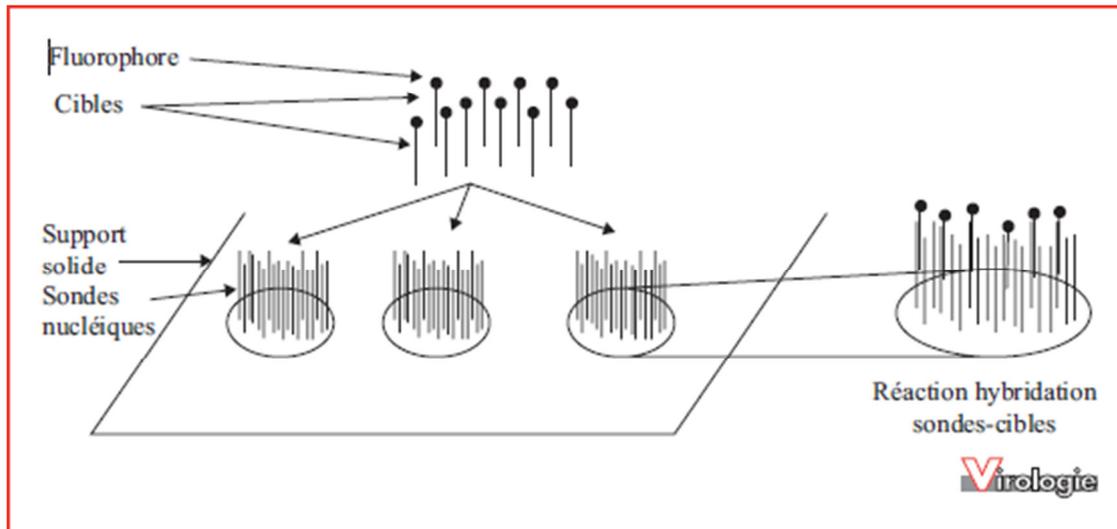


Figure 03. Principe d'une puce à ADN

Une puce à ADN est constituée de sondes nucléiques disposées selon une organisation spatiale définie sur un support solide (lame de verre, bille, etc.). Le principe de fonctionnement s'appuie sur une hybridation ADN-ADN par complémentarité entre un ensemble de sondes et un ADN cible à identifier. La réaction d'hybridation est repérée généralement grâce au fluorophore sur la cible au préalable (**Berthet, 2013**).

8. Le microscope électronique

Le microscope électronique est un outil qui permet de visualiser des objets extrêmement petits. Pour cette raison, il a été utilisé abondamment pour caractériser et identifier les virus. Le microscope électronique à transmission « transmission électron microscope » (TEM) génère un faisceau d'électrons au départ d'une cathode soumise à un voltage très élevé. Ce faisceau d'électrons est dirigé sur un échantillon qu'il traverse pour en révéler l'image sur un écran fluorescent, une plaque photographique ou plus récemment sur une camera CCD qui peut alors révéler l'image en temps réel sur un moniteur (**Tony et Pauls, 1999**).

D'autres microscopes comme le microscope à balayage « Scanning Electron Microscope » (SEM) ou le microscope de force atomique « Atomic Force Microscope » (AFM) permettent aussi de visualiser la structure ou des détails de particules virales (**Tony et Pauls, 1999**).

Chapitre III
Matériel et méthodes

Chapitre III : Matériel et méthodes

Notre travail a été effectué au niveau de l'établissement public hospitalier de lakhdaria, dans trois services différents selon l'analyse réalisé.

1 - laboratoire d'urgence : dans ce service on a fait les examens cyto bactériologiques des urines et de liquide céphalorachidienne ainsi que le liquide pleural, le laboratoire d'urgence constitue de deux salles une pour les analyses biochimiques et l'autre pour les analyses bactériologiques les examens réalisées au niveau de salle de bactériologie, sont : examen cyto bactériologique des urines, examen parasitologie et coproculture des selles, examen des prélèvements divers (pus, pertes vaginales, LCR, liquide pleural...).

2-Centre de transfusion sanguine(CTS) : dans le quelle on fait la sérologie infectieuse pour la recherche de l'antigène HBs et les anticorps anti-HCV et anti-HIV ainsi que anti *Treponema pallidum*. Le CTS est constitué de quatre salles ; Salle de prélèvement ; salle des examens sérologiques ; salle pour le stockage de sang et produit de sang labiles (plaquettes, plasma frais congelé) et l'autre salle pour l'interprétation et la rédaction des résultats.

3- le service de contrôle de la tuberculose et des maladies respiratoires (SCTMR): ce service appartient à l'établissement de proximité de santé public(EPSP) de Lakhdaria dans le quelle s'effectués le test d'intradermoréaction de la tuberculine (IDR) et la recherche des *Mycobacterium tuberculosis*. Ce centre est constitué de trois salles ;salle pour faire la bacilloscopie ,salle pour le médecin ,une salle pour le chef de service au ce faire le test de l'IDR

III. 1. Matériel

1.1. Matériel biologique

- **Le Prélèvement urinaire** pour faire l'examen cyto bactériologique des urines.
- **le crachat des patients** pour la recherche des bacilles – acido –alcoolo- résistant.
- **Le prélèvement de liquide céphalorachidien (LCR).**
- **le liquide d'épanchement (liquide pleural) .**
- **le prélèvement sanguine** pour rechercher des antigènes HBs et la recherche des anticorps anti-HIV , anti-HCV et anti *Treponema pallidum*.

2. Appareillage

Centrifugeuse, microscope optique, Etuve, lecteur de microplaque ELISA.

III.2. Méthode

III.2.1. Etude cyto bactériologique des urines

1-Le prélèvement

Le prélèvement se fait le matin, car les urines sont concentrées (la dilution diminue artificiellement le compte des germes) et les colonies bactériennes ont eu le temps de se développer pendant la nuit (examen plus sensible),

- Chez l'homme et le garçon : les urines du second jet sont recueillies de façon stérile, après nettoyage du méat urinaire.

- Chez la femme ou la fillette, le prélèvement est précédé d'une toilette périnéale Soigneuse faite d'avant en arrière pour éviter les contaminations fécales avec plusieurs Compresses humectées de sérum physiologique (trois compresses utilisées pour un seul passage et jetées l'une après l'autre). Les grandes lèvres étant maintenues écartées, le prélèvement est recueilli dans un flacon stérile, de préférence au milieu du jet des urines, au cours d'une miction normale, sans sondage. L'examen est fait en dehors de la période menstruelle (**René, 2004**).

- Chez le nourrisson : après un nettoyage de la région périnéale et désinfection locale, un collecteur est placé au moyen d'un adhésif.

- Chez le malade sonde, l'urine est prélevée à partir de la sonde, à la seringue de 5 mL. L'utilisation d'antiseptique est déconseillée, car entraîne dans les urines, un antiseptique diminue le nombre de germes.

Transport au laboratoire dans les 20 minutes qui suivent ou conservation au réfrigérateur (à $t + 4^{\circ}\text{C}$) dans la glace jusqu'au transport (**René, 2004**).

2. Examen macroscopique

Cet examen nous a permis d'apprécier l'aspect et la couleur de l'urine. Les urines normales sont de couleur jaune ou jaune d'or, limpide et transparente. Les urines pathologiques peuvent avoir un aspect trouble, hématurique.

3. Examen microscopique

3.1. Cytologie

Elle a été effectuée sur des urines non centrifugées après homogénéisation. L'examen a consisté de prélever quelques ml d'urine à l'aide d'une pipette Pasteur dont la pointe était du

bord de la lamelle. Le remplissage complet réalisé. La préparation a été ensuite placée sur la platine du microscope. La lecture a été faite à l'objectif x10 puis x40.

A partir du prélèvement urinaire nous avons recherché les globules blancs les cellules épithéliales, des cristaux, des cylindres, des bactéries, des parasites et des levures.

3.2. Les colorations

Elles s'effectuent sur des frottis déjà étalés séchés et fixés à la chaleur. Dans notre étude on a réalisé la coloration Bleu de méthylène qui consiste à recouvrir les frottis de colorant de bleu de méthylène pendant trois à dix minutes. Les bactéries et les cellules se colorent en bleu. après la coloration le frottis est observé à émergence au microscope grossissement x100 en ajoutant l'huile à émergence. La coloration au bleu de méthylène elle permet de se renseigner sur : la forme des bactéries, la taille et le mode de regroupement

3.3. Examen bactériologique

3.3.1 Techniques d'ensemencement

Dans une zone stérile devant le bec bunsen on prend 0.1 ml d'urine bien mélangée est diluée dans 9.9 ml d'eau distillée stérile à l'aide d'une pipette pasteur puis 0.1 ml (deux gouttes) de cette dilution est ensuite aussitôt étalée sur une gélose nutritive avec un râteau préalablement stérilisé. On ensemence parallèlement l'urine non diluée sur un milieu sélectif (Héktoen) et on incube à 37°C pendant 24h.

On examine l'aspect des colonies ayant poussé sur la gélose Héktoen et sur la gélose nutritif et on fait le dénombrement des colonies sur gélose nutritif. La numération se fait selon la formule de Kass

$$N=n \cdot 10^2 \cdot 10 \text{ bactérie / ml}$$

Ou n : Nombre de colonie sur la boîte.

10^2 : Inverse de la dilution.

10 : Inverse de l'inoculum

Nombre de colonie : 1-9 : 10^3 Bact/ml Numération négative.

10-99: 10^4 Bact/ml Numération douteuse.

+ 100: 10^5 Bact/ml Numération positive.

3.3.2. Purification et Identification

On examine l'aspect des colonies ayant poussé sur la gélose Héктоen et sur la gélose nutritif.

3.3.2.2. La galerie biochimique

➤ **Utilisation de glucose de lactose de saccharose et production de gaz et H₂S sur gélose TSI**

On réalise une suspension bactérienne en dissociant quelques colonies dans 2 ml d'eau physiologique, on ensemence la surface de la gélose par stries, puis le culot par piqûre centrale. On incube à 37°C pendant 24 h, le lecteur se fait comme suite :

- fermentation de lactose indique un virage au jaune vers la pente.
- fermentation du glucose virage de fond de tube.
- production de gaz : apparition des bulles.
- production d'H₂S : noircissement du milieu.

➤ **Recherche d'urées et production d'indole sur milieu urée-indole**

Ces deux tests sont recherchés simultanément sur milieu urée-indole. On prélève à l'aide d'une pipette pasteur quelques colonies, on les émulsionne dans 0,1 ml du milieu urée-indole et on incube à 37°C pendant 24 h.

La présence d'uréase se traduit par le virage du milieu au rose/rouge.

La production de l'indole est révélée par l'addition de quelques gouttes de réactif de Kovacs au milieu urée-indole, l'apparition d'un anneau rouge en surface indique un test positif.

4. Technique de l'antibiogramme

4.1. Milieu de culture

Les souches identifiées ont été testées vis-à-vis plusieurs antibiotiques par la méthode d'antibiogramme standard diffusion sur gélose Muller Hinton, selon la recommandation du CFA-SFM(2007).

4.2. Réalisation de l'inoculum bactérien

A l'aide d'une pipette Pasteur stérile on prélève une colonie bien isolée d'une culture de 24 heures. Puis celle-ci est mise en suspension dans 5 ml de l'eau physiologique stérile. Ensuite on fait une seconde dilution en mettant 5 gouttes de la précédente suspension dans 10 ml d'eau physiologique stérile.

4.3. Ensemencement par inondation

La suspension bactérienne est versée de façon à recouvrir entièrement la surface de la gélose. En inclinant la boîte de pétri on jette une première fois l'excès d'inoculum. Les boîtes ainsi ensemencées sont mises à sécher 15 mn à 37°C.

4.4. Dépôt des disques

Au bout de 15 mn de séchage, les disques choisis sont posés par une pince fine flambée, en appuyant légèrement sur la surface de la gélose. Les disques doivent être éloignés au moins de 30 mm centre à centre de sorte que les zones d'inhibitions ne se chevauchent pas.

4.5. Lecture et interprétation

La lecture a été effectuée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une règle graduée. L'interprétation des résultats a été faite conformément aux recommandations du comité de l'antibiogramme de la société Française de microbiologie. La réponse a été exprimée par trois catégories cliniques : Sensible (**S**), Intermédiaire (**I**), Résistant (**R**).

Les antibiotiques suivants ont été testés : Chloramphénicol, céfotaxime, acide nalidixique, céfazoline, tétracycline, triméthoprim-sulfaméthazole, ciprofloxacine, Dont leurs diamètres critiques sont représentés dans le tableau cité aux annexes.

III.2.2. Etude cyto-bactériologique de liquide céphalorachidien

Le liquide céphalorachidien (LCR) est un liquide stérile, dépourvu d'éléments figurés, devant toute suspicion d'atteinte méningée, il est indispensable de procéder à l'examen cyto-bactériologique de ce liquide. Cette étude permet d'apporter des arguments en faveur d'une origine microbienne et ainsi de proposer un traitement adapté aux nombreux micro-organismes (**Jacques, 2011**).

1. Le prélèvement

Est effectué le plus souvent en urgence par le médecin. Le patient doit s'allonger sur un côté et courber le dos. Le LCR est prélevé par ponction au niveau des vertèbres lombaires

à l'aide d'une aiguille à ponction lombaire. Quelques centilitres de LCR sont prélevés et rapidement amenés au laboratoire pour être analysés.

2. Aspect macroscopique

Cet examen permet d'apprécier l'aspect et la couleur du LCR. Le LCR normal est incolore, limpide, comme l'eau de roche. Le LCR pathologique peut être, clair au début de la maladie, trouble, purulent ou hémorragique. L'aspect hémorragique est dû à une hémorragie méningée ou une ponction traumatique.

3. Examen cytologique

On prend quelques gouttes de liquide céphalorachidien on ajoute le même volume de bleu acétique (Solution de l'Azarus) pour hémolysé les globules rouges. Puis on prend quelques gouttes de ce mélange on les dépose sur une cellule de nageotte, la cellule a été mise au repos quelques minutes pour permettre la sédimentation des éléments cellulaires. Puis on fait l'observation sous microscope grossissement x10.

3.1. Le comptage sur la cellule de nageotte

La cellule de nageotte c'est une cellule dont leur quadrillage total constitué de : 40 bandes (Chaque bande a un volume de 1,25microlit).

On fait le dénombrement des lymphocytes sur 3 bandes puis en mesure la moyenne et on multiplie les résultats obtenue fois 40/50 puis on multiplie par 2 (facteur de dilution dû à la solution de bleu acétique) le résultat du comptage des leucocytes.

3.2. Coloration de May-Grünwald- Giemsa ou éosine-bleu de méthylène(MGG)

La coloration de MGG est applicable à des frottis de natures très diverses LCR, ascite, pleural, sang (hémogramme, recherche des parasites).

3.3. Technique de coloration de MGG

La coloration s'effectue sur des frottis déjà étalés séchés et fixés à la chaleur elle consiste à couvrir le frottis avec le May-Grunwald pur pendant 3 minutes puis on ajoute 1ml d'eau physiologique on laisse agir deux minutes et on fait le rinçage rapide par l'eau physiologique, puis on couvre le frottis avec la solution de Giemsa diluait dans l'eau physiologique on laisse agir pendant 20 min après on fait le rinçage de frottis par l'eau de robinet.

On laisse les lames séchées à l'air puis l'observation sous microscope à l'objectif x100 on ajoutant l'huile à immersion.

3.4.Examen bactériologique

Aucun examen bactériologique n'a été fait avec le liquide céphalorachidien car les résultats de coloration de MGG ne donnent que la présence des lymphocytes (absence des bactéries).

III.2.3. Examen cytochimique de liquide d'épanchement (le liquide pleural)

Un liquide d'épanchement est prélevé par ponction puis recueilli stérilement dans un tube contenant du citrate de sodium afin d'éviter qu'il ne coagule. Il peut revêtir trois aspects principaux :

Purulent : plus ou moins trouble

Hémorragique : rosé à rouge

Sérofibrineux : limpide, jaune claire coagulant plutôt facilement.

1.Préparation de l'échantillon

On fait centrifuger le tube de prélèvement pendant 10 minutes à 3000tr/min. on prend quelques gouttes de surnageant pour faire la réaction de Rivalta puis on élimine le surnageant et on récupère le culot pour préparer un frottis et faire la coloration de MGG.

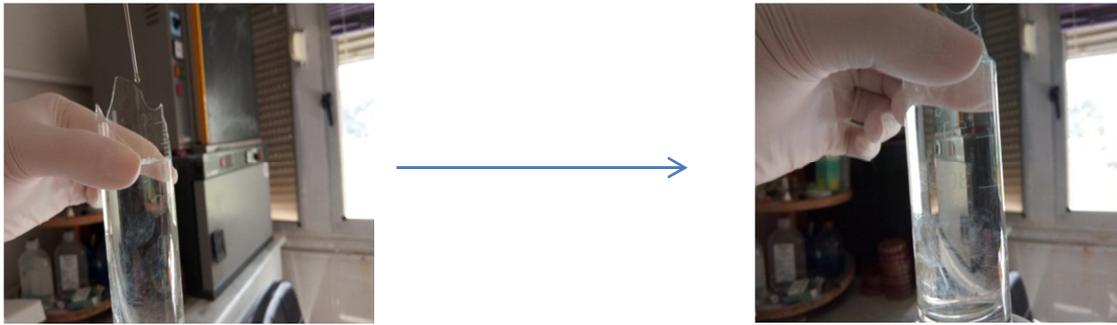
2. Examen chimique des liquides d'épanchement : (la réaction de Rivalta)

La réaction de Rivalta met en évidence une protéine précipitable dans l'eau acétique.

On fait tomber goutte à goutte le surnageant dans une éprouvette en verre contenant de l'eau acétique (quatre gouttes d'acide acétique pour 100 ml d'eau distillé).

Si la réaction de Rivalta positive (Exsudat), le liquide forme une série de nuages blancs (dégagement qui rassemble à le fumé de Cigarette) Si elle est négative, le liquide se confond assez vite avec l'eau acétique il s'agit d'un transudat.

Exsudat implique le taux de protéine est supérieure à 30 mg/l(**René ,2010**).



On fait tomber quelques gouttes de liquide
d'épanchement dans l'eau acétique

dégagement qui rassemble à la fumée de Cigarette
(réaction de Rivalta positive)

Figure 04. la réaction de Rivalta.

3. Cytologie La formule leucocytaire a été établie après coloration d'un frottis au May-Grünwald Giemsa.

4. Examen bactériologique Aucun examen bactériologique n'a été fait avec le liquide pleural car le taux de leucocytes est très bas.

III.2.4. La sérologie infectieuse par la technique enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

III.2.4.1. Le dépistage de l'AgHBs.

1. Intérêt de diagnostic

Le principal intérêt de la mise en évidence de l'AgHBs réside dans le dépistage des dons du sang, afin de réduire la fréquence des hépatites B post-transfusionnelles. La détection de l'AgHBs est également utilisée pour le diagnostic des hépatites B aiguës ou chroniques.

2. Principe de test

Le réactif ADVANCED pour la recherche de l'antigène de surface de virus de l'hépatite B (AgHBs) est un test immuno-enzymatique de type sandwich en utilisant en premier temps des anticorps monoclonaux anti HBs mobilisés sur la surface des cupules de plaque de micro-titration. Ces anticorps monoclonaux et anticorps polyclonaux contre HBsAg couplés à la peroxydase de harseradish (HRP) (solution conjuguée), pendant le test, l'existence des AgHBs dans l'échantillon réagira avec ces anticorps et forme un complexe anticorps-AgHBs-anticorps-HRP, après élimination des éléments non liés, le substrat de couleur bleu dans les puits de micro-titration indique un résultat positif (présence d'Ag HBs dans le sérum testé) l'absence de la couleur indique une absence de l'Ag HBs dans le sérum. La

transformation enzymatique du chromogène est ensuite interrompue par l'addition de solutions d'arrêt dans ce cas l'apparition de la couleur jaune dans les cupules indique un résultat positif. L'intensité de réactif est proportionnelle à la concentration antigénique de l'échantillon.

3. Préparation des réactifs

On Porte tous les réactifs et échantillon à 15/25°C avant le début du test, sans sortir la plaque de son emballage. Et on fait sortir du cadre les barrettes non utilisées dans le test, et on les conserve pour un usage ultérieur.

On prépare la solution de lavage (pour une plaque) on mélange 20ml de solution de lavage avec l'eau distillé en complétant à 400 ml (dilution 1/20).

4. Echantillon à tester

Les échantillons qui ont été utilisés sont des sérums humains (sérums des donneurs de sangs). Ils peuvent être conservés 3 jours maximum à 2°/8°C.

5. Réalisation du test

On a Placé le nombre recueil des micros puits sur le support et on a laissé le premier puits libre pour le « blanc » et on a distribué 20 µl du diluant (colleur vert) dans toute les cupules.

On a distribué 100 µl de sérum de contrôle négatif dans deux cupules et 100 µl de sérum de contrôle positif dans deux autres cupules, et on a laissé une cupule pour le blanc. Puis on a distribué 100 µl des sérums testé dans tous les cupules qui reste-t-on suivant l'ordre de numéro.

On a mélangé le diluant avec le sérum à chaque fois et on Couvre ensuite les plaques par un film adhésive, l'incubation est fait à 37°C pendant 60 minutes.

On a ajouté 50 µl de conjuguée (colleur rouge) sans toucher le contenant de la cupule pour éviter la contamination. On Couvre ensuite la plaque par le film adhésif, l'incubation faite à 37°C pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.

On retire le film adhésif et on fait le lavage des cupules en cinq cycles par la solution de lavage préparé préalable. On aspire le contenu de toutes les cupules et on a ajouté pour

chacun d'elle un minimum de 0.37ml de solution de lavage, on aspire de nouveau et répète l'opération quatre fois et sécher la plaque par retournement sur des compresse.

Dès la fin de lavage on a ajouté 50 µl de solution A(H₂O₂) et 50 µl de solution B (substrat) dans chaque cupule. On Couvrir ensuite la plaque par le film adhésif et on fait l'incubation à 37°C pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.

Les cupules qui contiennent les sérums positifs apparaissent de couleur bleu les autres cupules reste transparentes.

Pour arrête la réaction on a ajouté 50 µl de solution d'arrêt dans chaque cupule dans ce cas-là les cupules qui contiennes le sérum positive apparaitras de couleur jaune les autres reste transparentes.

On a placé les plaques dans un lecteur de microplaque pour mesure la densité optique après 10 minutes d'arrêt à une longueur d'onde de 450nm.

6. Validation de test

6.1. Les conditions de validation de test ADVANCED pour le diagnostic de l'AgHBs.

- La densité optique de blanc doit être inférieur a 0,100 (le blanc contient seulement le chromogène et la solution d'arrêt)
- La densité optique de contrôle négatif doit être inférieur ou égale à 0,100 (on doit éliminer le contrôle négatif qui a une densité optique supérieur à 0,100 si toutes les valeurs des contrôles négatifs seront supérieures à 0.1 le test à refaire).
- La densité optique de contrôle positif doit être supérieure à 0,5 (si on trouve une valeur de contrôle positif inférieur à 0.5 le test est invalide donc à refaire).

6.2. La valeur seuil

Si les trois conditions existent : on calcule la valeur seuil.

-La valeur seuil =la moyen de la valeur des témoins négatifs x 2,1.

-L'échantillon est considéré positif si leur densité optique est supérieur ou égale à la valeur seuil.

-l'échantillon est considéré négatif si leur densité optique est inférieur a la valeur seuil.

III.2.4.2. Le dépistage de l'anticorps de *Treponema pallidum* l'agent de syphilis

1. Intérêt du test : le diagnostic de l'anticorps *Treponema pallidum* par la technique ELISA c'est un test qualitatif qui permet la détermination des anticorps IgG/IgM dans le plasma ou bien dans le sérum humain. L'intérêt de ce test réside dans le dépistage des dons de sang, afin de réduire la fréquence de transmission de *trepanoma palludium* post- transfusionnelle et aussi le diagnostic des infections par ces bactéries.

2. Principe de test

Le test syphilis ADVENCED utilise deux antigènes recombinants dans un format sandwich l'un est mobilisé sur la surface solide dans les cupules de micro-titration et l'autre antigène et couplé avec le (HRP), pendant le test, l'existence des anticorps dans l'échantillon réagira avec ces antigènes et forme un complexe antigènes-anticorps-antigènes-HRP, après élimination des éléments non liés, le substrat de couleur bleu dans les puits de micro-titration indique un résultat positif (présence d'anticorps anti-*Treponema pallidum* dans le sérum testé), l'absence de la couleur indique une absence de l'anticorps anti- *Treponema pallidum* dans le sérum. la transformation enzymatique du chromogène est ensuite interrompue par l'addition de solutions d'arrêt dans ce cas l'apparition de la couleur jaune dans les cupules indique une résultats positif. L'intensité de réactif est proportionnelle à la concentration antigénique de l'échantillon.

3. Réalisation du test

On a Placé le nombre requis de micro puits sur le support et on a laissé le premier puits libre pour le « blanc » et deux puits pour le contrôle négatif et deux autres puits pour le contrôle positif et un puits pour chaque échantillon.

On a distribué 100 µl de sérum de contrôle négatif dans deux cupules et 100 µl de sérum de contrôle positif dans deux autres cupules, et on a laissé une cupule pour le blanc. Puis on a distribué 100 µl des sérums testé dans tous les cupules qui reste-t-on suivant l'ordre de numéro.

Ensuite, on a Couvre la microplaque avec du film adhésif et on a fait l'incubation à 37°C pendant 60 minutes.

On a enlevé le film adhésif et on a lavé la microplaque 5 fois avec une solution de lavage préparé préalable. Puis on met 100 µl conjugué d'enzyme (colleur rouge) dans tous les puits sauf le blanc, on a couvrent la microplaque avec du film adhésif et on a fait l'incubation à 37°C pendant 30 minutes.

On a lavé les cupules en 5 fois ensuite on a pipeté 50µl de H₂O₂ et 50µl de substrat (transparent) dans tous les puits y compris le « blanc » l'incubation est faite à l'abri de la lumière à 37 °C pendant 30 minutes.

Pour arrêter la réaction enzymatique on a ajouté 50µl de solution d'arrêt (transparent) dans tous les puits en respectant l'ordre de pipetage dans l'étape précédente. Ensuite on mesure l'intensité de la coloration dans chaque puits à 450 nm dans un lecteur de microplaque.

5. Validation de test et interprétation des résultats

5.1. Validation du test

Les conditions de validation de test ADVANCED pour diagnostique l'anticorps de *Treponema pallidum*.

- La densité optique de blanc doit être inférieure à 0,100 (le blanc contient seulement le chromogène et la solution d'arrêt).
- La densité optique de contrôle négatif doit être inférieure ou égale à 0,100 (je dois éliminer le contrôle négatif qui a une densité optique supérieure à 0,100 si tous les contrôles négatifs seront supérieurs à 0.1 le test à refaire).
- La densité optique de contrôle positif doit être supérieure à 0,5 (si je trouve une seule valeur de contrôle positif inférieure à 0.5 le test est invalide donc à refaire).

5.2. La valeur seuil

Si les trois conditions sont existantes : on calcule la valeur seuil.

- La valeur seuil = la moyenne de contrôle négatif x 2.1
- L'échantillon est considéré positif si leur densité optique est supérieure ou égale à la valeur seuil.
- L'échantillon est considéré négatif si leur densité optique est inférieure ou égale à la valeur seuil.

III.2.4.3. Le dépistage de l'anticorps de virus d'immunodéficience acquise (VIH).

1. Intérêt clinique

L'intérêt de ce test réside dans le dépistage des dons de sang, afin de réduire la fréquence de transmission de virus d'immunodéficience acquise (sida) post-transfusionnelle et aussi le diagnostic des infections par ce virus.

2. Principe de la trousse ADVANCED pour la détection d'anticorps VIH

Le test HIV ADVANCED est une technique immuno-enzymatique pour la détection des différents anticorps associés au virus VIH1 et VIH2 dans le sérum ou plasma humain. La technique est basée sur le principe d'ELISA sandwich (double antigènes), utilise deux antigènes recombinants dans un format sandwich l'un immobilisé sur la surface solide dans les cupules de micro-titration et l'autre antigène couplé avec le horseradish peroxydase (HRP), pendant le test, l'existence des anticorps dans l'échantillon réagira avec ces antigènes et forme un complexe antigènes-anticorps-antigènes-HRP, après élimination des éléments non liés, le substrat de couleur bleu dans les puits de micro-titration indique un résultat positif (présence d'anticorps de VIH dans le sérum testé), l'absence de la couleur indique une absence de l'anticorps VIH dans le sérum. La transformation enzymatique du substrat est ensuite interrompue par l'addition de solutions d'arrêt dans ce cas l'apparition de la couleur jaune dans les cupules indique un résultat positif. L'intensité de réactif est proportionnelle à la concentration antigénique de l'échantillon.

3. Réalisation du test

On a placé le nombre requis de micro puits sur le support et on a laissé le premier puit libre pour le « blanc » et deux puits pour le contrôle négatif, deux puits pour le contrôle positif de HIV-1 deux puits pour l'HIV-2 et un puits pour chaque échantillon. Ensuite on met 50 µl de sérum de contrôle négatif et de contrôle positif dans des puits appropriés on suit l'ordre de numéro « blanc ».

On a agité la microplaque et on fait l'incubation à 37°C pendant 60 minutes ensuite on a lavé la microplaque 5 fois avec une solution de lavage préparée préalable.

On a mis 100 µl de conjugué d'enzyme (colleur rouge) dans tous les puits sauf le « blanc » et on a couvert la microplaque avec du film adhésif l'incubation de la microplaque est faite à 37°C pendant 30 minutes. Ensuite on a lavé 5 fois les puits.

On a ajouté 50µl de solution A(H₂O₂) et 50µl de solution B (substrat) (transparent) dans tous les puits y compris le « blanc » ensuite l'incubation de la microplaque à l'abri de la lumière et à une température de 37 °C pendant 30minutes.

Pour arrêter de la réaction on a ajouté 50 µl de solution d'arrêt dans chaque cupule .dans ce cas-là les cupules qui contiennent le sérum positive apparaissent de couleur jaune les autres restent transparentes.

On a placé les plaques dans un lecteur de microplaque pour mesurer la densité optique après 10 minutes d'arrêt à une longueur d'onde de 450nm.

4. Validation de test et interprétation des résultats :

Les conditions de validation de test ADVANCED pour diagnostic de virus d'immunodéficience acquise sont :

- La densité optique de blanc doit être inférieure à 0,100 (le blanc contient seulement les réactifs A et B et la solution d'arrêt).
- La densité optique de contrôle négatif doit être inférieure ou égale à 0,100 (on doit éliminer le contrôle négatif qui a une densité optique supérieure à 0,100 si tous les contrôles négatifs sont supérieurs à 0.1 le test est à refaire).
- La densité optique de contrôle positif doit être supérieure à 0,5 (si on trouve une seule valeur de contrôle positif inférieure à 0.5 le test est invalide donc à refaire).

5. La valeur seuil :

Si les trois conditions sont existantes : on calcule la valeur seuil.

-La valeur seuil = 0.1 + La moyenne de contrôle négatif.

-L'échantillon est considéré positif si sa densité optique est supérieure ou égale à la valeur seuil.

III.2.4.4. Le dépistage de l'anticorps de virus de l'hépatite C par la technique ELISA

- 1. L'intérêt de diagnostic :** L'intérêt de ce test réside dans le dépistage des dons de sang, afin de réduire la fréquence de transmission de virus de l'hépatite C par voie transfusionnelle et aussi le diagnostic des infections par ce virus.

2. Réalisation du test

On a placé le nombre requis de micro puits sur le support ensuite on a pipeté 100 µl de diluant dans tous les puits. Ensuite on a ajouté dans chaque puits 10 µl de sérum on suivant l'ordre de numéro de sérum et on a laissé deux puits pour le contrôle positif et deux autres puits pour le sérum de contrôle négatif et un puits libre pour le blanc.

On a agité la microplaque et on a fait l'incubation à 37°C pendant 60minutes.ensuite on a fait le lavage des microplaques avec une solution de lavage préparé aux préalable.

On a met 100 µl de conjugué d'enzyme dans tous les puits sauf le « blanc » et on couvre la microplaque avec du film adhésif puis on a fait l'incubation à 37°C pendant 30 minutes. Ensuite on a fait 5 cycles de lavage.

On a ajouté 50µl de solution A(H₂O₂) et 50µl de solution B (substrat) dans tous les puits y compris le « blanc » ensuite l'incubation de la microplaque à l'abri de la lumière à 37 °C pendant 30minutes.

Pour arrêter la réaction on a ajouté 50 µl de solution d'arrêt (transparent) dans chaque cupule .dans ce cas-là les cupules qui contiennes le sérum positive apparaitre de colleur jaune les autres reste transparentes. On a placé les plaques dans un lecteur de microplaque pour mesure la densité à une longueur d'onde de 450nm.

3. Validation de test et interprétation des résultats

3.1. Validation de test

Les conditions de validation de test ADVANCED pour diagnostique l'hépatite C sont

- La densité optique de blanc doit être inférieur a 0,100 (le blanc contient seulement le réactif A et B et la solution d'arrêt).
- La densité optique de contrôle négatif doit être inférieur ou égale à 0,100 (on doit éliminer le contrôle négatif qui a une densité optique supérieur à 0,100 si tous les contrôles négatifs seront supérieur à 0.1 le teste à refaire).
- La densité optique de contrôle positif doit être supérieur à 0,5 (si on trouve une seule valeur de contrôle positif inférieur a 0.5 le teste est invalide donc le teste à refaire).

3.2. La valeur seuil

Si les trois conditions existent : on calcule la valeur seuil.

-La valeur seuil = la moyenne de contrôle négatif x2.8.

-L'échantillon est considéré positif si leur densité optique est supérieur ou égale à la valeur seuil.

-L'échantillon est considéré négatif si leur densité optique est inférieur ou égale à la valeur seuil.

III.2.5. Le diagnostic de la tuberculose par la bacilloscopie

Le diagnostic de la tuberculose repose sur la recherche de *Mycobacterium tuberculosis* dans le prélèvement de crachat. Cet examen direct se base sur l'examen microscopique par la méthode de Ziehl Neelsen à chaud utilisant la fuchsine.

Le but de cette technique est de chercher la propriété fondamentale de ces mycobactéries qui est leur caractère acido-alcoolo-résistant. Cette technique n'est pas spécifique aux bacilles tuberculeux mais à toutes les mycobactéries telles que les bacilles de la lèpre d'où l'expression de : présence de bacille acido-alcoolo-résistant ou BAAR en cas de positivité et non pas présence de bacille tuberculeux (**Bodonirina, 2012**).

1-Le prélèvement de l'échantillon

C'est un prélèvement d'origine pulmonaire, il s'agit de recueillir les crachats émis spontanément après un effort de toux profond, de préférence le matin au réveil, dans des flacons stériles, à fermeture étanche et à large ouverture afin d'éviter les contaminations des bords extérieur.

2. Préparation

Dans une zone stérile et sur une lame neuve gravée à l'extrémité par un numéro d'identification du crachat on dépose à l'aide d'une anse métallique stérile une parcelle de crachat (en choisissant si possible une parcelle purulente) et on fait un frottis aussi fin que possible. On laisse la lame séché et on flambe l'anse métallique pour la stériliser avant de préparer une autre lame.

3. Séchage et Fixation

On Laisse sécher les frottis à l'air pendant au moins 15 minutes (15 à 30min) puis on Passe la lame 3 fois (en 3 à 5 secondes) à travers la flamme du bec bunsen.

4. Coloration par la technique de ZIEHL NEELSEN

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

4.1. Coloration

A l'aide d'un coton monté sur une tige, trempé dans l'alcool et flambé, la flamme est passée sous les lames recouvertes de fuchsine jusqu'à l'émission de vapeurs. Cette opération est répétée trois fois en laissant agir pendant trois minutes tout en évitant l'ébullition et le dessèchement du colorant. La fuchsine est ajoutée si besoin est au fur et à mesure.la fuchsine est rejetée et la lame est rincée à l'eau du robinet.

4.2. Décoloration

Toutes les lames sont replacés sur porte-lame et se couvrir séparément avec l'acide sulfuriques dilué au un quart. On le laisse agir trois minutes. Puis le colorant est jeté et les lames sont rincées à l'eau du robinet.

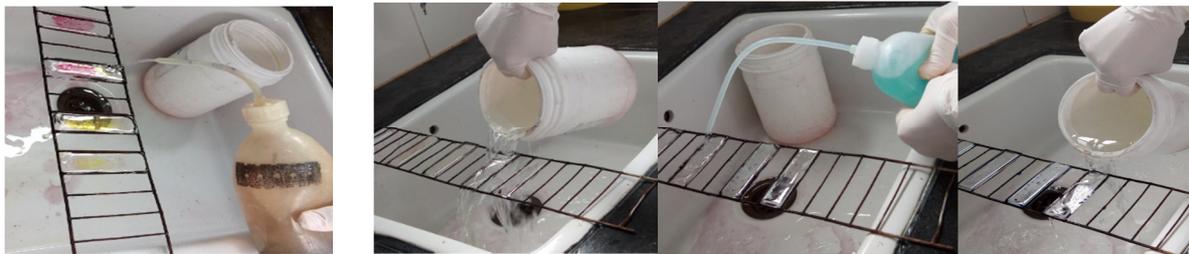
Les lames sont recouvertes avec de l'alcool à 95° pendant 5 minutes puis rincées à nouveau. Le frottis est alors légèrement teinté de rose ou incolore.

4.3. Contre-coloration

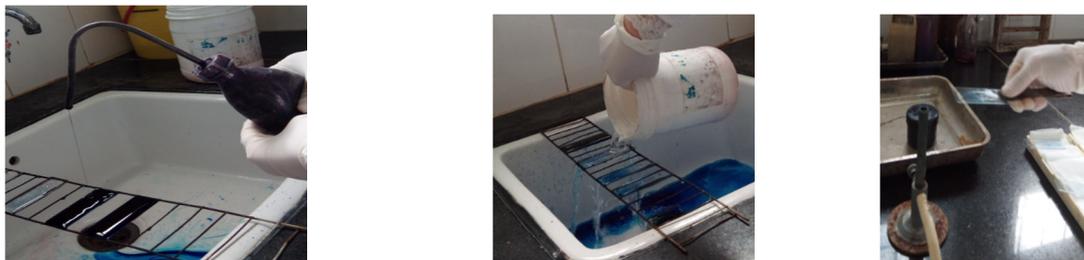
Le frottis est recouvert au bleu de méthylène pendant 30 secondes à une minute. Il est rincé à l'eau du robinet puis séché à l'air libre.



(1) préparation d'échantillon. (2) Séchage et Fixation 15. (3) coloration par la fuschine chaud. (4) rinçage à l'eau du robinet.



(5) décoloration par l'acide sulfurique. (6) rinçage à l'eau du robinet. (7) décoloration par l'alcool. (8) rinçage à l'eau du robinet



(9) contre coloration par le bleu de méthylène.

(10) rinçage à l'eau du robinet

(11) séchage.

Figure 05 .Les différentes étapes de la recherche de *Mycobacterium tuberculosis* dans le prélèvement de crachat (Coloration de **ZIEHL NEELSEN**).

4.5. Lecture des résultats

La lame est placée sur la platine du microscope et l'observation ce fait à l'immersion avec l'objectif x 100. La goutte d'huile à immersion est versée sur le frottis sans le toucher pour éviter la contamination. Après la mise au point, la lame est examinée champ par champ suivant sa longueur, de gauche à droite sur au moins cent champs avant de déclarer la négativité d'une lame (examen pendant 15 minutes environ).

Les BAAR apparaissent rouge vif ou en rose sur un fond contre-coloré en bleu. Ils sont droits ou légèrement incurvés.

Tableau II: Notation des résultats de Bacilloscopie (MINISTERE DE LA SANTE PUBLIQUE, 2001)

Nombre de BAAR	Réponse	signification
Pas de BAAR au moins 100 champs	-	Lame négatif
1 à 9BAAR au moins dans 100 champs	+	Lame douteuse (refaire l'examen)
10 à 99 BAAR pour 100 champs	++	Lame faiblement positive
31 a 9 BAAR par champ	+++	Lame moyennement positive
10 a 99 BAAR par champ	++++	Lame fortement positives
Plus de 100BAAR par champ	+++++	Lame fortement positives

III.2.6. Etude rétrospective de la tuberculose

Durant la période de notre stage nous avons réalisé une étude rétrospective sur la tuberculose. Les patients inclus dans notre étude sont des personnes qui atteints de tuberculose toutes formes confondues, de n'importe quel groupe d'âge et chez qui la tuberculose a été confirmée dans une période d'un an. (De janvier 2017 au janvier 2018).

Le recueil des données de chaque patient est fait par la consultation de registre de service. On prenant en considération les éléments suivants : Sexe, Age le type de la tuberculose et sont localisation.

Chapitre IV

Résultats et discussions

Chapitre IV: résultats et discussions

Pendant la période de notre stage effectué au niveau de l'EPH de lakhdaria, du 24 février au 24 mars 2018, on a détecté plusieurs infections microbiennes dans différents prélèvements biologiques. et on a fait une étude rétrospective de la tuberculose.

1. l'examen cytobactériologique des urines

Tableau III: Résultat de l'étude de l'examen cytobactériologique d'urine.

N°	Aspect macroscopique	Examen cytobactériologique des urines	résultats	Le germe isolé
01	jaune	absence des bactéries et des polynucléaires	-	Culture négatif
02	jaune	Absence des bactéries et des polynucléaires	-	Culture négatif
03	Jaune	<i>Trichomonas vaginalis</i> + présence des polynucléaires	+	Culture négatif
04	jaune	Absence de bactéries et absence de polynucléaires.	-	Culture négatif
05	Trouble	Présences des les polynucléaires +les hématies + <i>Trichomonas vaginalis</i> .	+	Culture négatif
06	trouble	Présence des bactéries ce forme des bacilles + les polynucléaires.	+	<i>Klebsiella</i>
07	claire	absence des bactéries et des polynucléaires.	-	Culture négatif
08	claire	absence des bactéries et des polynucléaires.	-	Culture négatif
09	Jaune	Absence des bactéries et des polynucléaires	-	Culture négatif
10	Jaune	Absence des bactéries et des polynucléaires	-	Culture négatif
11	Jaune	Absence des bactéries et des polynucléaires	-	Culture négatif

Nous avons isolé et identifiés une souche de *Klebsiella* et deux parasites *Trichomonas vaginalis* parmi 11 prélèvements urinaires ce qui donne un taux d'infection urinaire de 27,27%.

1.1. L'examen cytologique

L'examen cytologique des urines montre la présence des hématies et des polynucléaires (des leucocytes) dans certain prélèvements .Selon (**Tortora et Derrickson, 2017**). La présence d'hématies dans les urines traduit la présence d'hémoglobine provenant d'érythrocytes éclatés elle peut être causée par une inflammation aigue des organes urinaires consécutive à une maladie ou à une irritation par des calculs rénaux, et peut également résulter d'un traumatisme ou d'une maladie rénale.

La présence des leucocytes et d'autres constituants du pus dans l'urine révèle une infection du rein ou d'un autre organe urinaire (**Tortora et Derrickson, 2017**). Ce qui explique la présence fréquente des polynucléaires avec l'agent pathogène dans notre étude.

1.2. La galerie biochimique de souche isolée

Pour identifier la souche isolée on fait la galerie biochimique par ensemencement sur milieu TSI (Triple SugarIron) et milieu urée indole.

1.2.1. Le milieu TSI (Triple SugarIron)

Permet l'identification des bactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène.

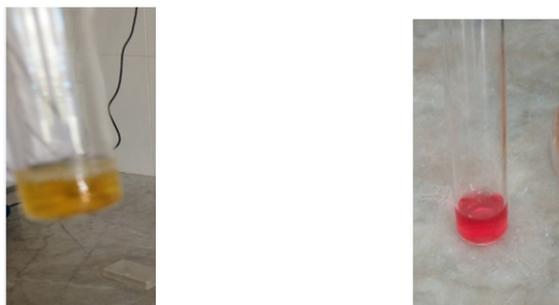


Figure 06. Aspect du milieu TSI avec *Klebsiella sp.*

1.2.2. Milieu urée indole

A. Production de l'uréase

En présence d'enzyme d'uréase, l'urée est transformée en carbonate d'ammonium et il en résulte une alcalinisation du milieu. selon (**Avril et al.,1992**). La majorité des souches de *K. pneumoniae* est uréase (+) en milieu urée indole.



a : Aspect du test négatif
en milieu urée indole.

b : Aspect du test positif
en milieu urée indole.

Figure 07. Test Uréase.

La positivité du test d'uréase été marquée par le virage de l'orange au rouge.

B. Production d'indole

L'indole est obtenu de la dégradation du tryptophane, grâce à une enzyme bactérienne «la tryptophanase ». Il se forme de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniac. L'indole est apolaire, donc soluble dans les solvants organiques et réagit fortement en milieu acide avec le para diméthylamino-benzaldehyde contenu dans le réactif de Kovacs. (Meziani ,2012).

la souche qui on a isolé fermente le lactose, le saccharose et le glucose avec production de gaz, et sans production d'H₂S. production d'indole négative et uréase positive selon **Tony et Paul., 2003** la bactérie appartienne de genre *klebsiella*.

Tableau IV : les caractères de la souche isolée.

La souche identifie	Aspect des colonies	indole	urease	glucose	lactose	gaze	H ₂ S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bombées rondes et muqueuses.	-	+	+	+	+	-

1.2.3. L'aspect des colonies et la résistance aux antibiotiques

L'aspect des colonies de *klebsiella* sur le milieu Hektoen apparaitre des colonies Bombées rondes et muqueuses. Ce résultat est compatible avec celle qui a été décrit dans la littérature et selon (Grosjean, 2017).

la souche qui on a isolé (*klebsiella*) résiste au Chloramphénicol, céfotaxime, acide nalidixique, céfazoline, tétracycline, triméthoprim-sulfaméthazole et sensible au ciprofloxacine cette résistance due au production de B-lactamase a spectre élargi selon **Eyquem et al., 2000**.

2. l'examen cytologique de Liquide céphalo-rachidien

Tableau V: Résultat de l'examen cytologique de Liquide céphalo-rachidien.

N°	Le nombre d'éléments	Aspect de liquide	Coloration de MGG
1	03 Lymphocytes.	Claire (eau de roche)	/
2	20 Lymphocytes.	xanthochromique	/
3	07 lymphocytes.	claire	/
4	11 lymphocytes	claire	/
5	20 lymphocytes	claire	
6	100 lymphocytes	xanthochromique	Prédominance lymphocytaires, quelques hématies.
7	1842 lymphocytes	trouble	lymphocytes
8	4element	claire	Lymphocytes.
9	11elements	claire	lymphocytes



Figure08. LCR xanthochromique après coloration de MGG.

-LCR normal est claire comme de l'eau de roche. Le LCR normal est stérile et contient 2 éléments/ μ L (en général des lymphocytes). Il n'y a pas d'hématies (**Réne, 2010**). Donc la réaction cellulaire observée lors des méningites est secondaire à l'infection.

-Le LCR xanthochromique (jaune citrin) est observé à la suite d'une hémorragie méningée ou au cours de certaines affections du névraxe (compression modulaire). Il faut toutefois souligner qu'une hyperprotéinorachie importante donne également cet aspect (**Belouni, 2000 et Seehusen 2003**). Donc il faut faire le prélèvement dans trois tubes pour distinguer entre les deux cas.

-L'aspect trouble du LCR est directement lié à l'hyperleucocytose présente dans le LCR, ce trouble apparaît dès la présence de 200 globules blancs par mm^3 (**Hachi, 2010**).

Dans notre étude on a constaté la prédominance des cellules lymphocytaires dans tous les prélèvements réalisés, la présence des cellules lymphocytaires due à une infection virale ou bactérienne. Les méningites virales ont habituellement une formule à prédominance

lymphocytaires néanmoins les méningites à entérovirus sont à prédominance de polynucléaires (Barbach, 2014).

Pour distinguer entre les deux infections (bactérienne ou virale) il faut compléter l'étude par d'autres tests biochimiques telle que la glycémie, la glycorachie, protéinorachie. Une étude a montré que chacun des facteurs suivants était individuellement prédictif de l'origine bactérienne d'une méningite aiguë avec une certitude de 99% : glucose inférieur à 1.89mmol/l, glucose LCR/glucose sang inférieur à 0.23, protéine supérieure à 2.2 g/l : globules blancs supérieur à 2000/mm³ ou polynucléaires neutrophiles supérieur à 1180/mm³ (Bruneel et Wolff, 2000). En général, les méningites bactériennes provoquent une baisse de la glycorachie, ce qui n'est habituellement pas le cas pour les méningites virales (Carbonnelle, 2009). Donc la mise en culture de LCR et les techniques moléculaires sont les examens de certitude pour identifier le germe qui cause l'infection.

Tableau VI: les Différents syndromes biologiques observés après étude des paramètres biochimiques, cytologiques et bactériologiques de LCR (Vandepille J, 1994).

	LCR Normale	Méningite purulente	Méningite tuberculeuse	Méningite virale	Méningite leucosique
Aspect	Eau de roche	trouble	Claire	claire	louche
Protéine g/l	0.20	2 ou 3 ou plus	<1	<1	<1
Glucose g/l	0.50-2.80	↘ ou disparu	↗ ↘	Voisin de la normal	↘ ou disparu
Chlorures mg/l	120	Normaux	Diminuées	normaux	Normaux ou ↗ ↘
Cellules/mm ³	2	Supérieur à 1000	100-500	Environ 100	Environ 100
Type cellulaire	Mononucléés	Polynucléaires	lymphocytes	lymphocytes	Cellules leucémiques
Présence de bactéries examen direct	Néant	présentes	Présentes après coloration de Ziehl Nielsen	Néant	Néant
Présence de bactéries après culture	Néant	présentes	Présentes sur de milieu de janson	Néant	Néant

3. l'examen cytochimique de liquide pleural

Tableau VII : Résultat d'examen cytochimique de liquide pleural.

N°	Nature de prélèvement.	Aspect de liquide	Examen biochimique. (test de Rivalta)	Examen Cytologique
01	Liquide pleurale	claire	Exsuda le taux de protéines et supérieure à 30mg/l	Présence des lymphocytes.
02	Liquide pleurale.	claire	Exsuda le taux de protéines et supérieure à 30mg/l	Présence des lymphocytes.
03	Liquide pleurale	trouble	Exsuda le taux de protéines et supérieure à 30mg/l	prédominance lymphocytaires.
04	Liquide pleurale	hématurie	Transsudat inférieure a 30mg/l de protéine	Présence des lymphocytes

3.1. Test de Rivalta.

A. La réaction transsudat (Rivaltat négatif)

Ce sont des épanchements mécaniques, pauvres en protéines (protides <30mg/l), dont l'insuffisance cardiaque (hémodynamique), hépatique ou rénal (hypo albuminémies sévère) (**Guillevin , 2011**).un liquide pleural transsudatif exprime un origine non inflammatoire.(**Mertelsman et al .,2011**)

B.la réaction de l'exsudat (Rivalta positif)

Le liquide riche en protides supérieure à 30mg/l et en éléments (Exsudat riche en lymphocytes supérieur à 80%) est observé dans des très nombreuses étiologies, et toute particulièrement dans la pleurésie tuberculose (**Kubab et al., 2015**).L'exsudat et toujours en faveur d'une infection ou d'une pathologie tumoral (**Grosjean et al., 2017**). Dans la littérature il est décrit que les épanchements pleuraux malins sont toujours des Exsudats. (**Mertelsman et al., 2011**).

Le liquide pleural claire ou citrin test de Rivalta positif exsudat riche en globules blanc avec un prédominances des lymphocytes, indique une infection par la tuberculose car dans ce cas la recherche de *M.tuberculosis* a la microscope directe est le plus souvent négative (Varaine, 2014).

4. la sérologie infectieuse par la technique ELISA

Parmi 64 prélèvements sanguins on a identifié un seul cas de l'hépatite B positive et un cas de syphilis.

4.1. Les limites de la technique

Il existe une fenêtre sérologique qui correspond à la phase comprise entre la contamination et la détection des marqueurs sérologiques, durant cette fenêtre les marqueurs sérologiques (AntigèneHBs , Anticorps HIV et Anticorps HCV) ne sont pas détecté par cette technique car il ne sont pas encore apparus ou se trouvent à un titre trop bas .

La durée de cette fenêtre a été calculé pour

Virus de l'hépatite B (25-109jours)

Virus de l'hépatite C (38-94jours)

Virus de l'HIV (6-38 jours) (Agence national de sang, 2002)

La technique ELISA est une technique qui ne permet pas de mesurer la charge virale.

Donc pour obtenir des résultats plus fiables on doit passer par les techniques moléculaires qui nous permettront de détecter le génome de l'agent infectieux et sa charge dans un liquide biologique.

Pour la confirmation du résultat positif de l'Ag HBs, le prélèvement est acheminé vers l'institut pasteur pour faire la recherche des IgM et IgG et la détermination de la charge virale par la PCR en temps réelle.

5. la recherche de tuberculose pulmonaire par la bacilloscopie

On fait la recherche des BAAR dans 8 prélèvements de crachats où on a identifié 3 cas de tuberculose pulmonaire. L'observation au microscope optique, après la coloration de Ziehl-Neelsen montre des bâtonnets rouges sur un fond bleu, selon Ait-Khaled et Enarson, 1999, Le

Mycobacterium tuberculosis se présente comme un bacille droit et incurvé de 0,2 à 0,3µm de large sur 2 à 5µm de long. Les BAAR apparaissent rouge vif ou en rose sur un fond contre-coloré en bleu. Ils sont droits ou légèrement incurvés de 2 à 4 µm de long sur 0,3 à 0,5 µm de large. Ils se présentent comme de fins bâtonnets, isolés ou groupés en amas et se détachent nettement du fond bleu de la préparation.

la bacilloscopie est déterminante à elle seule dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire. la culture est moins recommandée puisque elle est longue, car elle est liée à la croissance lente des mycobactéries. Mais Elle permet par ailleurs d'établir un antibiogramme (Toujani et al.,2005).

6. Etude rétrospective sur la tuberculose

Au cours de notre stage réalisé au niveau du laboratoire du Service de Contrôle de la Tuberculose et des Maladies Respiratoires de lakhdaria et qui a été effectué durant la période d'un mois : du 24mars 2018 au 24 avril 2018 Une étude rétrospective, a été effectuée à partir des registres du laboratoire du service pendant une période allant de Janvier 2017au Janvier 2018 et qui a porté sur 120 patients infectés par la tuberculose extra pulmonaire et pulmonaire nécessitant une analyse bactériologique des crachats.

6.1. Caractéristiques de la population étudiée

6.1.1. La Distribution des cas de tuberculose selon localisation

La tuberculose extra-pulmonaire représentait 60% des cas (72) de tuberculose enregistrés pendant la période d'étude alors que la tuberculose pulmonaire représente seulement 40% (48cas).

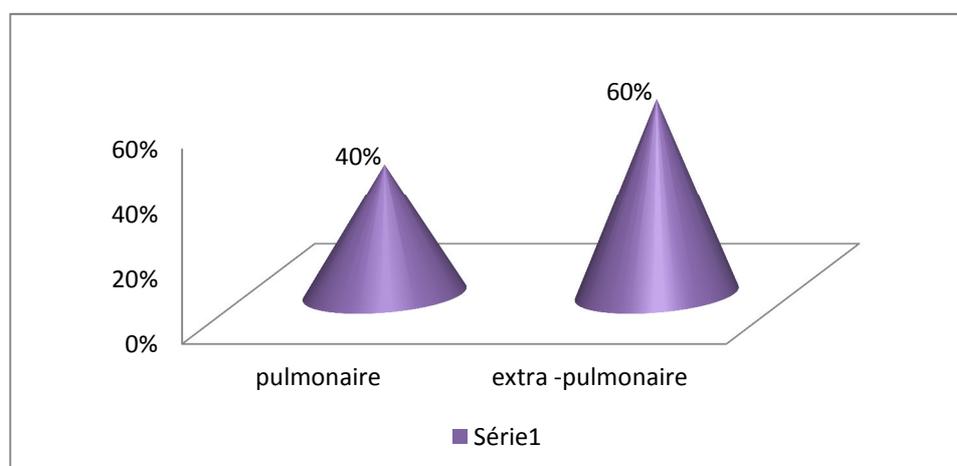


Figure 09 .La Distribution des cas de tuberculose selon localisation.

6.2. Distribution de la tuberculose pulmonaire.

6.2.1. Distribution des cas de tuberculose pulmonaire selon le sexe

Les deux sexes étaient touchés avec une prédominance masculine. Le sexe ratio est de 1,25 en faveur des hommes. Avec une répartition de (52%) de sexe masculin et (48%) de sexe féminin.

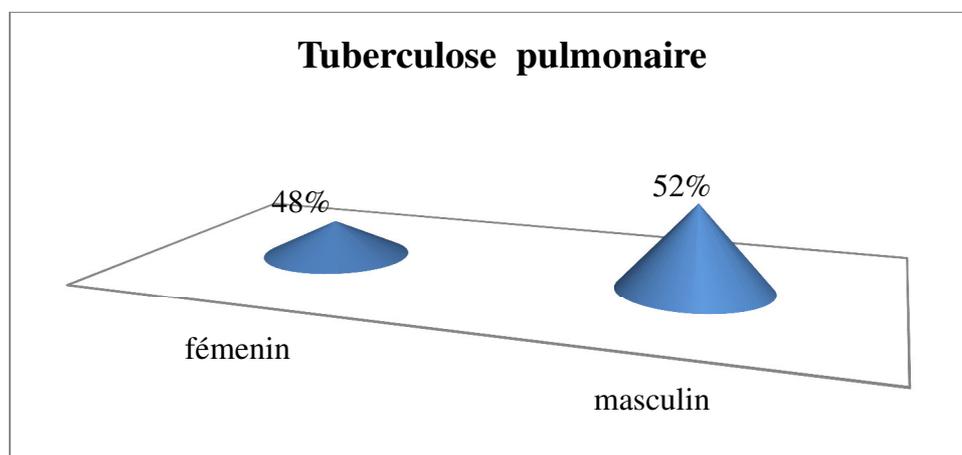


Figure 10. Distribution des cas de tuberculose pulmonaire selon le sexe.

6.2.2. Répartition de tuberculose pulmonaire par tranche d'âge

L'âge moyen de nos patients atteints de la tuberculose pulmonaire était de 33,8 ans, le sujet âgé de [25-34] apparaît le plus touché (13 cas) suivie de ceux de [35-44] (11 cas), cette tranche d'âge constitue la couche la plus active de la population,

Chez les enfants de moins de 14 ans aucun cas de tuberculose pulmonaire ont été enregistrés par rapport à la population générale.

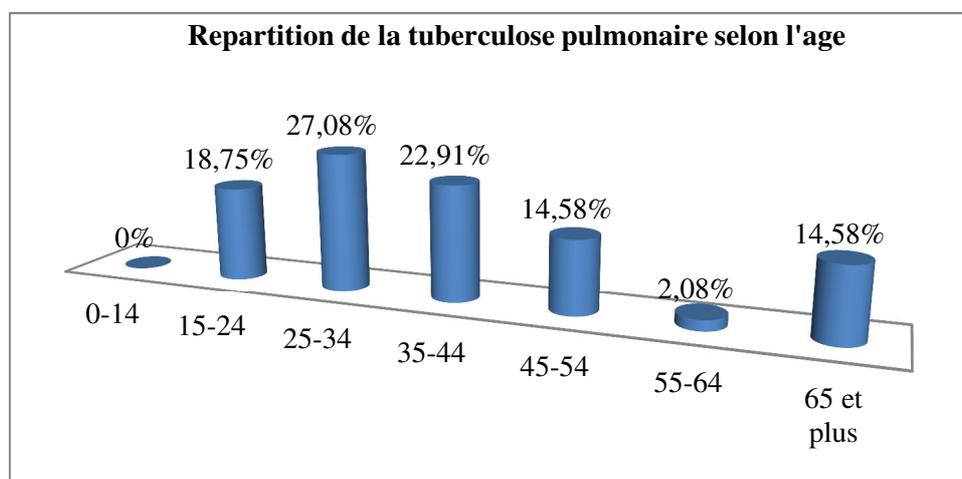


Figure 11. Répartition de tuberculose pulmonaire par tranche d'âge.

9.3. Répartition de la tuberculose extra-pulmonaire

9.3.1. Répartition de la tuberculose extra-pulmonaire selon le sexe :

Les deux sexes étaient touchés avec une prédominance féminine. Le sexe ratio est de 1,32 en faveur des Femmes. Avec une répartition de 43,05% (31 cas) de sexe masculin et 56,94%(41 cas) de sexe féminin,

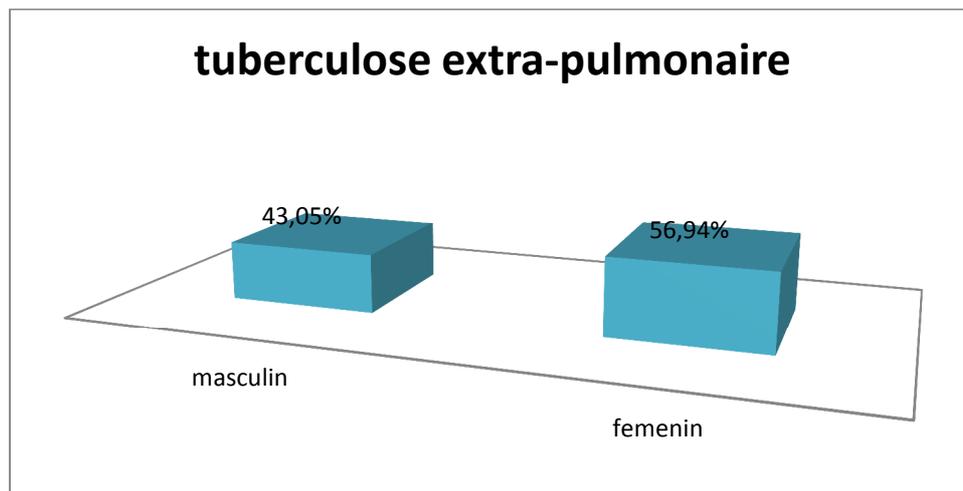


Figure 12. Répartition de la tuberculose extra-pulmonaire selon le sexe.

6.3.2. Distribution des cas de tuberculose extra-pulmonaire selon la localisation

Les différentes formes de TEP sont indiquées sur la figure et montre que les formes ganglionnaires et pleurales sont les plus fréquentes. La localisation ganglionnaires est la plus élevée 64 cas (88,88%) suivi par la forme pleural 6cas (8,33%), uro-génital (1,38%) et autre forme (1,38%).

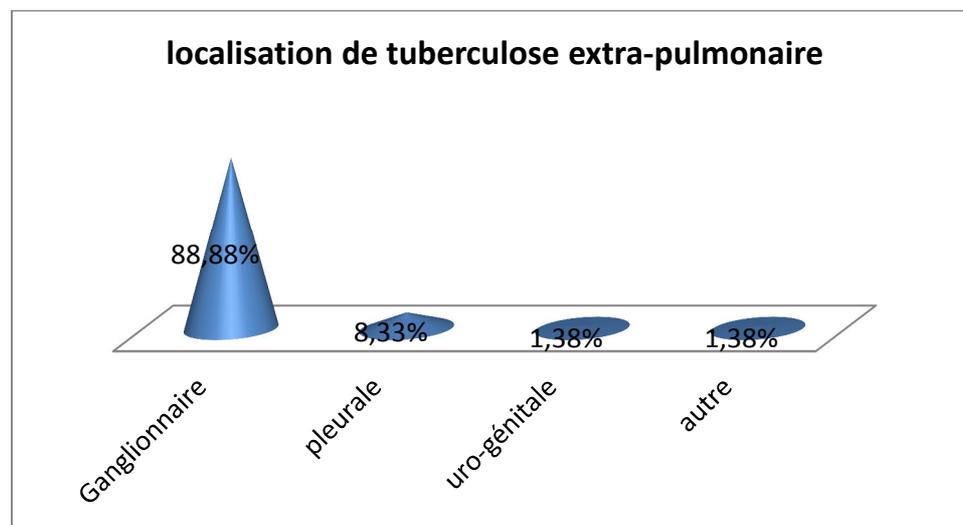


Figure 13. Répartition des cas de tuberculose extra-pulmonaires selon la localisation.

7. Discussion des résultats d'étude rétrospective sur la tuberculose

Les poumons sont les lieux les plus privilégiés de la localisation tuberculeuse mais nos résultats montrent que la faveur de localisation est extra-pulmonaire, cette dernière représente un pourcentage de 60%. Ces résultats sont différents de ceux des autres travaux qui ont montré une prédominance pulmonaire de 85,26% des cas de tuberculose (**Raymond, 1998**).

Nous avons constaté dans notre étude que la tuberculose touche les deux sexes dont la localisation extra-pulmonaire est dominante chez les femmes avec une prévalence de 56.94% par rapport à (43.05%) chez le sexe masculin. Le sexe ratio (F/H) est de 1,32. Ce qui concorde avec les résultats d'autres travaux, comme ceux réalisés au Maroc dont les femmes sont plus touchées par la tuberculose extra-pulmonaire avec un ratio de 2 (**Tebba, 2017**). Par contre dans la localisation pulmonaire on constate une prédominance masculine. Le sexe ratio est de 1,25 en faveur des hommes, avec une répartition de (52%) de sexe masculin et (48%) de sexe féminin due à l'exposition du sexe masculin aux facteurs de risque telle que les travaux physiques intenses malgré l'insuffisance alimentaire, le tabagisme, la consommation de drogue et la promiscuité ces résultats et concorde de celle de (**Bercion, 1997. Snouber, 2002.**)

L'âge des patients diagnostiqués durant cette période a été un facteur important dans la sensibilité à l'infection par le bacille de Koch. Ainsi, il a été constaté que les enfants de moins de 14 ans étaient les moins touchés par cette bactérie. Cela est due à une meilleure prise en charge par les moyens de prévention telle que la vaccination par le BCG ainsi que les plans nationaux de lutte contre la tuberculose (**Royet et al., 2014**).

L'âge moyen de nos patients atteints de tuberculose pulmonaire était de 33,8 ans, le sujet âgé de [25-34] paraissent les plus touchés (13 cas) suivie de ceux de [35-44] (11 cas), cette tranche d'âge constitue la couche la plus active de la population (fonctionnaires, étudiant), entraînant un contact plus fréquent avec des cas de tuberculose. Nos résultats concordent avec les travaux de plusieurs auteurs, qui ont rapporté des proportions élevées de tuberculose dans cette catégorie de population (**Amrane et al., 1993 ; Dembele J.P, 2004 ; Gagnière et al., 2011 ; Che et al., 2011 ; Kalappan et al., 2006**).

Chez les patients âgés de 66 ans ou plus, 14.58 % ont été diagnostiqués positifs. Ces sujets représentent un groupe vulnérable et à risque à toutes les infections. Ce qui s'explique par l'affaiblissement du système immunitaire et les différentes maladies chroniques associées. Ces résultats sont compatibles avec ceux d'autres auteurs qui confirment que le risque

d'infections augmente avec l'âge (Yacoub et al. ,2009 ;Fettal et al., 2009 ; Touré et al.,2010 ; Elkard et al .,2015) .

Dans les pays développés, la tuberculose affecte surtout les personnes dont l'âge est supérieur à 70% à l'exception des personnes qui sont nées à l'étranger en particulier en Afrique Subsaharienne où la maladie touche des différents âges (Antoine et Che, 2011).Dans les pays en développement la maladie touche en priorité les gens entre 15 et 45 ans soit 75% c'est-à-dire le groupe économiquement le plus productif entraînant des perturbations sur le plan économique et social.

Nous avons constaté que la tuberculose ganglionnaire représente 88.88% de tuberculose extra-pulmonaire, un taux plus élevé par rapports aux autres localisations ces résultats concordent avec ceux de la ville de oudjeda du Maroc dont la tuberculose ganglionnaire représente 62.38% de cas de TEP (Hassaine, 2014).

On remarque qu'il y'a un changement de profil de la tuberculose classique dont le taux de tuberculose extra-pulmonaire est de plus en plus croissant, donc il est nécessaire de préoccuper de réorienter la priorité sur la tuberculose extra pulmonaire.

CONCLUSION

Les techniques d'identifications microbiennes présentent un grand intérêt dans le diagnostic de routine des pathologies infectieuses. Cette étude est basée sur les techniques usuelles qui sont utilisées dans les laboratoires des hôpitaux en Algérie.

Au terme de ce travail on a détecté plusieurs agents pathogènes (parasites, bactéries et virus) dans différents prélèvements biologiques (urines, crachat, LCR , sang....) par des techniques simples et moins coûteuses.

Durant notre stage une étude rétrospective a été faite sur la tuberculose en étudiant un échantillon de 120 cas. Les résultats ont révélé que les sujets de sexe masculin sont plus touchés par la tuberculose pulmonaire alors que le sexe féminin est plus touché par la tuberculose extra-pulmonaire. Cependant, les patients âgés de 25 à 44 ans étaient les plus touchés. Sur les 120 patients, nous avons enregistré 48 patients atteints de la tuberculose pulmonaire et 72 patients atteints de la tuberculose extrapulmonaire dont la tuberculose ganglionnaire représente la forme la plus dominante avec 88.88% de tuberculose extrapulmonaires.

Donc, il serait intéressant de diagnostiquer la tuberculose et les pathologies infectieuses par les nouvelles techniques surtout les techniques moléculaires qui sont plus fiables et donnent plus d'informations sur l'agent pathogène dans un temps réduit. Contrairement aux techniques d'identification qui ont été utilisées dans les laboratoires de routine qui dure longtemps (3 jour ou plus pour l'ECB), et ne donnent pas beaucoup de détails sur les agents causales de la pathologie.

- 1-Ait khaled N, Enarson D, Billo N (1999).** Epidémiologie de la tuberculose et de la résistance aux antituberculeux. *Revu Maladie Respiratoire*.14 :5S8_5S18.
- 2-Alexander N, Glazer H N (2007).** *Microbial biotechnology fundamental of applied microbiology* 2ed edition.p35.
- 3-ANOFEL. (2014).** Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie polycopie parasitologie medicale , Generalite et définition. P 11
- 4-Avril J L , Dabernat H, Denis F Monteil H (1992).** *Bactériologie clinique*, 2^{ème} édition,,Edition marketing, Paris, P. 989 /990.
- 5- Barbach Y (2014).** *La prise en charge des méningites au niveau des urgences CHU HassanII (A propos de 15 cas)*, Thèse pour l'obtention du doctorat en médecine université sidi mohamed benabdeleh fes N° 005/14,85 p.
- 6-Baudry C, Huguet B(2006).***Bacteriologie et immunologie* ,2ed edition p6-46.
- 7-Belouni R ,T alimaamar H, et Rahal K(2000).** *Etude cyto bactériologique et biochimique du liquide céphalorachidien*. Edition de l'Institut Pasteur d'Alger. Pp. 7.
- 8-Berthet J, Leclerc I, Vallaey T Gessain A,Manuguerra J.C (2013).** *Les puces à ADN en virologie : concepts de base et applications pour la détection des virus* 17(2) ,61-80.
- 9-Bianchi V , Elnabassi S, Duployez N (2013).***Bacteriologie virrologie* ,prepa pharma groupe de boek p xii 137p.
- 10-Bodonirina v.p (2012).***Place de l'examen des crachats dans le diagnostic de tuberculose pulmonaire au CSBII Ekar Imady*,Thèse de doctorat en médecine, Université d'Antananarivo, N°8359. 127 p.
- 11-Bouskraoui M, Zouair S ,Sora N ,Benaouda A ,Zerouali M (2017).** *Guide pratique des bactéries pathogènes* .société marocaine d'infectiologie pédiatrique et de vaccination. édition 2017.P11.
- 12-Bruneel F, M wolff (2000).** *méningites aiguës*, *Encyc méd Médicales chirurgie* Elsevier SAS,Paris , neurologie p18.
- 13-Carpentier A-S (2006).** *Le transcriptome : un domaine d'application pour les statistiques, de nouveaux horizons pour la biologie*. Thèse pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de l'Université d'Evry, Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire, Université d'Evry, France : 137p.

- 14-Carbonnelle E(2009).** *Apport des examens biologiques dans le diagnostic positif, la détermination de l'étiologie et le suivi d'une méningite suspectée bactérienne.* Médecine et maladies infectieuses 39 (2009) 581–605 ; page 585.
- 15-Cassuto J.P(1999).** *De la maladie de vache folle a celle de Creutzfeldt-Jakob,* Edition odile jacob P 69.
- 16-Che D, Antoine D(2011).** *Epidémiologie de la tuberculose en France en 2008,* Médecine et Maladies Infectieuses. 41 :372-378.
- 17-Crouzilles C (2012).** *Infeciologie et hygiene - Gestion des risques et soins infirmiers* nouvelle édition. Unité d'enseignement 2.10-45 editeur Elsevier Masson 173p.
- 18-Davide J.S ,Rloger A. H, Paul A.H(1996).** *Atlas d'ophtalmologie clinique .2^{eme} édition* de boeck. amazone France. p82.
- 19-Dawit A, Ephrem K, Nagesh S, Gebreselassie S, Deribe F, Jemal A (2004).** *Medical Parasitorlogy* p 3- 4.
- 20-Delfraissy J.F, Murgue B .Evelyne J.M (2013).** *La Recherche en Microbiologie et Maladies Infectieuses* stratégie nationale de recherche, Aviesan.
- 21-Delarras C(2014).** *Pratiques en microbiologie de laboratoire.* lavoisier Paris p 22-29.
- 22-Denis f (2002).** *Les bactéries, les champignons et parasite transmissibles de la mère a L'enfant,* john Libbey Eurotext, Paris. p199.
- 23-Dembele J.P (2005).** *Aspects épidémiologique de la tuberculose pulmonaire à bacilloscope pulmonaire à bacilloscopie positive au mali pendant la décennie1995-2004.* Thèse de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie d'université de Bamako. 85p.
- 24-EFS (2010).** *Encyclopedie familiale de la santé comprendre prévenir et soigner.* Amazone France, p 282
- 25-Eric PH (2010).** *Encyclopédie familiale de la santé comprendre prévenir et soigner* Amazone France P 282.
- 26-Elkard I, Zaghba N, Benjelloun H, Bakhtar A , Yassine N (2015).** *Tuberculosis of the lung bases. Revue de pneumologie Clinique.72:190-194.*
- 27- Eyquem A ,Alouf J ,Montagnier L (2000).** *Traité de microbiologie clinique* deuxièmes Mise à jour et compléments ,piccin Nouva Librairia S.p.APadoue ,Italie p84.

- 28-Fettal N, Taleb A, Abdelmalek M (2009).** La tuberculose pulmonaire chez le sujet âgé : à propos de 17 cas. *Revue des Maladies Respiratoires*. 26.124.
- 29-Flandrois J.P, Courcol R, Lemeland J.F, Ramus M, Sirot J, Soussy CJ (1997).** *Bacteriologie medicale*, collection AZAY, presses universitaire de lyon. p151.
- 30- Janeway C. A et Murphy K (2018).** *immunobiologie de janeway*. Traduction de pierre L. Masson. 4^{ieme} édition de boek superieur p763.
- 31-Janeway C.A, Murphy K, Travers P, Walport M (1999).** *Immunobiologie*. 3^{ieme} édition de boek superieur p 501.
- 32-Jawetz E, Melnick J.L, Adelberg E.A (1973).** *Microbiologie médical*, Erenes Amazone France .paris p 239.
- 33-Hassaine M (2014).** *Etat des lieux et prévalence de la tuberculose extra-pulmonaire la ville d'Oujda entre 2003 et 2010*. Thèse de doctorat en pharmacie. Rabat. 188 p.
- 34- Hachi A (2010).** *Les méningites purulentes chez l'enfant à l'hôpital hassani de nador (a propos de 102 cas)*. Thèse pour l'obtention du doctorat en médecine université mohamed v .
- 35-Hurax J.M (2008).** *Virologie*. faculté de médecine université de pierre et marie curie .p60.
- 36-Grosjean J, Clavé D, Archambaud M, Pasquier C (2017).** *Bactériologie et virologie pratique*. 3^{eme} édition révisé de boeck p 22 ,128.
- 37-Guillevin L (2011).** *Sémiologie medicale*. 2^{eme} édition médecin science publication Lavoisier p 44.
- 38- Kubab N, Hakawati I, Alajati-Kubab (2015).** *Guide des examens biologique* 6^{ieme} édition-Edition Lamarre Amazone France . p193.
- 39-Lamoril J, Bogard M, Ameziane N, Deybach J.C, Bouizegarène P (2007).** Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007 : Molecular biology in clinical microbiology in 2007. *Revue générale et analyse prospective* : 6-17.
- 40-Lecomte C (2004).** *Modélisation génétique de l'oncogenèse mesotheliale induit par les fibres minérales*. Thèse doctorat université de paris XII discipline biologie cellulaire et moléculaires. 224P
- 41-Le porrier M (2011).** *Petit encyclopédie médicale*. Hamburger :guide de pratique médical 20^e édition, médecine science la voisier France. p 1574.

- 42-Le faou A (2012).** *Virologie humain.* Edition Pradel wolters Kluwer France .470 P.
- 43-Le frère J.J (2000).***Tansfusion sanguine :une approche sécuritaire eurotexte ,amazon France p88.*
- 44-Le minor L, Veron M (1989).** *Le monde bactérien.* In Bactériologie médicale.Paris :Médecine-sciences. p 1.
- 45-Mammette M (2002).***Virologie médicale,* collection azay presse universitaire de lyon p 109- 145 .
- 46- Mertelsmann R, Engelhardt M, Berger D.P (2011).***Précis d'hématologie et d'oncologie .*traduction supervisée par P. Moreau et X.lcieu Amazon France .P25.7
- 47-Meyssonier V (2012).***Epidémiologie de la tuberculose et de la résistance aux antituberculeux ; santé publique et épidémiologique.* Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie. Paris .161p.
- 48-Meziani M (2012).***Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des Entérobactéries et Pseudomonas.* Mémoire de Magistère Université Mentouri Constantine option Technologie des explorations biochimiques. 96p.
- 49-Moussard C (2003).** *Principe des techniques de biologie moléculaire.* 2 eme édition révue augmentée p 34.
- 50- Mullis K.B (1990).** *The un usual origin of the polymerase chain reaction.* Scientific. American., 262 :56-65.
- 51-OMS [en ligne]**Rapport sur la lutte contre la Tuberculose dans le monde. Disponible : <http://www.who.int/globale-report/gtbr2017/>consulté le 03/06/2018.
- 52-Prescott L. M (2002)** *Microbiology.*5th Edition The McGraw–Hill Companies, p 336.
- 53-Pebert F (2003).** *Maladies infectieuses,* toutes les pathologies des programmes officiels des études médicales et paramédicales Edition heurs de france p77-87.
- 54- Pignatelli I S, Simpore J, Ruggieri M, Musumeci S (2000).** *Effectiveness of forced rehydration and early re -feeding in the treatment of acute diarrhoea in a tropical area.* Minerva Pediatr., 52 (7-8):357-366.
- 55- Raisonnier A (2006).** *Biologie génique,* Université Pierre et Marie Curie .P 61.

- 56-Raymond D, Ralainor D, Botsy J, Rakotomang J.D.M, Beson D.R (1998).** *Lutte antituberculeuse et aspects épidémiologiques de la tuberculose* : province de Toliara 1995. Arch. Inst Pasteur Madagascar ; 64 (1&2) : 37- 40.
- 57-Rimbaud J.C et Bouhnik Y (1994).** *Le livre de l'interna: Gastro entérologie.* Flammarion, ISBN: 2-257-10155-3. 580 p.
- 58--René C (2010).** *250 examens de laboratoire.* Prescription et interpretation 11eme édition Elsevier Masson. p232-235.
- 59-Reymond N (2004).** *Bioinformatique des puces à ADN et application à l'analyse du transcriptome de Buchnera aphidicola* .Thèse doctorat l'institut national des sciences appliquées de Lyon.325p
- 60-Riper C (2013).** *mycologie médical* .Lavoisier Paris ISBN :987-2-7430-6488-4 p631.
- 61-Roy A ,Eisehut M ,Harris R.J ,Rodrigues L.C,Sridhar S,Habermann S,Sne III, Abubakar I (2014).** *Effect of BCG vaccination against Mycobacterium tuberculosis infection in children* ; systematic review and meta-analysis. BMJ. Aug5;349:g4643.
- 62-Stora D (2013)** .*pharmacologie et thérapeutiques* .EUdeuxieme edition Lammar france.
- 63-Saiki R.K, Gelfand D.H, Stoffel S, Scharf S.J, Higuchi R, Horn G.T,Mullis K.B and - Erlich H.A. (1988).** *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.* Science, 239,487-491.
- 64- Snouber A, et coll (2002).** La tuberculose dans un service de pneumologie à propos d'une série de 1070 cas au CHU d'Oran en Algérie. *Revue Maladies Respiratoire*.Vol29 janvier.
- 65- Tagu D (1999)** .*Techniques de biologie moléculaires.* INRA edition .paris p 29.
- 66-Tagu D, Moussard C (2003).** *Principe des techniques de biologie moléculaire.* 2 eme édition revue augmentée : 39-40
- 67-Tebaa H (2017).** *La tuberculose ganglionnaire cervicale étude rétrospective à propos de 15 0 cas* .Thèse doctorat en médecine faculté de médecine Marrakech 117p.
- 68-Tellaa R (2013).** *Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic des infections fongiques invasives.* Thèse du doctorat en pharmacie, Université Mohammed V -SOUISSI-, Faculté de médecine et de pharmacie Rabat : 157p.
- 69-Tony H et Paul S (1999).** *Atlas de poche de microbiologie* .Médecine-Sciences Flammarion Paris p18-228.

- 70-Toujani S, Ben Salah N, Cherif J, Mjid M, Ouahchy Y, Zakhama H et al (2015).** La primo-infection et la tuberculose pulmonaire. *Revue de pneumologie clinique.* ; 71 : 73-82
- 71-Touré N, Dia Kane Y, Diatta A, Ba Diop S, Niang A, Ndiaye E, Thian K, MBaye F, Badiane M, Hane A (2010).** Tuberculose du sujet âgé. *Revue des Maladies Respiratoires* .27(9)1062-1068.
- 72- Tortora G.J , Derrickson B (2017).** *Manuelle d'anatomie et de physiologie humaines.* 2eme édition. version française de la dixième édition de l'introduction to the human Body- The Essentials of Anatomy and physiology . Adaptation française de Sophie Dubé et Louise Martin de boeck supérieur. P612.
- 73-Vandepille J, Engbae K (1994).** *Bactériologie clinique* : Techniques de base pour laboratoire, Organisation mondiale de la santé. Pp. 26 – 30.
- 74-Varaine F et Riche M.I (2014).** *Tuberculose guide pratique à l'usage des médecins, infirmiers, techniciens de laboratoire et auxiliaires de santé* médecins sans frontières et partenaire in health.305P
- 75-Vu Thien H (2009).** *Apport des examens microbiologiques au diagnostic des méningites bactériennes aiguës*, médecine et maladies infectieuses, p 463.
- 76--Yacoub S, Maalej S, Bourguiba M , Fakhfekh R, Slim L, Ben Saleh S, Ben Kheder A, et Drira I (2009).** La tuberculose pulmonaire du sujet âgé. *Revue des Maladies Respiratoires.* p 26.132.

ANNEXES

I-- Matériel de travail

A-Matériels

- bec bunsen
- Microscope standard.
- Lame (porte-objet).
- Lamelles (couvre-objet).
- Centrifugeuse.
- cellule de Nageotte (Leucocytomètre).
- Etuve à 37C°
- Boîte- Boîte de Pétri.
- Pipette de Pasteur.
- Anse de platine.
- une pince pour la distribution des disques d'antibiotiques.
- micropipettes.
- pissette.
- éprouvette.
- la trousse d'ELISA d'AgHBs, Anticorps Anti-HIV, Anticorps ,Anti- HCVet Anticorps anti-*Treponema pallidum* .

b. Milieux de cultures

- Gélose nutritif,
- Gélose Héктоen.
- Gélose chapman.
- Gélose de Mueller-Hinton : milieu de l'antibiogramme.
- milieux pour l'identification biochimique des bactéries. Gélose TSI , milieu urée-indole

c. Réactifs

- bleu de méthylène
- reactif de kovacs.
- Solution de Fuchsine.
- acide sulfurique.
- Alcool.
- Solution de May Grunwald.
- Solution de Geimsa.
- Huile d'immersion.
- Solution de l'Azarus (bleu acétique).

- tube contenant du citrate de sodium.
- d'acide acétique.
- l'eau distillé
- .-l'eau physiologique.

II. Compositions et caractéristiques des milieux de culture et réactifs utilisés

1. Gélose nutritive (GN)

Formule en g/l d'eau distillée

Peptone	10g
Extrait de viande	5g
Chlorure de sodium	5g
Gélose	15g
PH	7,2

Caractéristiques

- Milieu d'isolement courant
- Utilisé pour la culture des germes non exigeants.
- Répartie en boîtes de Pétri.

2. Mueller-Hinton (MH)

Milieu Muller- Hinton

Formule en g/l d'eau distillée

Infusion de viande du boeuf	300g
Peptone de caséine	17,5g
Amidon	1,5g
Gélose	17,5g
PH	7,4

Caractéristiques

- Gélose standardisée pour la réalisation de l'antibiogramme
- Permettant de tester l'action des antibiotiques sur les bactéries
- Peut être additionnée de sang (pour les streptocoques)
- Coulée en boîtes de façon à obtenir une épaisseur de 4mm.

3. Gélose Hekteon (HN)

(Pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pepsique de viande.....	12,0 g
- Extrait autolytique de levure	3,0 g
- Lactose.....	12,0 g
- Saccharose	12,0 g
- Salicine.....	2,0 g
- Sels biliaires	9,0 g
- Chlorure de sodium.....	5,0 g
- Thiosulfate de sodium	5,0 g
- Citrate ferrique ammoniacal	1,5 g
- Bleu de bromothymol	65 mg
- Fuchsine acide	40 mg
- Agar agar bactériologique	13,5 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,6 ± 0,2.

Caractéristique

- Milieu d'isolement des entérobactéries
- La présence d'extrait de levure et de sucre, la qualité des peptones favorisent la croissance des Salmonelles et des shigelles même fragile.

4- La fuchsine de ziehl

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

5- Le bleu de méthylène

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

7- les différents antibiotiques testés.

Antibiotiques	Abréviation	Charge (µg)	famille
chlorolamphénicol	C	30	phénicole
Céfotaxime	CTX	30	Céphalosporine 3ème génération
Acide-nalidixique	NA	30	Quinolone
Céfazoline	CZ	30	Céphalosporine 1ère Génération.
Tétracycline	TE	3	Tétracycline
Triméthoprim-sulfaméthoxazole	SXT	1.25+23.75	sulfamide
Ciprofloxacine	CIP	05	FLuroquinolone

8-Diametres de zones édités par le CFA-SFM ,2007

Antibiotiques	Abréviation	S	R
chlorolamphénicol	C	≥ 23	< 19
Céfotaxime	CTX	≥ 21	< 15
Acide-nalidixique	NA	≥ 20	≤ 15
Céfazoline	CZ	≥ 18	≤ 12
Tétracycline	TE	≥ 19	≤ 17
Triméthoprim-sulfaméthoxazole	SXT	≥ 16	< 10
Ciprofloxacine	CIP	≥ 22	< 19

III-composition de la trousse ELISA (ADVANCED)

1-composition de la trousse ELISA (ADVANCED) d'anticorps Anti-HCV.



Réactifs	Nature des réactifs	composition
R1	-Microplaque	-12 barrettes de 8 cupules sensibilisées avec des anticorps HCV.
R2	-Conjugué d'enzyme	Buffer contient de HRP recombiné avec l'antigène HCV.
R3	-Sérum de contrôle positif	-protéine stabilisée contient de L'Anticorps HCV.
R4	-Sérum de contrôle négatif	Protéine stabilisée inactive avec l'Anticorps HCV.
R5	-Diluant pour échantillon	-Protéine stabilisée.
R6	-Color A	-Peroxydase d'hydrogène(H ₂ O ₂).
R7	-Color B (solution TMB) chromogène	-Tetra methyl benzidine (TMB).
R8	-Solution d'arrêt	-L'acide sulfurique.
R9	-Solution de lavage Buffer (20x)	-il faut diluer avant utilisation
R10	-Films adhésifs	/

2-composition de la trousse ELISA (ADVANCED) d'anticorps Anti-*Treponema pallidum*.



Réactifs	Nature des réactifs
R1	-Microplaque 12 barrettes de 8 cupules sensibilisées avec des antigènes anti- <i>Treponema pallidum</i>
R2	-Conjugué d'enzyme
R3	-Sérum de contrôle positif
R4	-Sérum de contrôle négatif
R5	-Color A (Peroxydase d'hydrogène H ₂ O ₂)
R6	-Color B (solution TMB) chromogene.
R7	-Solution d'arrêt (L'acide sulfurique)
R8	-Solution de lavage Buffer (20x)
R9	-Films adhésifs

3-composition de la trousse ELISA (ADVANCED) d'anticorps Anti- HIV.



Réactifs	Nature des réactifs	composition
R1	-Microplaque	-12 barrettes de 8 cupules sensibilisées avec des antigènes VIH.
R2	-Conjugué d'enzyme	Buffer contient de HRP recombiné avec l'antigène HIV.
R3	-Sérum de contrôle positif HIV-1	-Sérum humain non activé contient des anticorps de HIV-1 dilués dans un tampon de protéine de bovin.
R4	-Sérum de contrôle positif HIV-2	-Sérum humain non activé contient des anticorps monoclonaux de HIV-2 dilués dans un tampon de protéine de bovin.
R5	-Sérum de contrôle négatif	Sérum humain normal dilués dans un tampon de protéine de bovin.
R6	-Color A	-Peroxydase d'hydrogène(H ₂ O ₂).
R7	-Color B (solution TMB) chromogène	-Tetra methyl benzidine (TMB).
R8	-Solution d'arrêt	-L'acide sulfurique.
R9	-Solution de lavage Buffer (20x)	-il faut diluer avant utilisation
R10	-Films adhésifs	/

4-composition de la trousse ELISA (ADVANCED) d' Antigène HBs.



Réactifs	Nature des réactifs	composition
R1	-Microplaque	-12 barrettes de 8 cupules sensibilisées avec des anticorps monoclonaux d'AgHBs
R2	-Conjugué d'enzyme	Buffer contient de HRP recombiné avec des anticorps d'antigène HBs.
R3	-Sérum de contrôle positif	-Sérum humain non activé contient des antigènes HBs dilués dans un tampon de protéine de bovin.
R4	-Sérum de contrôle négatif	Protéine stabilisée inactive avec l'AgHBs.
R5	-Diluant pour échantillon	-Protéine stabilisée.
R6	-Color A	-Peroxydase d'hydrogène(H ₂ O ₂).
R7	-Color B (solution TMB) chromogène	-Tetra methyl benzidine (TMB).
R8	-Solution d'arrêt	-L'acide sulfurique.
R9	-Solution de lavage Buffer (20x)	-il faut diluer avant utilisation
R10	-Films adhésifs	/

Résumé

Les techniques d'identification microbienne utilisées dans les laboratoires hospitaliers algériens sont des techniques faciles et simples qui permettent de diagnostiquer de nombreuses maladies infectieuses à partir d'un prélèvement biologique.

Le but de notre étude est d'évaluer ces techniques et d'étudier leur rôle dans la détection des maladies infectieuses, où la tuberculose est l'une des maladies les plus importantes, ce qui nous a conduits à mener une étude épidémiologique de cette maladie

L'étude épidémiologique de la tuberculose a été rétrospective d'environ 120 cas de tuberculose en 2017 enregistrés au Centre de lutte contre la tuberculose et les maladies respiratoires de l'EPSP de LAKHDARIA.

Les résultats ont révélé que les sujets de sexe masculin sont plus touchés par la tuberculose pulmonaire alors que le sexe féminin est plus touché par la tuberculose extra-pulmonaire. Cependant, les patients âgés de 25 à 44 ans étaient les plus touchés, nous avons enregistré 48 patients atteints de la tuberculose pulmonaire et 72 patients atteints de la tuberculose extrapulmonaire dont la tuberculose ganglionnaire représente la forme la plus dominante avec 88.88%.

La tuberculose reste un problème de santé publique sous les deux formes, il est donc nécessaire de prendre des mesures préventives strictes et un diagnostic précoce et rapide de la maladie. Nous devons donc utiliser de nouvelles techniques, plus efficaces et plus rapides, qui nous permettent de la détecter et de suivre L'évolution des pathologies infectieuses telle que les techniques moléculaires

Mots clés : les urines, liquide céphalorachidienne, liquide pleural, Tuberculose. Technique ELISA.

المخلص

تقنيات التعرف على الميكروبات المستخدمة في مختبرات المستشفيات الجزائرية هي تقنيات بسيطة سهلة تسمح لنا بتشخيص العديد من الأمراض المعدية من عينة حيوية.

الهدف من دراستنا هو تقييم هذه التقنيات ودراسة دورها في الكشف عن الامراض المعدية ، حيث يعد مرض السل من بين اهم هذه الامراض ما دفعنا الى القيام بدراسة وبائية لهذا المرض .

الدراسة الوبائية لمرض السل تمت باثر رجعي لحوالي 120 حالة اصابة بمرض السل لسنة 2017 سجلت بمركز مكافحة السل والامراض التنفسية بالمؤسسة العمومية للصحة الجوارية بالاخضرية .

حيث اوضحت النتائج أن الذكور أكثر تأثراً بالسل الرئوي بينما الجنس الأنثوي أكثر تأثراً بالسل غير الرئوي. كما ان المرضى الذين تتراوح أعمارهم بين 25 و 44 سنة كانوا اكثر اصابة بالمرض ،وسجلنا ايضا 48 حالة مرض بالسل الرئوي و 72 مرض بالسل خارج الرئوي حيث ان السل العقدي الأكثر شيوعا من بين اشكال السل خارج الرئة حيث يمثل 88.88%.

لا يزال مرض السل مشكلة صحية عامة في كلا الشكلين، لذا يلزم اتخاذ تدابير وقائية صارمة وتشخيص مبكر وسريع للمرض. إذ ان الكشف المبكر عن الأمراض المعدية ومعرفة سببها هو إجراء تشخيصي أولي وهام ، لذا يجب استخدام تقنيات جديدة سريعة و أكثر فعالية من الكشف عن المرض وإجراء متابعة لتطوره.

الكلمات الرئيسية : البول، السائل الدماغي الشوكي ، السائل الجنبى ، السل .تقنية الفحص المناعي عن طريق الانزيمات.

ABSTRACT

The microbial identification techniques used in the laboratories of Algerian hospitals are simple easy techniques that will allow us to diagnose several infectious diseases from a biological sample,

The purpose of our study is to evaluate these techniques and to study their role in the detection of infectious diseases, where tuberculosis is one of the most important diseases, which led us to carry out an epidemiological study of this disease.

The epidemiological study of tuberculosis was retrospective of about 120 cases of tuberculosis in 2017 recorded in the Center for Control of Tuberculosis and Respiratory Diseases at the Public Institution for Health and Prosthodontics of LAKHDARIA.

The results revealed that male subjects are more affected by pulmonary tuberculosis while the female sex is more affected by extra-pulmonary tuberculosis. However, patients aged 25 to 44 years were the most affected, we recorded 48 patients with pulmonary tuberculosis and 72 patients with extrapulmonary tuberculosis of which ganglionic tuberculosis represents the most dominant form with 88.88% extrapulmonary tuberculosis.

tuberculosis remains a public health problem in both forms, so it is necessary to take strict preventive measures and early and rapid diagnosis of the disease. Early detection and identification of infectious diseases

So we have to use new, more efficient and faster techniques that allow us to detect and track the evolution of infectious diseases such as molecular techniques

Key words: urine, cerebrospinal fluid, pleural fluid, Tuberculosis, enzyme-linked immuno-sorbente –assay (ELISA).