

# Revue Tunisienne de BIOLOGIE CLINIQUE

المجلة التونسية للبيولوجيا السريرية

**2022 - Volume 29, n°2**

**Organe de la Société Tunisienne de Biologie Clinique**

**ISSN : 2724-7201**

**eISSN : 2724-721X**

## **Editorial**

**Quelle médecine de laboratoire est nécessaire pour les Sociétés Mobiles?**

*Dr. Alexandre Haliassos*

## **Article d'Opinion**

**Utilisation des omics : La génomique et la Métabolomique au service de la santé**

*Guillaume Grzych, Mariem El Younsi*

## **Articles originaux**

**Hémovigilance en Tunisie : Expérience de l'Hôpital d'Enfants Béchir Hamza de Tunis**

*Hamida Jouini, Manel Ennaceur, Leïla Ben Hamed, Najet Moojaat, Slama Hmida, Nour El Houda Toumi*

**Comparaison des numérations plaquettaires sur anticoagulants à base d'acide éthylène-diamine-tétracétique et de citrate trisodique au Burkina Faso**

*Salam Sawadogo, Tondia Nicole Irénée Sanon, Koumpingnin Nebie, Donatien Kima, Tieba Millogo, Myriam Nikiema/Minougou, Aminata Minougou/Ouattara, Césaire Dianda, Eléonore Kafando*

**Evaluation de la microscopie à fluorescence à lampe LED dans le diagnostic de la tuberculose**

*Salma Maalej, Amal Chakroun, Salma Smaoui, Salma Hachicha, Nesrine Ben Said, Asma Ghorbel, Férièle Messadi-Akrout*

## **Case Report**

**First case of pouchitis due to *Prevotella disiens* and *Morganella morganii* co-infection**

*Hajer Battikh, Anis Haddad, Feryel Turki, Melek Karaa, Chiraz Bousbiaa, Mohamed Guelbi, Mohamed Jouini, Montassar J. Kacem, Meriam Zribi*

# REVUE TUNISIENNE DE BIOLOGIE CLINIQUE

## Bureau Exécutif de la STBC

<b>Présidente :</b>	<i>Pr. Manel Chaâbane</i>
<b>1<sup>er</sup> Vice-président :</b>	<i>Pr. Zied Aouni</i>
<b>2<sup>ème</sup> Vice-présidente :</b>	<i>Pr. Yousr Galai</i>
<b>Secrétaire générale :</b>	<i>Pr. Hajer Battikh</i>
<b>1<sup>er</sup> Secrétaire générale adjointe :</b>	<i>Pr. Yomna Ben Lamine</i>
<b>2<sup>ème</sup> Secrétaire générale adjointe :</b>	<i>Mme Sana Hammami</i>
<b>Trésorier :</b>	<i>Dr. Khalil Ben Abdallah</i>
<b>Trésorier adjoint :</b>	<i>Dr. Aïcha Kallel</i>
<b>Archiviste :</b>	<i>Pr. Mouna Sassi</i>

## Comité de rédaction

### Rédactrice en chef

*Pr. Yousr Galai*

### Rédacteurs en chef émérites

*Pr. Mohamed Chiheb Ben Rayana*

*Pr. Farouk Barguellil*

### Attachés à la rédaction

*Pr. Zied Aouni*

*Pr. Christophe Burucoa*

*Pr. Manel Chaâbane*

*Pr. Asma Ghariani*

*Pr. Kalthoum Kallel*

*Dr. Laurence Pieroni*

*Pr. Vincent Sapin*

*Pr. Mouna Sassi*

## SOMMAIRE

<b>Editorial.....</b>	<b>2</b>
<b>Quelle médecine de laboratoire est nécessaire pour les Sociétés Mobiles?</b> <i>Dr. Alexandre Haliassos</i>	
<b>Article d'Opinion</b>	
<b>Utilisation des omics : La génomique et la Métabolomique au service de la santé.....</b>	<b>7</b>
<i>Guillaume Grzych, Mariem El Younsi</i>	
<b>Articles originaux</b>	
<b>Hémovigilance en Tunisie : Expérience de l'Hôpital d'Enfants Béchir Hamza de Tunis.....</b>	<b>11</b>
<i>Hamida Jouini, Manel Ennaceur, Leila Ben Hamed, Najet Moojaat, Slama Hmida, Nour El Houda Toumi</i>	
<b>Comparaison des numérations plaquettaires sur anticoagulants à base d'acide éthylène-diamine-tétra-acétique et de citrate trisodique au Burkina Faso.....</b>	<b>17</b>
<i>Salam Sawadogo, Tondia Nicole Irénée Sanon, Koumpingnin Nebie, Donatien Kima, Tieba Mollo, Myriam Nikiema/Minougou, Aminata Minougou/Ouattara, Césaire Dianda, Eléonore Kafando</i>	
<b>Evaluation de la microscopie à fluorescence à lampe LED dans le diagnostic de la tuberculose.....</b>	<b>18</b>
<i>Salma Maalej, Amal Chakroun, Salma Smaoui, Salma Hachicha, Nesrine Ben Said, Asma Ghorbel, Férièle Messadi-Akrout</i>	
<b>Case Report</b>	
<b>First case of pouchitis due to <i>Prevotella disiens</i> and <i>Morganella morganii</i> co-infection.....</b>	<b>24</b>
<i>Hajer Battikh, Anis Haddad, Feryel Turki, Melek Karaa, Chiraz Bousbiaa, Mohamed Guelbi, Mohamed Jouini, Montassar J. Kacem, Meriam Zribi</i>	
<b>Instructions aux auteurs.....</b>	<b>38</b>

## Comité de lecture

Dr Adam Ben Nasr

Dr Meriem Achour

Dr Asma Ghariani

Dr Meya Abdallah Abdelkefi

Dr Brahim Nsiri,

Dr Mohamed Selim El Asli

Dr Cherifa Chaouch

Dr Mohamed Yassine Kaabar

Dr Christophe Burucuo

Dr Mouna Sassi

Dr David O'Callaghan

Dr Nejia Jmili Braham

Dr Emna Gouider

Dr Ons Hadad

Dr Emna Mhiri

Dr Paul Cottu

Dr Hajer Battikh Maaouia

Dr Salam Sawadogo

Dr Hamida Jouini

Dr Saloua Jemni

Dr Hela Baccouche

Dr Saoussen Chouchene

Dr Imene Zamali

Dr Sonia Chouaieb

Dr Ines Ghariani

Dr Sophie Besbes

Dr Leila Slim

Dr Tarak Dhaouadi

Dr Manel Chaabane

Dr Wijden El Borgi Lahouel

Dr Melika Ben Ahmed

## EDITORIAL



### Quelle médecine de laboratoire est nécessaire pour les Sociétés Mobiles? \*

\* à l'occasion du deuxième Congrès AFCB-EFLM LM4MS (Médecine de Laboratoire pour les Sociétés Mobiles) qui sera organisé à Héraklion (Crète, Grèce) entre le 2 et 5 octobre 2022.

#### Définitions

La médecine de laboratoire peut être définie comme « une science consacrée à la mesure quantitative ou à l'évaluation qualitative de toute substance pouvant être dosée dans tout type de liquide biologique de toute espèce animale, y compris l'homme, à des fins médicales ou de recherche. Les résultats de ces mesures sont traduits en informations exploitables pour améliorer les soins et/ou maintenir le bien-être d'un seul individu et de toute une population ».

Le laboratoire médical est le lieu où des tests sont effectués sur des échantillons de patients afin d'obtenir des informations sur leur santé contribuant au diagnostic, au traitement et à la prévention des maladies.

Un réfugié est **une personne qui a été forcée de**

**fuir son pays à cause de la persécution, de la guerre ou de la violence.** Un réfugié craint, avec raison, d'être persécuté du fait de sa race, de sa religion, de sa nationalité, de ses opinions politiques ou de son appartenance à un groupe social particulier. **Les réfugiés forment des Sociétés Mobiles.**

Parfois, les **mouvements migratoires formant des Sociétés Mobiles peuvent être volontaires motivés par les conditions économiques.**

Chacune de ces formes de Sociétés Mobiles présente des défis de santé différents. Certains de ces défis sont liés à l'origine des populations, d'autres à leur destination et à leur mode de déplacement. Elles sont également fonction des politiques nationales et des attitudes sociales appliquées aux Sociétés Mobiles et de leurs conditions de vie.

Plus de 300 millions de personnes migrent chaque année pour des raisons économiques. Le nombre d'individus contraints de se déplacer pour des raisons de guerre ou de conflits ne cesse d'augmenter. Ils traversent les frontières et deviennent des réfugiés, tandis que dans le même temps, des millions d'autres sont forcés de fuir leur foyer mais restent dans leur pays, formant les Sociétés Mobiles déplacées à l'intérieur du pays.



Camp de réfugiés en campagne.

## SUITE EDITORIAL

### **Problèmes de santé dans les Sociétés Mobiles**

La santé des Sociétés Mobiles est principalement affectée par les maladies infectieuses, les problèmes de santé mentale, ainsi que par les maladies chroniques. Elle dépend également de leur origine géographique, des conditions d'hébergement des structures d'accueil (camps des réfugiés ou milieux urbains-points chauds) où ils vivent, et de leur état physique et mental, soit préexistant, soit acquis lors de leur déplacement. Leurs problèmes de santé peuvent être similaires à ceux de la population générale, souvent avec une prévalence plus élevée. Chaque membre d'une Société Mobile devrait avoir un accès complet et ininterrompu à des soins de santé de haute qualité, sans discrimination fondée sur le sexe, l'âge, la religion, la nationalité ou la race. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) soutient les politiques visant à fournir des services de santé, quel que soit leur statut juridique. L'accès rapide aux soins de santé pouvant entraîner la guérison et réduire la propagation des maladies, il est dans l'intérêt des Sociétés Mobiles comme du pays d'accueil de veiller à ce que la population locale ne soit pas exposée à des agents infectieux importés sans raison évidente.

### **Rôle de la médecine de laboratoire**

Le rôle de la médecine de laboratoire dans la prise en charge des maladies d'une population autochtone donnée est clairement défini ; mais on ne peut pas en dire autant d'une Population Mobile. Les tests de laboratoire permettent de déterminer la présence, la propagation ou l'absence de maladies et de surveiller l'efficacité des traitements appliqués. Il est reconnu que 60 à 70 % de toutes les décisions concernant le diagnostic, le traitement, l'hospitalisation ou le suivi d'un patient sont fondées sur les résultats d'examens de laboratoire. Des experts de laboratoire bien formés et compétents travaillant en collaboration sont nécessaires pour jouer les nombreux rôles dans la résolution des problèmes de santé des Sociétés Mobiles. On trouve de tels laboratoires dans des structures d'accueil bien organisées.



**Laboratoire Médicale de camp**

### **Dépistage de la population pour des maladies spécifiques**

Le dépistage est l'application systématique d'un test afin d'identifier les sujets présentant un risque suffisant pour une maladie spécifique, parmi les sujets qui n'ont pas recherché de soins médicaux en raison de l'absence de symptômes du trouble dépisté. Ceux-ci peuvent bénéficier d'une évaluation plus approfondie et d'un suivi ou d'une action préventive directe. Nous pouvons détecter des marqueurs de maladie active ou latente et cela conduira à une guérison ou à l'atténuation de l'impact des conditions médicales qui peuvent survenir plus tard.

Les maladies infectieuses qui peuvent être systématiquement dépistées comprennent la tuberculose (TBC), l'hépatite virale, les MST et récemment le COVID-19. Les maladies non infectieuses peuvent également être dépistées comme les syndromes métaboliques dont le diabète (DM), les dyslipidémies, la drépanocytose, les malnutritions, l'insuffisance de vitamine D, etc.

Les drogues d'abus (DOA) peuvent également être dépistées (dans l'urine) par des instruments POCT en cas de comportement suspect.

Le dépistage des lésions précancéreuses telles que le cancer du col de l'utérus (test Pap), le cancer colorectal (test de recherche de sang occulte dans les selles) et le cancer de la prostate (PSA) a le potentiel de réduire la mortalité due aux néoplasies. L'OMS ne recommande pas le dépistage obligatoire des Sociétés Mobiles car il n'y a pas de preuves suffisantes des avantages d'une telle pratique, et cela peut provoquer de l'anxiété parmi les membres et la communauté locale.

### **Assistance diagnostique**

La médecine de laboratoire est cruciale pour déterminer avec précision la cause des maladies. Les maladies infectieuses peuvent souvent être diagnostiquées à l'aide de la bactériologie et, plus récemment, des tests rapides de détection des acides nucléiques. Le laboratoire de biochimie, utilisant le POCT ou des implémentations mobiles, est essentiel pour le diagnostic de maladies telles que les syndromes métaboliques (diabète), les maladies rénales, les maladies du foie, les syndromes cardiovasculaires aigus et chroniques, etc. Les laboratoires d'hématologie et d'histopathologie jouent également un rôle important dans le diagnostic des cancers et autres situations néoplasiques en l'absence d'importantes installations d'imagerie médicale sur le terrain.

### **Surveillance du traitement**

Les analyses de laboratoire jouent un rôle primordial dans l'évaluation et le suivi de l'efficacité d'un traitement médical. Les tests de bactériologie et de virologie, qu'ils soient classiques (microscopie, caractérisation biochimique) ou tests récents de biologie moléculaire, ont un rôle majeur dans le contrôle efficace des infections et la gestion de la résistance aux antimicrobiens. Les tests de biochimie et d'hématologie contribuent au suivi de diverses maladies non infectieuses. Récemment, de nombreux instruments POCT, hautement portables et plus robustes, utilisant des technologies de biologie moléculaire ont été introduits pour la détection et le diagnostic différentiel des agents infectieux (SRAS-CoV-2, grippe, MST, TBC, etc.).



**Instrumentation portable de dépistage de pathogènes par analyse de leurs acides nucléiques  
(Développé par l'Université de Crète)**

### **Evaluation du pronostic des maladies détectées**

Les effets indésirables potentiels dus à la maladie ou aux traitements médicamenteux peuvent être prévenus et évalués par des tests de laboratoire. Ceux-ci peuvent minimiser la gravité de la maladie et ses effets sur la mortalité, la morbidité et la qualité de vie. Dans ces cas, les POCT pour l'évaluation des substances thérapeutiques TDM sont d'une importance primordiale.

### **Augmenter la qualité des soins de santé**

Les systèmes de prestation de soins de santé visent à fournir des soins de qualité axés sur le patient en utilisant des approches sûres, efficaces, rapides, équitables et centrées sur le patient. Les laboratoires médicaux jouent un rôle crucial dans la prestation des soins de santé aux patients, car plus de 50 % des dossiers médicaux électroniques contiennent des résultats et des données de laboratoire. Ces informations et données fournies par les laboratoires permettent aux médecins et aux professionnels de la santé de prendre des décisions diagnostiques et thérapeutiques appropriées, fondées sur des preuves pour leurs patients. Les services de médecine de laboratoire sont la source la plus rentable et simultanément la moins invasive d'informations objectives nécessaires à la prise de décision clinique.

### **Surveillance de la santé publique**

La médecine de laboratoire joue un rôle important dans la détection, la classification, la gestion et le suivi des menaces pour la santé publique. Des informations précises fournies par le laboratoire médical sont cru-

ciales pour la surveillance des maladies et leurs programmes de contrôle. Avant une épidémie, la surveillance appuyée par un laboratoire médical permet une détection précoce des cas, même asymptomatiques. Lors d'une épidémie, un dépistage de la population pour les cas de la maladie doit être confirmé par le laboratoire médical pour évaluer les changements de l'agent étiologique et pour guider les décisions concernant l'affectation du personnel et des ressources de santé. Un soutien à différents niveaux pour la détection et l'endigement d'une épidémie est fourni par les laboratoires en fonction de leurs capacités. Les laboratoires de terrain (POCT) sont très utiles pour fournir des services de laboratoire à une Population Mobile. Des tests supplémentaires plus complexes sont généralement fournis par des laboratoires régionaux et/ou de référence à proximité. De plus, les laboratoires de référence peuvent identifier des agents pathogènes rares ou dangereux, détecter des agents infectieux émergents, en utilisant des réactifs et des tests de diagnostic rares récemment développés.

### ***Valeur Financière Ajoutée***

Compte tenu du rôle que joue la médecine de laboratoire dans la prévention et la sélection et l'application de traitements fondés sur des données probantes, l'utilité économique, telle que déterminée par l'analyse coût-efficacité, est très appréciée. Les tests de laboratoire médical permettent d'économiser du temps, de l'argent et des vies en assurant une détection précoce, une prévention et un traitement efficace des maladies.

### ***Aide à la recherche et au développement***

De plus, les laboratoires médicaux jouent un rôle important en concevant et en exécutant des projets de recherche, en particulier la recherche appliquée qui soutient les décisions fondées sur des preuves pour l'exercice des bonnes pratiques de laboratoire. Dans la mesure du possible, ces recherches doivent être menées dans des Sociétés Mobiles contenant des structures, où les conditions de vie représentent un véritable enjeu de santé. Cela est nécessaire car la recherche, conçue et réalisée dans des centres universitaires où les conditions diffèrent considérablement de la situation sur le terrain, ne peut pas toujours fournir des résultats reproductibles.

### **Conclusion**

La recherche en médecine de laboratoire sur le terrain conduit au développement et à l'amélioration d'algorithmes, de procédures, d'essais et de techniques de diagnostic appliqués dans les Sociétés Mobiles. Ceci, ainsi que l'implication des solutions de technologie informatique et des approches émergentes d'intelligence artificielle et de big data avec les implémentations POCT, conduira à l'amélioration de la santé des Sociétés Mobiles et du bien-être de la population autochtone, en empêchant la propagation de maladies bien connues, mais aussi émergentes et de lutter efficacement face à des problèmes de santé chroniques.

### **RÉFÉRENCES**

1. Bruns DE, Ashwood ER, Burtis CA. Clinical chemistry, molecular diagnostics and laboratory medicine. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editors. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 5th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Saunders; 2012. p. 3–6.
2. Mayo Clinic. Medical Laboratory Sciences – Academics Mayo Clinic School of Health Sciences; 2018. URL: <http://www.mayo.edu/mayo-clinic-school-of-health-sciences/careers/laboratory-sciences>
3. Owoaje E, Uchendu O, Ajayi T, Cadmus E. A review of the health problems of the internally displaced persons in Africa. Niger Postgrad Med J. 2016;23(4):161.
4. Palinkas LA, Pickwell SM, Brandstein K, Clark TJ, Hill LL, Moser RJ, et al. The Journey to Wellness: Stages of Refugee Health Promotion and Disease Prevention. J Immigr Health. 2003. January 1;5(1):19–28.
5. Wald NJ. The definition of screening. J Med Screen. 2001. March 1;8(1):1–1.

**Dr Alexandre Haliassos  
MD, PhD, EurSpLM**

# ARTICLE D'OPINION

## Utilisation des omics : La génomique et la Métabolomique au service de la santé

Guillaume Grzych<sup>1</sup>,  
Mariem El Younsi<sup>2</sup>

- 1 CHU Lille, Service Hormonologie Métabolisme Nutrition et Oncologie, F-59000, Lille France
- 2 Service des Maladies Congénitales et Héritaires, Hôpital Charles Nicolle, BabSouika, 1006, Tunis, Tunisie.

### INTRODUCTION

Actuellement, une meilleure compréhension de la physiopathologie de nombreuses pathologies complexes est nécessaire afin d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques mais également d'identifier des marqueurs non invasifs pour le diagnostic et pour le suivi des évolutions des pathologies chez les patients. Dans ce contexte, les stratégies «omics», telles que la génomique et la métabolomique, peuvent se révéler prometteuses (**Figure 1**).

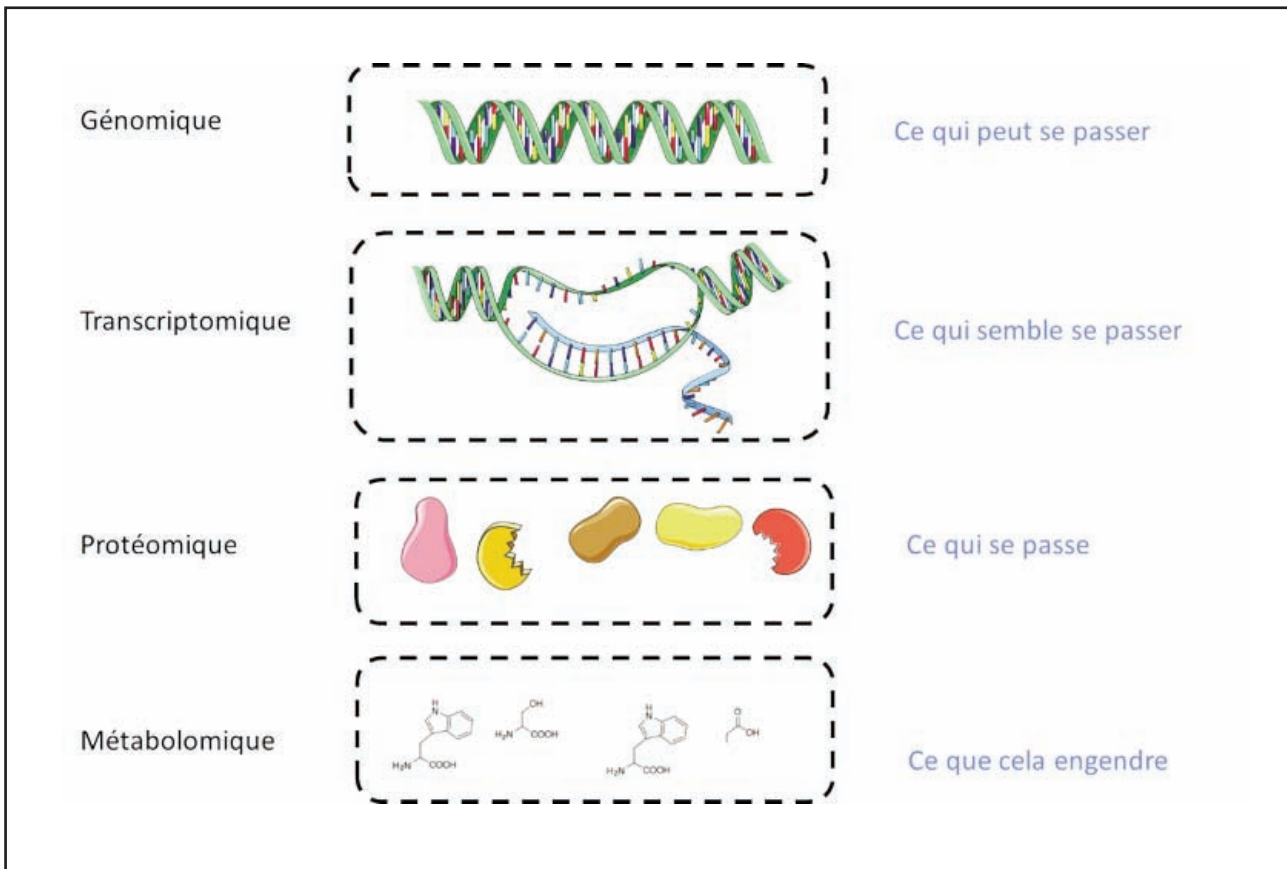


Figure 1: Stratégies omics et place de la génomique et de la métabolomique, extrait de Grzych G, 2017 (1).



## 1. GENOMIQUE

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), la « génétique » est l'étude de l'hérédité, et la « génomique » est l'étude des gènes et de leurs fonctions, et des techniques associées. L'achèvement du projet du génome humain (HGP) en 2003 a permis le développement de nouveaux outils en vue de son exploration qui permettent des diagnostics plus précis et plus rapides. Les technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) sont largement utilisées en clinique et en recherche. Ce séquençage peut être partiel et concerner des séquences cibles (panel de gène ou Whole Exome Sequencing WES) ou concerner la totalité du génome (Whole Genome Sequencing WGS).

La médecine génomique est déjà une réalité. Elle transforme la manière dont on prévient diagnostique, soigne et pronostique l'évolution d'une maladie. Elle concerne plusieurs enjeux (2, 3) :

**Enjeu de santé publique** : La médecine génomique révolutionne le parcours de soin, et donc l'organisation de la santé publique. Un nombre important de patients affectés par des maladies rares, des cancers, de maladies métaboliques, cardiovasculaires, neurologiques bénéficieront grâce au séquençage en routine de leur génome d'une prise en charge diagnostique et thérapeutique plus personnalisée et précise.

**Enjeu scientifique et clinique** : L'exploration moléculaire des pathologies jusqu'au bénéfice thérapeutique du patient en passant par la constitution et l'appariement de bases de données multiples qu'il s'agisse de données biologiques, cliniques, paracliniques ou environnementales est un enjeu majeur.

Au regard de la variabilité des différents génomes, il y a un intérêt majeur et primordial de disposer des données du génome Tunisien. En effet, les données importantes générées par le séquençage haut débit de l'ADN des patients, devront être comparées à un génome de référence. Or, chaque population possède des variations et des polymorphismes concernant le fonctionnement de ce génome et qui lui sont spécifiques. C'est pourquoi le projet « *Génome Tunisien* » doit être parmi les priorités de l'Etat tunisien qui doit assurer la plateforme technologique nécessaire pour le réaliser, d'autant plus que les compétences tunisiennes pour réussir ce projet existent déjà.

**Enjeu technologique**: les sciences et technologies de l'information et la communication sont appelées à converger avec les sciences de la vie et de la santé, la capacité à acquérir, stocker, distribuer, apparier, et interpréter des Big-Data. C'est une véritable filière d'excellence en sciences du calcul et des données en biologie de la santé qui va émerger. Aux côtés de serveurs, cœurs et méthodes de calcul intensif, le développement de logiciels pour l'interprétation et la modélisation de données permettra de relever le défi de la médecine génomique et plus largement de la médecine personnalisée.

**Enjeu économique** à la fois en termes de coût pour le système de santé mais également d'opportunité de développer une nouvelle filière industrielle. L'importance de cet enjeu économique est résumée dans la phrase suivante qu'on doit à Juan Enriquez, Harvard Business School : «Le moteur économique dominant de ce siècle sera la génomique. Ceux qui n'en apprendront pas le langage ne comprendront pas les forces qui s'exercent sur leur vie».

La forte compétition internationale autour de la médecine génomique s'explique par les enjeux qui lui sont rattachés. Dans le monde, plusieurs pays ont commencé à intégrer la médecine génomique dans leur système de santé : Estonie, Pays-Bas, Slovaquie, France, Japon, Qatar, Arabie Saoudite. Si la Tunisie ne s'organise pas pour développer sa médecine génomique, elle risquera de voir émerger un tourisme médical vers d'autres pays offrant ce type de services à forte valeur médicale ajoutée d'où l'émergence d'une inégalité des citoyens dans l'accès aux soins. De plus, une fuite massive des compétences tunisiennes dans les domaines de la génomique pourra avoir lieu.

Avant l'avènement des techniques de NGS, la stratégie adoptée était de cibler les différents exons du gène le plus fréquemment impliqués dans l'apparition de la maladie par la méthode de séquençage Sanger. Cependant, cette méthode est très coûteuse et lourde, surtout quand il s'agit de pathologie dont le gène muté est de très grande taille, sans hotspot de mutations ou encore avec une hétérogénéité de locus (plusieurs gènes pour un phénotype). Le séquençage classique présente l'inconvénient de ne pouvoir être réalisé que sur des fragments d'une taille moyenne < à 1000 pb. Actuellement, avec l'avènement des techniques de NGS, il est possible de faire l'analyse de tous les gènes impliqués dans le phénotype observé en une seule réaction soit par l'étude d'un panel de gènes soit par la réalisation d'un WES ou WGS, dans le cas où le résultat a été négatif avec le panel (4).

Dans la population tunisienne, la particularité est que plusieurs maladies sont dues à des mutations géniques avec un effet fondateur. Il est alors recommandé d'utiliser la méthode de screening par Sanger d'une mutation bien précise. Si cette mutation est absente, on passera alors au séquençage du reste des exons des gènes si leur nombre est limité. Si les résultats sont négatifs, on indiquera alors la technique du NGS. C'est l'exemple de la maladie de Crigler-Najjar, où il est primordial de cibler la mutation c.1070A>G dans le gène *UGT1A1* (5).

### **Faut-il faire un séquençage ciblé ou exome ?**

Quand les différents gènes d'une pathologie sont parfaitement définis, et que leur nombre n'est pas très important, il est préférable de faire un panel de gènes. Ses avantages sont une meilleure couverture et profondeur de lecture, une analyse bioinformatique plus simplifiée

et un espace de stockage des données minimisé. Son principal inconvénient est la nécessité d'une mise à jour de la librairie. Si la maladie n'est pas bien définie, un séquençage de WES/WGS est préférable, afin d'avoir une meilleure idée sur la totalité des gènes. Les WES/WGS permettent aussi la possibilité d'identifier de nouveaux gènes et d'une ré-analyse bioinformatique des données si nécessaire (des nouvelles découvertes des associations gène-maladie). Comparativement aux panels, les WES/WGS ont une couverture et une qualité de séquençage moindre ; de plus l'analyse bioinformatique est plus lourde et par conséquent un délai de rendu de résultat plus long. Les WES/WGS soulèvent aussi des préoccupations d'ordre éthique telles que les «*incidental findings*» (6, 7). Il est important de souligner l'importance d'une bonne description clinique et une concertation collégiale en prélude à toute indication d'une analyse en NGS.

La génomique a fait émerger un nombre de plus en plus important de variants moléculaires par rapport à la séquence de référence, la totalité de ces variants ne peuvent pas être expliqués et certains restent de signification indéterminée (appelés variants de signification indéterminée ou VSI). Même si des outils de prédiction informatique existent, les prédictions de ces derniers restent limitées et le choix de l'outil reste encore compliqué (8). De plus, les variations du génome ne peuvent expliquer seules, la physiopathologie complète des maladies. Il est donc nécessaire, de compléter cette approche génomique à d'autres approches afin de mieux comprendre l'ensemble des phénomènes biologiques en jeu.

## 2. LA MÉTABOLOMIQUE

La métabolomique est l'étude de l'ensemble des métabolites (petites molécules avec un poids moléculaire inférieur à 1 kDa) présents dans un organite, une cellule, un tissu, un organe ou un organisme (9). La métabolomique complète les techniques «omics» (génomique, transcriptomique, protéomique) permettant l'étude de propriétés biologiques dynamiques (Figure 1). Ce domaine émergent fournit des données complémentaires pour une approche intégrée afin d'appréhender des voies biologiques dans toutes leurs dimensions (génétique, expression génique, protéines, lipides, ...) (10). La métabolomique a déjà montré un grand potentiel dans les études de toxicité des médicaments, la modélisation de la maladie et le diagnostic, et peut être intégrée aux données génomiques et protéomiques à l'avenir pour fournir une compréhension approfondie des systèmes, des voies et de leurs interactions fonctionnelles dynamiques (11). Par exemple, l'approche intégrée a pu être utilisée pour reconstruire des réseaux biologiques dans le cadre de l'exploration du diabète type 2 en combinant et en confrontant des données omics chez des patients sains contre des patients diabétiques

de type 2.

Il existe deux approches en métabolomique : l'analyse globale, dite «non ciblée» sans a priori et l'analyse «ciblée» (12). L'analyse globale non ciblée permet de détecter un grand nombre de métabolites mais ne permet pas de les quantifier: les concentrations sont alors relatives (rapport numérique entre les groupes étudiés). Cette approche a l'avantage de pouvoir détecter un grand nombre de métabolites connus mais également des métabolites non identifiés (pics inconnus), qu'il est possible d'identifier a posteriori par des expérimentations complémentaires (structures moléculaires ...). Cependant, cette approche ne permet pas de quantification exacte et les analyses manquent parfois de reproductibilité. L'approche ciblée permet la détection et la quantification d'un nombre restreint de métabolites qui est fonction des standards internes utilisés dans le protocole expérimental. L'avantage de cette méthode est la forte reproductibilité et l'obtention de la concentration absolue des métabolites mais se limite à un nombre fini de métabolites. L'utilisation de l'une ou l'autre des approches sera donc dépendante de la question scientifique posée. Si l'objectif est la découverte sans a priori de métabolites impliqués dans un processus biologique donné, l'approche non ciblée apparaît celle de choix. Si la question biologique est précise, la métabolomique ciblée est plus adaptée.

Les deux principaux outils permettant les analyses métabolomiques sont la résonance magnétique nucléaire (RMN) (13) et la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS ou LC-MS) (14). L'utilisation de l'approche métabolomique nécessite la combinaison d'une technique séparative d'une part (chromatographie en phase gazeuse GC ou liquide LC), et d'une technique analytique d'autre part (spectrométrie de masse). Il est également possible de travailler sans étape de séparation (en injection directe: DI) ou directement par RMN. L'analyse par SM présente l'avantage d'être plus sensible que la RMN ; elle permet donc l'analyse d'un plus grand nombre de métabolites présents en concentrations moins élevées que l'analyse par RMN, mais aura une moins bonne spécificité que cette dernière (15). Le choix de la technologie repose donc en partie sur les concentrations attendues de métabolites dans le milieu biologique d'intérêt. Par exemple, dans le cadre du dosage des acides biliaires plasmatiques, les concentrations attendues sont de l'ordre de la nanomole par litre et seule la spectrométrie de masse a une sensibilité suffisante pour les détecter dans un volume classique d'échantillon (autour du mL).

Les avancées technologiques en spectrométrie de masse et en RMN permettent aujourd'hui l'analyse simultanée d'un grand nombre de métabolites. Cependant, ces technologies génèrent de grandes quantités de données qui nécessitent l'utilisation d'outils bio-statistiques et bio-

informatiques. Une expérience d'analyse de métabolome se compose donc de plusieurs parties : le design expérimental qui permet la sélection des échantillons (sujets, milieux biologiques), le traitement des échantillons, l'analyse des échantillons, l'identification des métabolites, le traitement des données par des outils bioinformatiques et biostatistiques (16).

La métabolomique permet alors de compléter la génomique, lorsque des profils métaboliques faisant intervenir des métabolites issus d'une voie commune sont modifiés, un séquençage des gènes codants pour les enzymes de cette voie peut alors être envisagé. Ceci permet alors de pouvoir identifier les processus physiopathologiques en cause. Cependant, les variations du génome ne sont pas forcément présentes pour expliquer des variations dynamiques observées en métabolomique. Ces variations peuvent alors être dues à des perturbations intervenant entre la transcription et la traduction, empêchant les ARN messagers de pouvoir être traduits (défaut de transcription, demi-vie raccourci des

ARNm, perturbation de l'épissage ...), ce qui peut être exploré par les techniques de transcriptomique. Par ailleurs, des perturbations peuvent également avoir lieu après la traduction, par des modifications dites «post traductionnelles», qui pourront alors être explorées par des techniques dites de «protéomique».

## CONCLUSION

L'avancée des technologies de biologie moléculaire, tel que le séquençage à haut débit, a fait naître l'espoir d'une compréhension totale des mécanismes moléculaires et des explorations cliniques qui en découlent. Cependant, l'expérience nous montre que tout ne peut être expliqué par la génomique, il est donc nécessaire de pouvoir compléter cette méthode par d'autres approches et technologies, par exemple la métabolomique. La combinaison de ces technologies permettra d'améliorer notre compréhension du vivant et la prise en charge des pathologies mais nécessite des investissements en termes de compétences mais aussi de technologies.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Grzych G. *Génétique*. De Boeck. 2017. <http://www.deboecksuperieur.com/ouvrage/9782807306868-genetique>.
2. Nestor JG, Groopman EE, Gharavi AG. Towards precision nephrology: the opportunities and challenges of genomic medicine. *J Nephrol*. 2018; 31(1):47-60. doi: 10.1007/s40620-017-0448-0.
3. McGuire AL, Gabriel S, Tishkoff SA, Wonkam A, Chakravarti A, Furlong EEM *et al*. The road ahead in genetics and genomics. *Nat Rev Genet*. 2020; 21(10):581-596. doi: 10.1038/s41576-020-0272-6.
4. Ormondroyd E, Border P, Hayward J, Papanikitas A. Genomic health data generation in the UK: a 360 view. *Eur J Hum Genet*. 2021: 1–8. doi: 10.1038/s41431-021-00976-w.
5. Petit FM, Bézieau S, Gajdos V, Parisot F, Scoul C, Capel L *et al*. The Tunisian population history through the Crigler-Najjar type I syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2008; 16(7):848-853. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201989.
6. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA *et al*. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med*; 369(16):1502-1511. doi: 10.1056/NEJMoal306555.
7. Saudi Mendeliome Group. Comprehensive gene panels provide advantages over clinical exome sequencing for Mendelian diseases. *Genome Biol*. 2015; 16(1):134. doi: 10.1186/s13059-015-0693-2.
8. Grzych G. *Evaluation des outils de prédiction in silico et intérêt des tests fonctionnels dans l'interprétation des variants identifiés par séquençage de nouvelle génération en génétique humaine*. 2018; [Thèse]. Université de Lille.
9. Bujak R, Struck-Lewicka W, Markuszewski MJ, Kaliszan R. Metabolomics for laboratory diagnostics. *J Pharm Biomed Anal*. 2015; 113:108-120. doi: 10.1016/j.jpba.2014.12.017.
10. Mamas M, Dunn WB, Neyses L, Goodacre R. The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Arch Toxicol*. 2011; 85(1):5-17. doi: 10.1007/s00204-010-0609-6.
11. Yugi K, Kubota H, Hatano A, Kuroda S. Trans-Omics: How To Reconstruct Biochemical Networks Across Multiple 'Omic' Layers. *Trends Biotechnol*. 2016; 34(4):276-290. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.12.013.
12. Lu W, Bennett BD, Rabinowitz JD. Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008; 871(2):236-242. doi: 10.1016/j.jchromb.2008.04.031.
13. Li H, Wang L, Yan X, Liu Q, Yu C, Wei H *et al*. A proton nuclear magnetic resonance metabolomics approach for biomarker discovery in nonalcoholic fatty liver disease. *J Proteome Res*. 2011; 10(6):2797-2806. doi: 10.1021/pr200047c.
14. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev*. 2007 Jan-Feb;26(1):51-78. doi: 10.1002/mas.20108.
15. Ritchie MD, Holzinger ER, Li R, Pendergrass SA, Kim D. Methods of integrating data to uncover genotype-phenotype interactions. *Nat Rev Genet*. 2015; 16(2):85-97. doi: 10.1038/nrg3868.
16. Barupal DK, Fan S, Fiehn O. Integrating bioinformatics approaches for a comprehensive interpretation of metabolomics datasets. *Curr Opin Biotechnol*. 2018; 54:1-9. doi: 10.1016/j.copbio.2018.01.010.

## ARTICLE ORIGINAL

# Hémovigilance en Tunisie : Expérience de l'Hôpital d'Enfants Béchir Hamza de Tunis

## Haemovigilance in Tunisia : Experience of the Children's Hospital Bechir Hamza of Tunis

Hamida Jouini<sup>1, 2</sup>

Manel Ennaceur<sup>1</sup>

Leila Ben Hamed<sup>3</sup>

Najet Moojaat<sup>2, 4</sup>

Slama Hmida<sup>2, 3</sup>

Nour El Houda Toumi<sup>1, 2</sup>

1 Laboratoire d'hématologie,  
Hôpital d'enfant Béchir Hamza  
de Tunis, Tunisie

2 Faculté de Pharmacie de Monastir,  
Tunisie

3 Centre national de transfusion  
sanguin (CNTS), Tunis, Tunisie

4 Unité centrale transfusion  
sanguine et banque de sang  
(UCTSBS), Tunis, Tunisie

Reçu le 28 septembre 2021 accepté le  
9 décembre 2021

Auteur correspondant :

Dr Hamida Jouini  
MCA Hospitalo-universitaire  
en Hématologie Biologique

Adresse :

Laboratoire d'hématologie, Hôpital  
d'Enfant Béchir Hamza de Tunis,  
167, Boulevard du 9 Avril 1938,  
Tunis, Tunisie

Courriel :

jouinihamida@gmail.com

### Résumé :

La transfusion sanguine est un acte thérapeutique complexe non dénué de risques. Afin de garantir la sécurité du patient et l'efficacité de l'acte transfusionnel, les différentes étapes de la chaîne transfusionnelle doivent être rigoureusement respectées.

L'hémovigilance est définie comme étant l'ensemble des procédures de surveillance organisées depuis la collecte du sang et de ses composants jusqu'au suivi des receveurs.

### Objectif :

Analyser les données disponibles sur les fiches d'incidents transfusionnels afin de dégager les insuffisances du système d'hémovigilance tunisien et proposer les améliorations nécessaires.

### Matériel et méthodes :

Notre travail a concerné 87 incidents transfusionnels déclarés à la banque de sang du laboratoire d'hématologie de l'Hôpital d'Enfants de Tunis sur une période de 3 ans (2018- 2020). Il est basé sur l'analyse des fiches de déclaration des incidents transfusionnels (FIT) et la comparaison avec d'autres systèmes d'hémovigilance à l'échelle internationale.

### Résultats :

La déclaration est restreinte aux effets indésirables receveurs (EIR) dont l'incidence est estimée à 10 / 1000 produits sanguins labiles (PSL). L'EIR le plus fréquent est de type allergique. Certains items de la FIT ne sont pas bien remplis et certains examens ne sont pas faits, démontrant le manque de formation en hémovigilance.

### Conclusion :

La révision des textes réglementaires, la restructuration et l'informatisation du secteur ainsi que la formation des acteurs de la transfusion sanguine seraient d'une grande valeur.

**Mots-clés:** Transfusion sanguine; incident transfusionnel; hémovigilance, Tunisie

### Abstract :

Blood transfusion is a therapy full of risk. To insure patient's security and transfusion's efficiency, all the transfusion chain must be respected.

Haemovigilance is defined as the surveillance procedure organized from the blood donation until the follow-up of the recipients.

### Objective :

Analyze the data available on the incident forms in order to identify the deficiencies in the Tunisian haemovigilance system and propose the necessary improvements.

### Materials and methods :

Our study concerned 87 adverse transfusion events declared to the laboratory of hematology of Children's Hospital of Tunis during 3 years (2018- 2020). It is based on analyzing the reports of adverse reactions and comparing with other haemovigilance systems in the world.

### Results :

The scope of application is limited to the recipient adverse blood events. The incidence is estimated to 10/1000 labile blood products. The most frequent adverse reaction is allergy. Some items on the incident forms are not filled and some exams are not realized showing the lack of haemovigilance education.

### Conclusion :

The revision of legislation, the restructuring of the sector as well as his computerization and the training of the actors of blood transfusion are very important.

**Keywords :** Blood transfusion, adverse transfusion events, haemovigilance, Tunisia

**INTRODUCTION**

La transfusion sanguine est un acte thérapeutique complexe non dénué de risques. Des effets indésirables peuvent se manifester à toutes les étapes de la chaîne transfusionnelle dès le don de sang jusqu'à son administration chez le receveur (1).

L'hémovigilance est l'élément clé de la sécurité transfusionnelle. Elle consiste à recueillir et évaluer les informations sur les effets indésirables résultant de l'utilisation des produits sanguins labiles (PSL) afin d'en prévenir l'apparition (2).

A travers cette étude, nous nous sommes proposé d'analyser les fiches d'incidents transfusionnels (FIT) déclarés à la banque du sang de l'Hôpital d'Enfants Béchir Hamza de Tunis pour faire le point sur les insuffisances du système d'hémovigilance tunisien afin de proposer les améliorations nécessaires.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES**

Il s'agit d'une étude rétrospective qui a concerné 87 incidents déclarés à la banque de sang du laboratoire d'hématologie de l'Hôpital d'Enfants de Tunis sur 3 ans (2018-2020). Durant cette période, 8400 PSL ont été délivrés aux services transfuseurs.

Les données recueillies à partir des FIT (modèle conforme à la circulaire 24/2007 du Ministère de la Santé portant sur l'organisation de l'hémovigilance en Tunisie), ont été saisies sur fichier Excel, selon un ordre chronologique croissant basé sur la date de la déclaration de l'incident transfusionnel.

Ces données ont été exploitées et exprimées sous forme de tableaux, histogrammes et secteurs.

**RÉSULTATS**

Les patients concernés par les déclarations d'hémovigilance étaient âgés entre 1 et 20 ans avec un âge médian de 5 ans et un sexe ratio H/F de 2,1.

Les données disponibles sur ces fiches ont permis de dégager plusieurs points importants.

Les FIT étaient datées et signées par le médecin déclarant, dans 66 % des cas.

L'âge des patients était mentionné dans 98% des cas.

**1. Incidence**

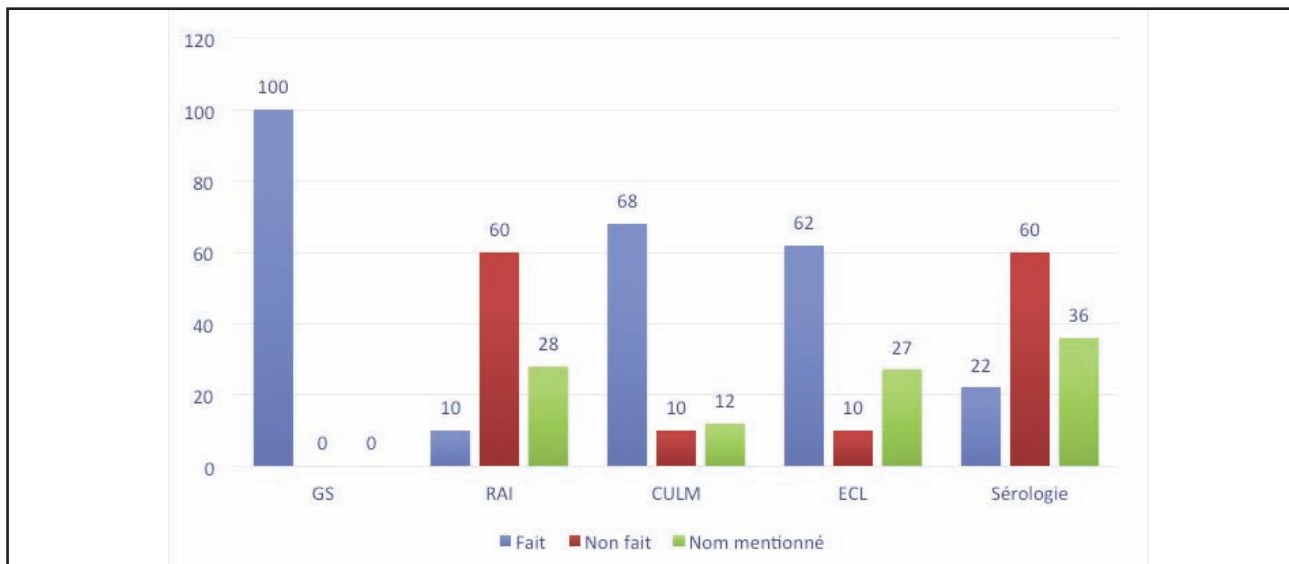
Pour 8400 PSL délivrés, 87 incidents transfusionnels ont été déclarés, soit une incidence de 10 / 1000 PSL.

**2. Contrôle pré-transfusionnel**

Les données relatives au contrôle pré-transfusionnel ont concerné la mention du groupe sanguin ABO (GS), la recherche d'agglutinines irrégulières (RAI), l'épreuve de compatibilité au laboratoire (ECL), le contrôle ultime au lit du malade (CULM) et la sérologie virale. Le GS du receveur a été mentionné dans 100% des cas. Dans la majorité des cas, la RAI, et la sérologie virale n'ont pas été faites. Par contre, l'ECL et le CULM étaient réalisés dans plus de 60% des cas (Figure 1).

**3. Produits sanguins labiles impliqués**

Les concentrés de globules rouges (CGR) étaient les plus incriminés dans la survenue d'effets indésirables dus à la transfusion (Figure 2).



**Figure 1 : Contrôles pré-transfusionnels**

GS : groupe sanguin  
CULM : contrôle ultime au lit du malade

RAI : recherche d'agglutinine irrégulière  
ECL : épreuve de compatibilité au laboratoire

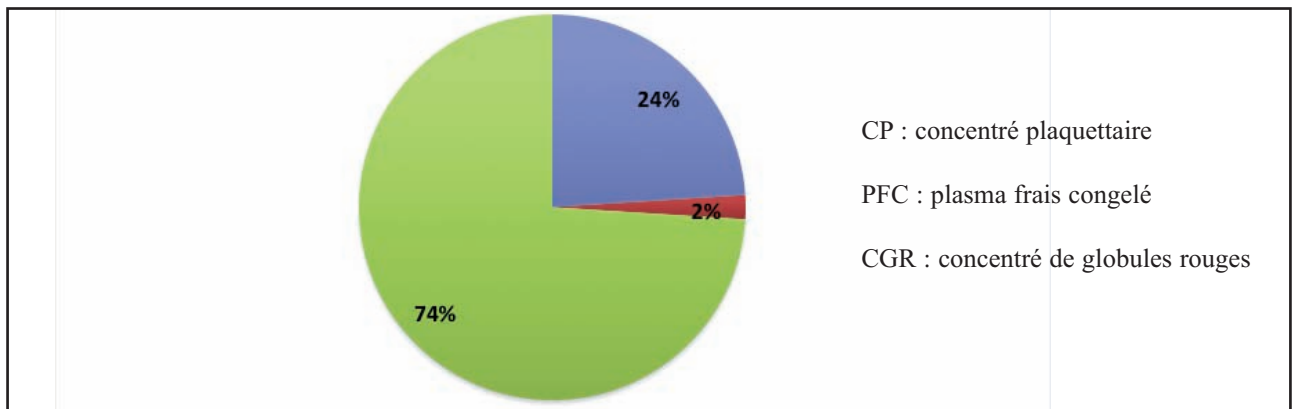


Figure 2 : Répartition des incidents transfusionnels selon le PSL impliqué

**4. Imputabilité**

L'imputabilité n'était pas mentionnée dans 70% des cas.

**5. Horaire et délai de survenue**

La majorité des incidents sont survenus pendant la transfusion, l'après-midi et la nuit (Figure 3).

**6. Gravité**

94% des incidents transfusionnels étaient de grade 1

(absence de menace vitale immédiate ou à long terme)

**7. Type de l'incident transfusionnel**

Les réactions allergiques (43%) étaient les plus fréquentes (Figure 4).

**8. Champ de déclaration**

Toutes les déclarations étaient en rapport avec des effets indésirables receveur.

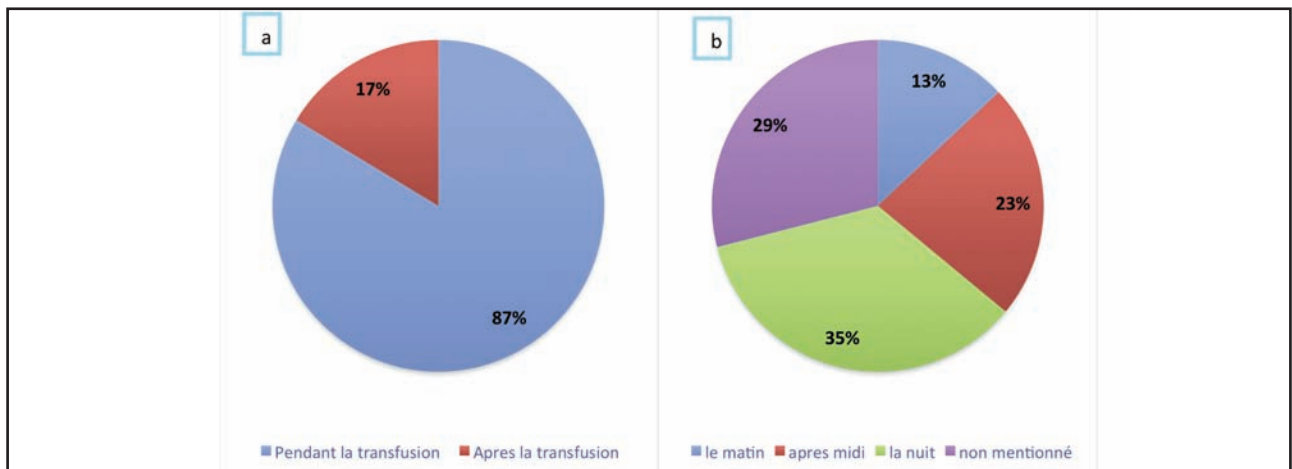


Figure 3 : Répartition des incidents transfusionnels en fonction du délais (a) et de l'heure de survenue (b)

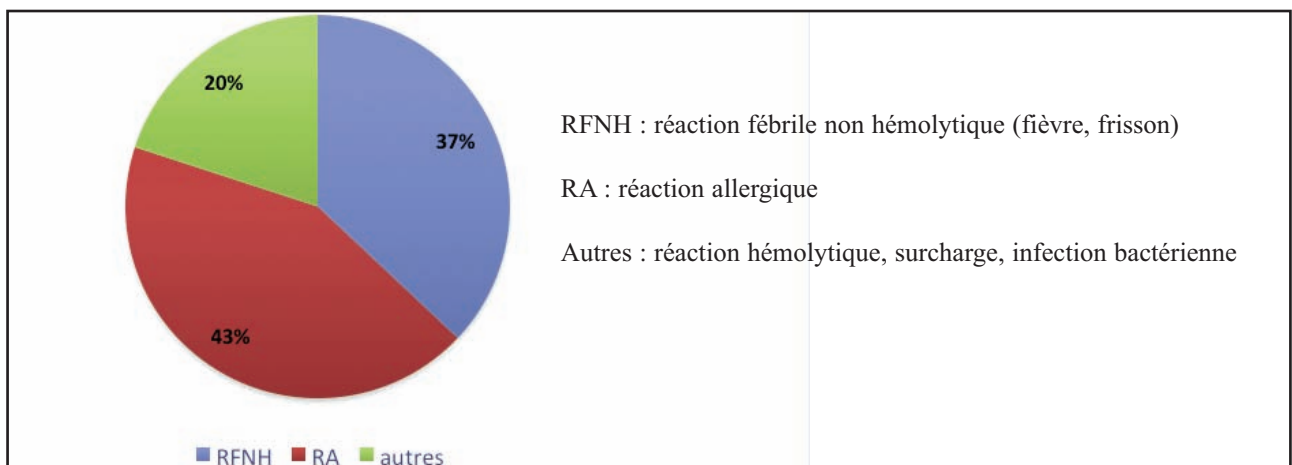


Figure 4 : Répartition des incidents transfusionnels par type

## **DISCUSSION**

### **Incidence**

L'incidence de déclaration des incidents transfusionnels à l'hôpital d'enfants de Tunis s'est nettement améliorée. Elle est estimée à 10/1000 PSL par rapport à une incidence de 4,66/1000 PSL en 2016. Cette amélioration témoigne d'une évolution de la formation du personnel médical et paramédical.

Elle est proche de celles rapportées dans les pays européens les plus avancés en terme d'hémovigilance (France : 7,4/1000 transfusions, Suisse : 12,3/1000 transfusions) (3,4).

### **Contrôle pré-transfusionnel**

Les examens pré-transfusionnels, non réalisés d'une manière systématique d'après nos résultats, sont très importants pour la sécurité du patient.

Nos résultats concordent avec une étude qui a été menée à l'hôpital la Rabta de Tunis (1).

En Tunisie, l'ECL est obligatoire. La RAI est indiquée pour les femmes multipares et les patients polytransfusés. Néanmoins, la fréquence et le délai de sa réalisation ne sont pas fixés (5,6). Elle permet d'identifier les anticorps développés chez le patient transfusé, pouvant causer une réaction hémolytique ou une inefficacité transfusionnelle (7).

Dans d'autres pays, l'ECL n'est pas préconisé en cas d'absence d'allo immunisation (7).

Le CULM est obligatoire. Il constitue le dernier verrou de sécurité de la chaîne transfusionnelle. Il permet d'éviter les accidents hémolytiques graves par incompatibilité ABO. Outre le contrôle de compatibilité de groupe entre CGR et patient, il comprend le contrôle de l'identité du patient et la vérification de la concordance entre le CGR et les documents immuno-hématologiques. Des études ont permis de fixer des recommandations permettant d'obtenir les résultats les plus fiables (8, 9, 10).

La sérologie virale n'est obligatoire que pour la qualification biologique du don de sang (5).

Depuis la mise en place du dépistage génomique viral chez les donneurs de sang dans certains pays, on a assisté à la diminution des séroconversions virales parallèlement à l'émergence de nouveaux risques infectieux (11).

### **Produits sanguins labiles impliqués**

Comme révélé par les données d'hémovigilance dans plusieurs pays, les CGR sont les PSL les plus incriminés dans les incidents transfusionnels. Ceci est en rapport avec un nombre important de transfusions comparativement aux concentrés de plaquettes et au plasma frais congelé (3, 4, 6).

### **Imputabilité**

Les FIT analysées au cours de cette étude n'ont pas permis d'évaluer la notion d'imputabilité (non mentionnée par le médecin déclarant dans 70% des cas).

Selon les données d'hémovigilance en Suisse et en France, la majorité des incidents transfusionnels déclarés ont une imputabilité probable ou certaine (3, 4).

### **Horaire et délai de survenue**

Les incidents transfusionnels sont plus fréquents pendant les gardes. En effet, les transfusions nocturnes augmentent le risque d'évènements indésirables receveurs du fait d'une équipe paramédicale souvent réduite d'où une surveillance moindre. Un éventuel incident transfusionnel nocturne risque d'être moins reconnu et traité.

Ainsi, il est important de rationaliser les prescriptions de PSL pendant les gardes et de les réserver aux urgences (12).

### **Gravité**

Comme dans le rapport de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) en France et les résultats d'une autre étude menée en Tunisie, la majorité des incidents transfusionnels observés n'engage pas le pronostic vital du receveur ni à court ni à long terme. Les incidents graves sont principalement dus à des réactions de surcharge et des réactions allergiques sévères (1, 3).

Les réactions hémolytiques sont souvent liées à une erreur humaine et sont évitables. Elles sont devenues rares mais peuvent être graves et responsables de décès (9).

### **Type de l'incident transfusionnel**

Les réactions allergiques et les RFNH sont les plus fréquentes. Ces résultats rejoignent ceux rapportés dans la littérature (13, 14). Cependant, les rapports d'hémovigilance de l'ANSM et de Swissmed révèlent une prédominance des allo-immunisations, suivies des RFNH (3, 4). Cliniquement, les réactions allergiques sont responsables d'urticaires, d'œdèmes et de manifestations cutanées diverses. Elles sont dues à une allergie chez le receveur contre les protéines du plasma du donneur ou à la présence d'IgE chez le donneur. La prémédication par des anti-histaminiques ou des corticoïdes ainsi que la transfusion de CGR déplasmatisés permettent d'éviter ces réactions.

Concernant les RFNH, elles se manifestent par des frissons et une hyperthermie. Elles sont généralement dues à la présence d'anticorps anti-HLA chez un receveur immunisé (15, 16). Les réactions hémolytiques certes moins fréquentes, sont plus graves. Elles peuvent être responsables d'hémoglobinurie, de douleurs lombaires, de frissons et d'hypotension allant jusqu'à l'état de choc. L'incompatibilité ABO et l'alloimmunisation sont en cause (15).

### **Champ de déclaration**

D'après les FIT, seuls les effets indésirables receveurs ont été déclarés. Comparativement à d'autres systèmes d'hémovigilance comme les systèmes français et suisse, le champ d'application de l'hémovigilance est restreint. Il ne tient pas compte des incidents observés chez les donneurs ni des erreurs transfusionnelles et des effets Near miss (3, 4,17).

### **Actions d'amélioration**

Afin d'améliorer le système d'hémovigilance Tunisien, plusieurs points sont à revoir au niveau des textes législatifs relatifs à l'hémovigilance.

Concernant la FIT, le modèle doit être actualisé, standardisé et disponible au niveau de chaque service transfuseur.

En effet, certains auteurs trouvent que le texte de la FIT est long. La mise en place d'un guide précis qui permet de remplir la fiche serait d'une grande aide.

Les insuffisances relevées au niveau des FIT sont dues à plusieurs facteurs dont l'urgence de la prescription, la banalisation de la FIT et la négligence de son intérêt dans la démarche de la sécurité transfusionnelle (1).

Quant au champ d'application de l'hémovigilance, la déclaration doit concerner tous les niveaux :

Effet indésirable survenu chez un donneur de sang (EIGD).

Certains peuvent parfois mettre en jeu le pronostic vital du donneur comme la réaction au citrate (en France 14,7 % des EIGD aphasés en 2011).

Effet Indésirable survenu chez un receveur de PSL (EIR)  
Incident grave affectant les différentes étapes de la chaîne transfusionnelle susceptible de compromettre la qualité du PSL: déviation par rapport aux standards et aux procédures de travail (Processus préparation, qualification, et distribution)

Information concernant un don de sang et pouvant affecter la qualité et la sécurité/ Information Post Don (IPD)

Incidents évités de justesse (nearmiss): déviations par rapport aux normes, qui ont été découvertes avant la transfusion (discordance au niveau de l'identification du patient, des échantillons prélevés ou des PSL prescrits).  
Erreurs transfusionnelles: PSL transfusés par erreur, avec ou sans conséquence négative pour le patient (18).  
Par ailleurs, le suivi des receveurs à long terme doit être instauré avec création de dossiers transfusionnels.

Une réglementation précise est nécessaire pour illustrer la procédure de ces déclarations et organiser le circuit. La systématisation et l'homogénéisation des enquêtes transfusionnelles est indispensable à la cohérence de leurs analyses et à la pertinence des mesures préventives à mettre en place (19). Une formation continue sur l'hémovigilance doit être instaurée, uniformisée et généralisée. Elle doit être programmée de façon périodique dans plu-

sieurs régions du pays pour toucher un plus grand nombre de personnel impliqué dans la transfusion sanguine.

Une étude menée au Maroc a montré que les connaissances et les pratiques du personnel paramédical en matière de transfusion sanguine sont insuffisantes (20). Pour renforcer la formation théorique, des workshops et des ateliers pratiques relatifs à l'hémovigilance devraient être programmés.

Il existe de nouveaux outils comme la simulation et l'approche de réalisation d'exercices de mise en situation (21,22).

De plus, l'informatisation de tout le circuit de la transfusion avec mise en place d'un logiciel d'hémovigilance serait d'une aide considérable pour garantir la traçabilité des PSL dès la délivrance jusqu'à la transfusion. Le logiciel permettrait aussi de faciliter le partage des données ainsi que leur gestion et leur analyse.

Il serait également intéressant de participer aux bases de données internationales qui sont des instruments utiles pour les professionnels de la transfusion sanguine. Les différences qui sont constatées entre les pays pourront conduire à une consolidation et amélioration des systèmes déclaratifs et stimuler des projets de recherche. Ces projets, à leur tour, contribueront aux connaissances scientifiques et à l'amélioration progressive de la sécurité transfusionnelle dans tous les pays (23).

### **CONCLUSION**

Du fait de sa complexité, la transfusion sanguine est souvent sujette à des défaillances au niveau de ses différents maillons. A cet égard, elle est soumise à des textes réglementaires et des référentiels professionnels dont ceux relatifs à l'hémovigilance. L'évaluation du système d'hémovigilance, la révision des circulaires et la mise à niveau du système doivent être mis en œuvre.

L'information et la formation des professionnels restent des facteurs déterminants de la sécurité, face à l'erreur humaine qui est considérée comme étant à l'origine de la plupart des défaillances.

La formation continue sous forme de séminaires, d'ateliers et de cours est primordiale. De plus, pour faciliter l'échange d'information et garantir la traçabilité des PSL, l'informatisation est essentielle à chaque étape de la transfusion.

La coopération entre les différents intervenants garantit la consolidation de la chaîne transfusionnelle.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ben Romdhane N, Baccouche H, Mahjoub S, Khayati A. Sécurité transfusionnelle, état des lieux. *Tunis Med.* 2012 ;90: 357–361.
2. Peynaud-Debayle R, Trophilme C. Hémo-vigilance et sécurité transfusionnelle : incidents, accidents. Le congrès. 2013 :1-7.
3. ANSM, 16ème rapport national d'hémovigilance décembre 2019.
4. Swissmed, rapport d'hémovigilance 2018, Août 2019.
5. Circulaire 32/2015 du Ministère de la Santé Publique de Tunisie relative à la sécurité transfusionnelle.
6. Mahjoub S, Baccouche H, Raissi A, Ben Hamed L, Ben Romdhane N. Hémo-vigilance à Tunis (Hôpital La Rabta): Bilan 2007–2013. *Trans Clin Biol.* 2017; 24 :15-22.
7. Roxby D. Current concepts in pre-transfusion serological compatibility testing. *ISBT Science Series* 2011 ; 6: 265–269.
8. Milkins C, Berryman J, Cantwell C, Elliott C, Haggas R, Jones J and al. Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. *British Committee for Standards in Haematology. Transfus Med.* 2013; 23(1):3-35.
9. Souied F, Morin F. Règles de compatibilité et accidents immunologiques de la transfusion sanguine. *EMC Anesthésie réanimation.* 2010 ; 7 (4) : 1-13.
10. Boisen Michael L, Collins Ryan A, Yazer Mark H, Waters Jonathan H. Pretransfusion Testing and Transfusion of Uncrossmatched Erythrocytes. *Anesthesiology.* 2015; 122:191–195.
11. Trophilme C, Nguyen L. Suivi du patient transfusé. *Traité de Médecine Akos.* 2005; 1(1):1-8.
12. Berger P. Transfusions nocturnes de CGR sans urgence ou en urgence relative au CH de Châlons-en-Champagne : prescriptions tardives ? *Transfus Clin Biol.* 2018 ; P38 :341.
13. Sinha RTK, Rai P, Dey A. A study of transfusion related adverse events at a tertiary care center in Central India: A retrospective evaluation. *J Med Sci Health.* 2016;2(3):6-12.
14. Dasararaju R, Marques MB. Adverse effects of transfusion. *Cancer Control.* 2015; 22(1):16-25.
15. Savage William J. Transfusion Reactions. *Hematol Oncol Clin.* 2016: 619–634.
16. Osterman J, Arora S. Blood Product Transfusions and Reactions. *Emerg Med Clin N Am.* 2014; 32 :1159-1169.
17. Swissmed : Annonces d'effets indésirables de la transfusion (hémovigilance) <https://www.swissmedic.ch/swissmedic/fr/home/medicaments-a-usagehumain/surveillance-du-marche/haemovigilance.html>.
18. Hémo-vigilance ANSM [https://www.ansm.sante.fr/Declarer-un-effet-indesirable/Hemovigilance/L-hemovigilance-et-son-organisation/\(offset\)/0](https://www.ansm.sante.fr/Declarer-un-effet-indesirable/Hemovigilance/L-hemovigilance-et-son-organisation/(offset)/0).
19. Courbil R, Quaranta J. La gestion des effets indésirables et des incidents graves de la chaîne transfusionnelle en hématologie. *Hématologie* 2009 ; 15 (5): 378-87.
20. Lahlimi FZ, Tazi I, Sifsalam M, Bouchtia M, Mahmal L. Évaluation de la pratique transfusionnelle : Enquête au sein du personnel infirmier du centre d'oncologie-hématologie du CHU Mohammed VI de Marrakech, Maroc. *Transfus Clin Biol.* 2015; 22 (1): 12-16.
21. Péan D, Brisard L, Loutrel O, Lejus C. Nouveaux outils de formation en hémovigilance [New training tools in haemovigilance]. *Transfus Clin Biol.* 2012; 19(4-5):249-52. doi: 10.1016/j.tracli.2012.07.001. Epub 2012 Oct 4. PMID: 23039962.
22. Delavaud E, Martenot B, Colin B, Py J.Y, Dehaut, F. Réalisation d'exercices de mise en situation en cas d'évènement indésirable grave donneur sur les sites de prélèvement de l'EFS Centre Atlantique. *Transfus Clin Biol.* 2014, 21(4-5): 251-277.
23. Wiersum-Osselton J.C, Les bases de données internationales en hémovigilance. *Transfus Clin Biol;* 2010, 17 :306–309.

# Comparaison des numérations plaquettaires sur anticoagulants à base d'acide éthylène-diamine-tétra-acétique et de citrate trisodique au Burkina Faso

## Comparison of platelet counts performed on anticoagulants based on ethylene-diamine-tetra-acetic acid and trisodium citrate in Burkina Faso

Salam Sawadogo<sup>1,2\*</sup>,  
Tondia Nicole Irénée Sanon<sup>3</sup>,  
Koumpingnin Nebie<sup>1,2</sup>,  
Donatien Kima<sup>3</sup>,  
Tieba Millogo<sup>4</sup>,  
Myriam Nikiema/Minougou<sup>5</sup>,  
Aminata Minougou/Ouattara<sup>6</sup>,  
Césaire Dianda<sup>3</sup>,  
Eléonore Kafando<sup>1,3</sup>

1 Laboratoire d'hématologie,  
Université Joseph KI-ZERBO, 01  
BP 7021 Ouagadougou 01,  
Burkina Faso

2 Centre national de transfusion  
sanguine, 03 BP 7253 Ouagadougou  
03, Burkina Faso

3 Centre hospitalier universitaire  
pédiatrique Charles de Gaulles,  
Ouagadougou, Burkina Faso

4 Institut Africain de Santé Publique,  
12 BP 199 Ouagadougou,  
Burkina Faso

5 Centre hospitalier Universitaire  
Yalgado Ouedraogo, Ouagadougou,  
Burkina Faso

6 Centre hospitalier régional de  
Ziniaré, Burkina Faso

Reçu le 26 Décembre 2021 accepté le  
11 Mars 2022

Auteur Correspondant :  
Dr Salam Sawadogo

Adresse :  
Laboratoire d'hématologie, Université  
Joseph KI-ZERBO, 01 BP 7021  
Ouagadougou 01, Burkina Faso

Courriel:  
salemserein@hotmail.com

[http : //www.rtbc.org.tn](http://www.rtbc.org.tn)

### Résumé :

#### Introduction :

La numération des plaquettes sur sang total prélevé sur tube EDTA peut être entachée de fausses thrombopénies. Aussi, l'on a souvent recours aux anticoagulants à base de citrate de sodium. Toutefois, il existe très peu de données sur la fiabilité du compte des plaquettes sur ce type d'anticoagulant en Afrique Sub-Saharienne. Notre travail visait à comparer les numérations plaquettaires tubes EDTA et citraté au laboratoire d'hématologie du Centre hospitalier universitaire pédiatrique Charles de Gaulles (CHUP-CDG).

#### Matériel et Méthodes :

Il s'agissait d'une étude transversale conduite entre novembre et décembre 2020 qui a porté sur les hémogrammes de 124 patients réalisés au sein du laboratoire. Pour chaque patient, deux hémogrammes (Tube EDTA et tube citraté) ont été réalisés. Un facteur correctif de +10% a été appliqué à la numération sur tube citraté. Le pourcentage de la différence entre les deux numérations ainsi qu'une analyse du graphique des différences de Bland et Altman ont été utilisés pour évaluer la concordance entre les deux mesures.

#### Résultats :

Au total 124 paires d'échantillon ont été incluses. Une thrombopénie a été notée dans 16,1% des échantillons EDTA et 12,9% des échantillons sur tubes au citrate. Le nombre médian de plaquettes était de 335 Giga/L sur tube EDTA et 310 Giga/L sur tube citraté. Le pourcentage moyen de la différence entre les deux mesures était de 17,54%. Le biais constant moyen entre les deux mesures était de -19,6 Giga/L (IC 95% [-41,2 ; 1,99]). Ce biais n'était pas significatif et était inférieur au seuil d'acceptabilité clinique de  $\pm 20$  Giga/L fixé. Les limites de concordance supérieure et inférieure étaient respectivement de 218,5 et -257,7 Giga/L avec un taux de concordance entre les deux mesures de 93,5% et un coefficient de concordance (de Lin) de 0,63.

#### Conclusion :

Il existe une différence entre les mesures des plaquettes sur tubes EDTA et citratés en raison d'un effet de dilution et d'un effet matrice. Aussi, l'interprétation des résultats doit se faire en parallèle et la décision clinique fondée sur les caractéristiques cliniques du patient, dans une collaboration clinicien-biologiste.

**Mots-clés :** Numération des plaquettes, Pseudo-thrombopénie, EDT, Citrate trisodique, Effet matrice

### Abstract :

#### Introduction :

The platelet count performed on EDTA-tube may be affected by false thrombocytopenia. Also, anticoagulants containing citrate are sometimes used to bypass this issue. However, there is scarce data on the reliability of the platelet count on citrate anticoagulant sample in sub-Saharan Africa. Our work aimed at comparing platelet counts obtained from EDTA and citrate tubes at the hematology laboratory of the "Charles de Gaulles Pediatric University Hospital.

#### Material and methods:

This was a cross-sectional study conducted between November and December 2020 which included hemograms of 124 patients performed in the laboratory. For each patient, two hemograms (EDTA and citrate tubes) were performed. A corrective factor of +10% was applied to the count obtained on the citrate tube. The percentage difference between the citrated versus EDTA tube as well as a Bland and Altman difference plot analysis were used to assess the agreement between the two measures.

#### Results:

A total of 124 pairs of samples were included. Thrombocytopenia was noted in 16.1% of EDTA samples and 12.9% of citrate tubes. The median number of platelets was 335 Giga/L for EDTA tubes versus 310 Giga/L for citrate ones. The median percentage difference, between the two measurements, was 17.54%. Also, the mean constant bias between them was -19.6 Giga/L (95% CI [-41.2; 1.99]). This bias was not significant and was below the clinical acceptability threshold of  $\pm 20$  Giga/L. The upper and lower limits of agreement were 218.5 and -257.7 Giga/L, respectively, with a total agreement rate between the two measurements of 93.5% and a coefficient of agreement (Lin's) of 0.63.

#### Conclusion :

There is a difference between platelet counts performed on EDTA and citrate tube due to both dilution and matrix effects. Also, the interpretation of the results must be done in parallel and the clinical decision based on the clinical characteristics of the patient, in a collaboration between the clinician and the biologist.

**Keywords :** Blood platelet count, Pseudo-thrombocytopenia, EDTA, Trisodium citrate, Matrix effect

## INTRODUCTION

L'hémogramme est un examen biologique courant en pratique clinique qui permet une orientation diagnostique dans plusieurs situations pathologiques. Le nombre des plaquettes, est utilisé en première intention pour l'évaluation du risque hémorragique. Aussi, la fiabilité et l'exactitude des résultats de ce paramètre sont essentiels pour une prise en charge adaptée des patients. De nos jours, la numération des plaquettes est faite à l'aide d'automates d'hématologie cellulaire utilisant plusieurs techniques de mesure (impédance, diffraction laser, fluorescence optique, ...) (1). Les prélèvements sanguins utilisés sont réalisés sur des tubes contenant un anticoagulant à base d'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA) permettant une conservation optimale des morphologies cellulaires (2). Dans la majorité des cas, la quantification fournie est précise et exacte. Dans certaines circonstances, un décompte erroné par défaut ou par excès peut être constaté, du fait de limites techniques du compteur cellulaire utilisé ou de certaines interférences pré-analytiques (particularités de l'échantillon sanguin, pathologie du patient, altération du prélèvement, ...) (3). Les règles de bonnes pratiques en biologie hématologique recommandent que devant toute thrombopénie constatée sur les automates d'hématologie cellulaire, un frottis sanguin soit réalisé à la recherche d'agrégat ou de satellitisme plaquettaire (3, 4). En cas de recherche positive, la numération plaquettaire doit être refaite en changeant de type d'anticoagulant. La plupart du temps, on a recours au citrate de sodium ou à l'acide citrique, théophylline, adénosine, dipyridamole (CTAD) (5, 6) qui sont des anticoagulants liquides et exigent le respect d'un ratio de neuf volumes de sang pour un volume d'anticoagulant. Aussi, du fait de la dilution du sang, un facteur correctif de 1,1 est appliqué à la valeur de la numération plaquettaire ainsi obtenue (6). Toutefois, plusieurs réserves ont été émises quant à la fiabilité et à la stabilité des numérations de plaquettes sur ces anticoagulants de seconde intention. L'objectif de cette étude était de comparer les numérations plaquettaires obtenues sur échantillons sanguins prélevés sur anticoagulant de type EDTA (tube EDTA) et de type citrate trisodique (tube citraté) au laboratoire d'hématologie du Centre hospitalier universitaire pédiatrique Charles de Gaulles (CHUP-CDG).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Cadre, population et type d'étude

L'étude a été réalisée au CHUP-CDG de Ouagadougou, l'un des cinq hôpitaux de référence de troisième niveau pour les pathologies pédiatriques au Burkina Faso. Le laboratoire d'hématologie réalise des hémogrammes au profit des enfants de moins de 15 ans admis au sein de l'hôpital, mais aussi au profit de patients externes de

tous âges.

Il s'agissait d'une étude transversale conduite entre novembre et décembre 2020 qui a porté sur les hémogrammes des patients réalisés au sein du laboratoire. Pour chaque patient, deux hémogrammes ont été réalisés : l'hémogramme de routine sur tube EDTA et un hémogramme comparatif sur tube citraté.

Les patients des deux sexes âgés d'au moins cinq ans (pour des raisons pratiques pour le prélèvement veineux) ont été inclus.

### Variables de l'étude

Les paramètres étudiés étaient la numération des plaquettes sur tube EDTA (NumEDTA) et la numération plaquettaire sur tube citraté corrigée en augmentant la valeur obtenue avec l'automate de 10% pour tenir compte de l'effet de dilution (NumCit). Les anomalies plaquettaires (agrégats et satellitisme plaquettaires, plaquettes géantes) ont été recherchées au frottis sanguin sur les échantillons présentant une thrombopénie (nombre de plaquettes inférieur à 150 G/L).

### Taille de l'échantillon

Conformément aux recommandations du *Clinical and Laboratory Standards Institute* (7), un total de 124 patients ont été inclus dans l'étude.

### Prélèvements sanguins et analyses biologiques

Pour chaque patient, deux prélèvements sous vide ont été effectués à partir d'une veine périphérique en respectant l'ordre de remplissage des tubes, le prélèvement sur tube citraté avant celui à l'EDTA. Le ratio volume de sang / volume anticoagulant a également été respecté. Les analyses ont été réalisées dans les quatre heures au plus suivant le prélèvement à l'aide de l'automate Horiba ABX Pentra DX Nexus<sup>®</sup> (Horiba Instruments, Inc dba Horiba Medical). Pour tous les échantillons présentant une thrombopénie sur l'un ou l'autre des deux hémogrammes, deux frottis sanguins (à partir du tube EDTA et du tube citraté) ont été immédiatement réalisés et colorés à l'aide du kit RAL MCDh pour la recherche d'anomalies de plaquettes (satellitisme et/ou agrégats plaquettaires, plaquettes géantes).

Toutes les analyses ont été effectuées conformément aux règles de procédures du laboratoire du CHUP-CDG. L'analyseur a été calibré, entretenu et utilisé conformément aux instructions du fabricant. Les validations analytique et biologique ont été faites par des techniciens biomédicaux et des biologistes habilités.

### Analyses des données et critères de jugement

Les données ont été saisies sur Excel et importées sur STATA 17 pour les analyses statistiques. Les proportions et les médianes ont été utilisées pour la description de la distribution des variables qualitatives et quantitatives respectivement. Le test de khi<sup>2</sup> ou de Fischer exact le cas échéant, a été utilisé pour la comparaison des proportions. La distribution du nombre de plaquettes n'étant

pas normale, la comparaison des variables numériques a été réalisée à l'aide du test non paramétrique apparié des rangs signés de Wilcoxon (*Wilcoxon signed-rank test*).

Afin de comparer nos deux séries de mesures du nombre de plaquettes (NumCit et NumEDTA), nous avons utilisé le pourcentage de la différence entre la NumCit et la NumEDTA et une analyse du graphique des différences de Bland & Altman pour évaluer la corrélation et la concordance entre les deux mesures.

Le pourcentage de la différence entre la NumEDTA et la NumCit (DIFF) a été calculé à l'aide de la formule suivante:  $\frac{NumEDTA - NumCit}{(NumEDTA + NumCit) / 2} \times 100$ . La différence entre les deux mesures a été considérée significative si elle est supérieure au seuil de l'erreur analytique totale acceptable de  $\pm 25\%$  fixé par le *Clinical Laboratory Improvement Amendments* (15, 16)

La concordance entre les séries de mesures a été appréciée à l'aide du graphique des différences de Bland & Altman qui compare d'une part, la différence (NumCit – NumEDTA) entre les deux mesures (considérée comme étant normalement distribuée) à la moyenne de leur somme ) et d'autre part, apprécie la distribution de ces différences par rapport à des limites de concordance inférieure (LCI) et supérieure (LCS).

Nous avons fixé le seuil de biais cliniquement acceptable à  $\pm 20$  G/L en nous référant à la stratification du niveau de risque hémorragique en fonction du nombre de plaquettes; un seuil inférieur à 20 G/L est considéré comme un risque hémorragique élevé (10). Aussi, nous avons considéré qu'une différence supérieure à  $\pm 20$  G/L peut induire des implications cliniques dont une transfusion de concentrés de plaquettes par exemple. Le pour-

centage de concordance acceptable entre les mesures ou la proportion des valeurs des différences comprises entre LCS et LCI est fixé à au moins 95% (au moins 95% compris entre les LCS et LCI) (11, 12). Le coefficient de corrélation de concordance de Lin ( $r_{CCC}$ ) a été utilisé comme indicateur de la force de la concordance entre les mesures. La concordance était décrite comme inacceptable à médiocre si  $r_{CCC} \leq 0,7$  et satisfaisante à excellente si  $r_{CCC} > 0,7$  (12).

Pour tous les tests statistiques, le seuil de significativité de  $p < 0,05$  a été retenu.

**Considérations éthiques**

Le travail a été réalisé dans le cadre de la validation des méthodes au laboratoire avec l'aval de la Direction de l'hôpital. Les patients ou leurs parents ont donné leur consentement libre et éclairé pour l'étude et les prélèvements des échantillons sanguins. Leur anonymat et leur dignité ont été préservés. Les anomalies constatées chez les patients ont été portées à la connaissance de leurs médecins traitants à travers le rendu des résultats afin qu'ils en prennent compte pour la prise en charge de leurs patients.

**RÉSULTATS**

**Caractéristiques générales**

Nous avons inclus au total 124 paires d'échantillons provenant de 124 patients. Le sex-ratio (homme/femme) était de 0,7 et l'âge médian, 11 ans avec un espace interquartile (IQR) de 8-17 ans.

Une thrombopénie a été notée dans 16,1% des échantillons EDTA et 12,9% des échantillons sur tubes au citrate de sodium (Tableau 1).

**Tableau 1 : Caractéristiques de base des numérations des plaquettes sur tube EDTA et tube au citrate trisodique**

Paramètre	EDTA	Citrate sodique	p value
Nombre (n, %)	124 (100)	124 (100)	-
Minimum – Maximum (Giga/L)	23 – 600	5 – 588	-
Médiane ; IQR (Giga/L)	335 ; [184,5 – 462,5]	310 ; [203 - 414]	< 0,001 <sup>#</sup>
Anomalies plaquettaires			
Thrombopénie (n, %)	20 (16,1)	16 (12,9)	0,471*
Hyperplaquettose (n, %)	46 (37,1)	35 (28,2)	0,136*
Agrégats plaquettaires (n, %)	8 (6,4)	4 (3,2)	0,376*
Satellitisme plaquettaire (n, %)	0 (0)	0 (0)	-
Plaquettes géantes (n, %)	0 (0)	0 (0)	-

\*Khi2 ou Fischer exact test; <sup>#</sup> Wilcoxon signed-rank test

Dans 8,1% (10/124) des cas, il y avait une thrombopénie à la fois à la NumEDTA et NumCit et dans 6 cas (4,8%), on avait une thrombopénie à la NumCit qui n'avait pas été notée sur les prélèvements EDTA ( $\chi^2 = 29,2$  ;  $p < 0,001$ ). Le nombre médian de plaquettes était de 335 Giga/L ; IQR (184,5 ; 462,5) pour la NumEDTA et 310 Giga/L ; IQR (203 ; 414) pour la NumCit avec une différence significative ( $p < 0,001$ ) (Figure 1).

**Corrélation et concordance entre les deux mesures**

La NumCit était inférieure à la NumEDTA de 17,5% (IC 95% [7,0 ; 28,0]) en moyenne en dépit de la correction de +10% faite sur la valeur trouvée à l'automate. Le biais constant moyen entre les deux mesures sur le graphique des différences de Bland & Altman (Figure 2) était de -19,6 Giga/L (IC 95% [-41,2 ; 1,99]), soit une proportion de -6,3% (IC 95% [-13,9 ; 1,2]). Les limites

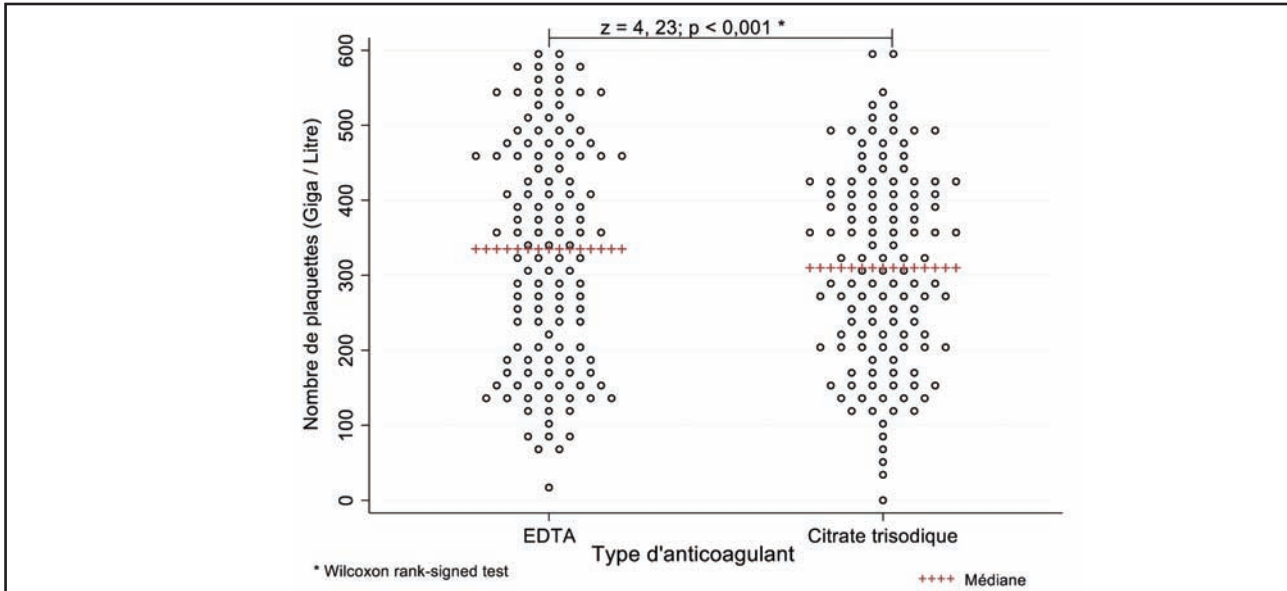


Figure 1 : Comparaison de la médiane des numérations des plaquettes selon le type d'anticoagulant dans le tube

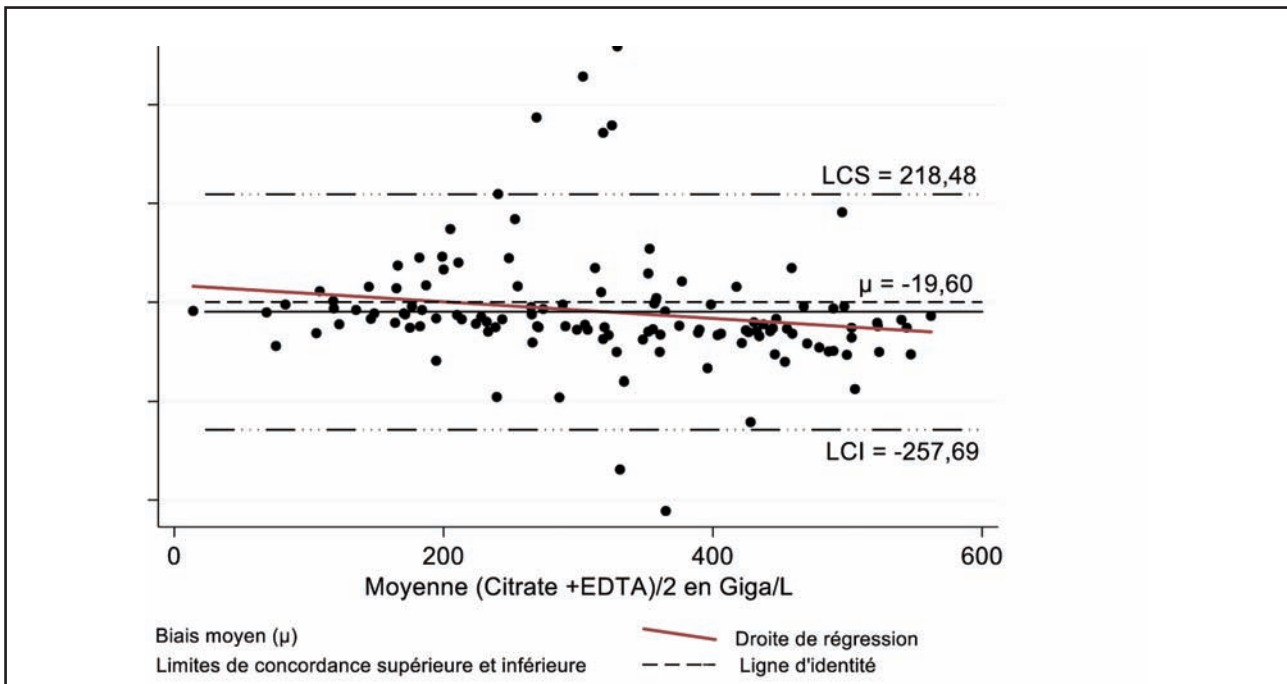


Figure 2 : Diagramme des différences (NumCit – NumEDTA) et des moyennes (NumCit-NumEDTA)/2 de Bland & Altman entre les numérations plaquettaires sur tube EDTA et sur tube citraté

de concordance supérieure et inférieure étaient respectivement de 218,5 Giga/L (IC 95% [181,1 ; 255,9]) et -257,7 Giga/L (IC 95% [-295,1 ; -220,3]). Au total, huit échantillons étaient hors de ces limites de concordance, soit un biais proportionnel de 6,5% (8/124). Le taux de concordance était donc de 93,5% (116/124). Le coefficient de concordance (de Lin) était de 0,63.

## DISCUSSION

Les thrombopénies sont les anomalies plaquettaires les plus fréquentes à l'hémogramme. Il est recommandé la recherche systématique de pseudo-thrombopénies en cas de thrombopénie et, au besoin, la vérification de la numération plaquettaire avec un autre anticoagulant (6, 13).

Dans notre étude la prévalence brute des thrombopénies était de 16,1% (20/124) sur les prélèvements EDTA. Dans la littérature, la prévalence des thrombopénies est très variable, allant de 8,3% à 67,6% (14–16). Un large spectre d'étiologies et de présentations cliniques posent souvent des défis diagnostiques en présence d'une thrombopénie (17,18). Les principales causes de thrombopénie sont infectieuse, obstétricale, hépatique, immunologique, tumorale ou iatrogène (héparine, quinine, chimiothérapie, ...); parfois, il peut s'agir de fausse thrombopénie (17). La démarche diagnostique nécessite dans tous les cas, la prise en compte de l'histoire clinique et des caractéristiques biologiques du patient. L'analyse des autres paramètres de l'hémogramme et du frottis sanguin ainsi que la reprise de la numération sur un prélèvement réalisé sur un autre anticoagulant sont des éléments essentiels de cette démarche (19).

Nous avons noté que la thrombopénie était présente à la fois sur anticoagulant de type citrate trisodique et EDTA, dans 10 cas (8,1%) indiquant que ce sont des vraies thrombopénies. Les 10 autres cas sur les 20 (soit 50%) où la thrombopénie n'a pas été confirmée sur tube citaté pouvant être considérés comme des cas de pseudo-thrombopénie. Cette proportion est supérieure aux estimations de l'ordre de 15% de l'ensemble des thrombopénies sur EDTA rapportées par certains auteurs (20). Des micro-agrégats plaquettaires ont été retrouvés dans 8 cas, soit 40% des cas de thrombopénie sur tubes EDTA. Ils persistaient sur les tubes citratés dans la moitié des cas (soit 4 cas). D'autres auteurs estiment la persistance des agrégats plaquettaires sur tubes citratés dans seulement environ 20% des cas (21). Nous ne pouvons pas trop épiloguer ni sur la proportion des pseudo-thrombopénies, ni sur celle des agrégats plaquettaires sur anticoagulant de type citrate au regard de la taille réduite de notre échantillon.

Les pseudo-thrombopénies ont plusieurs causes, allant des défaillances techniques pré-analytiques (amorçage de la coagulation lié à un défaut d'homogénéisation, de difficultés de ponction veineuse, d'excès de remplissage

du tube ou dilution de l'échantillon par le soluté de perfusion...) à des phénomènes artéfactuels dus à l'anticoagulant de type EDTA (satellitisme ou agrégats plaquettaires); c'est la pseudo-thrombopénie induite par l'EDTA. Elle est liée à l'exposition des sites antigéniques cryptiques du complexe des glycoprotéines IIb-IIIa due à l'action des auto-anticorps anti-plaquettes ou à des anticorps anti-phospholipides ou de complexes immuns. Cette interaction conduit à la formation de petits agglutinats de plaquettes (moins d'une dizaine de plaquettes) souvent non détectés, mais parfois aussi, de volumineux amas visibles à l'examen du frottis sanguin. La pseudo-thrombopénie à l'EDTA est décrite comme étant la plus fréquente cause de pseudo-thrombopénies, avec près de 90% des cas (22). Elle peut concerner autant les patients (entre 0,1 - 2% chez les patients hospitalisés) que les personnes saines (environ 0,2% des donneurs de sang) (20, 23).

Cette anomalie *in vitro* qui n'a, a priori pas de signification clinique particulière, est très souvent levée par la reprise de la numération plaquettaire à partir d'un prélèvement sur anticoagulant de type citrate. Le résultat rendu par l'automate est alors majoré de 10% (soit un facteur correctif empirique de 1,1) pour pallier à la dilution du sang (6). Toutefois, le citrate ne semble pas être la panacée. Plusieurs auteurs indexent, outre la persistance du risque de micro-agrégats et de satellitismes plaquettaires, une sous-estimation du nombre des plaquettes sur les NumCit malgré la prise en compte de la dilution liée à l'anticoagulant (6, 13, 24).

Dans notre travail, nous avons non seulement, noté la persistance des amas de plaquettes dans quatre cas, mais aussi une sous-estimation moyenne supplémentaire de la NumCit de 17,5% (en plus des 10% déjà pris en compte) par rapport à la NumEDTA. Guiheneuf *et al.*, (25), dans le cadre d'une démarche d'accréditation de leur laboratoire au Centre hospitalier universitaire d'Amiens-Picardie, ont noté une différence arithmétique de -26,6% entre la NumCit et la NumEDTA, soit un besoin d'appliquer un facteur correctif de 1,266 au lieu de 1,1 (soit un supplément de +16,6%) pour faire concorder les deux mesures. En 2017, Dumont *et al.*, au regard de l'inexactitude du facteur correctif de 1,1 jusque-là appliqué, ont entrepris de déterminer un facteur de commutabilité valide entre les NumCit et NumEDTA. Ils sont arrivés à un facteur de 1,17 (soit un supplément de +7%) (13).

Nous avons par ailleurs noté à l'analyse du graphique de Bland & Altman, la présence de biais proportionnel statistiquement significatif entre les deux mesures avec un coefficient de concordance de la corrélation médiocre ( $r_{ccc} = 0,63$ ). Le taux de concordance était de 93,5% pour un seuil acceptable de 95%. Le biais constant était non significatif, avec une différence moyenne de -19,6 G/L. Tout comme les précédents auteurs qui avaient

constatés des profils de corrélation et concordance similaires (biais constant non significatif avec un biais proportionnel significatif) (13, 25), nous pouvons conclure que la NumCit est statistiquement inférieure à la NumEDTA. Toutefois, cette sous-estimation semble être inférieure au seuil de biais cliniquement acceptable que nous avons fixé à 20 G/L sur la base du risque hémorragique et au seuil de l'erreur analytique totale acceptable de 25% fixé par le *Clinical Laboratory Improvement Amendments* (8, 9).

La discordance entre la NumCit et la NumEDTA ainsi que les divergences observées dans la proportion de la sous-estimation de la NumCit par rapport à la NumEDTA dans les différentes études peuvent s'expliquer par diverses raisons. Nous pouvons citer entre autres, les conditions pré-analytiques dans les différentes études, vu qu'elles ne sont automatisées. Il s'agit notamment de sur- ou sous-remplissage de certains tubes en raison des différences de pression sous vide des tubes, des difficultés de prélèvement, .... Toutefois, l'impact de telles disproportions est à nuancer dans la mesure où certains auteurs notent une absence d'effet dilutionnel proportionnel sur le nombre de globules blancs et globules rouges (25, 26). Une autre explication pourrait être certaines différences dans la composition de l'anticoagulant à base de citrate (citrate trisodique ou CTAD) (13, 25).

Aussi, l'effet de la dilution par l'anticoagulant liquide de type citrate n'explique pas à lui seul la divergence sur le nombre des plaquettes à la NumCit par rapport à la NumEDTA. Un effet matrice, dû à l'interférence de certains éléments de l'échantillon, autres que l'analyte d'intérêt, peut être évoqué (27, 28). Cet effet matrice, décrit pour la première fois dans les années 1990, induit un biais sur la valeur de la mesure d'un analyte entre deux sources de matrices distinctes (29). Il est échantillon-dépendant et est influencé par les caractéristiques biologiques du patient, les conditions de prélèvement de l'échantillon, ... Dans le cas de l'utilisation du citrate de sodium pour la numération plaquettaire, Dumont *et al.* expliquent cet effet matrice par l'ensemble des modifications en rapport avec la concentration protéique, le pH

et la force ionique du milieu et l'interférence que cela a à la fois sur le démasquage des sites antigéniques cryptiques IIB / IIIa et les interactions des immunoglobulines avec les récepteurs plaquettaires (13).

Le recours à un anticoagulant à base de citrate en cas de suspicion de pseudo-thrombopénies est une pratique courante au Burkina Faso. Toutefois, aucune évaluation n'avait été faite jusqu'à la présente étude qui comporte quelques limites. En effet, il aurait été plus indiqué de disposer de prélèvements sur d'autres types d'anticoagulants (sel de magnésium, acide citrique, théophylline, adénosine, dipyridamole) (6, 30) afin de mieux apprécier l'effet matrice que nous avons évoqué pour expliquer les différences de nombre de plaquettes observées. Par ailleurs, nos conclusions auraient été encore plus pertinentes, si nous avions comparé les numérations de plaquettes sur tubes EDTA et citratés avec celles obtenues à partir d'une méthode de référence comme la méthode par fluorescence optique ou la méthode immunologique (31, 32).

## CONCLUSION

La numération plaquettaire sur tube au citrate reste entachée d'un biais qui entraîne une sous-estimation du nombre de plaquettes par rapport à l'EDTA, malgré l'application du facteur correctif de 1,10 pour tenir compte de l'effet de dilution. La numération des plaquettes sur tube au citrate ne devrait donc pas être recommandée en routine. Son utilisation doit être précédée par une validation de méthode qui prend en compte, outre la comparabilité des méthodes, la fidélité, la justesse / exactitude des analyses. Dans tous les cas, la numération des plaquettes sur tube citraté doit être interprétée en parallèle avec celle sur tube EDTA ainsi qu'avec les résultats du frottis sanguin. Le résultat de la NumCit sera pris en compte en cas d'objectivation d'agrégats plaquettaires sur le tube EDTA, tout en attirant l'attention du clinicien sur le fait que le compte est sous-estimé dans le rendu des résultats. En fonction du contexte clinique du patient, il pourra juger de la pertinence ou non de cette observation biologique et entreprendre la conduite à tenir la plus appropriée.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Imbert M, Jouault H. Hémogramme : réalisation par un automate. EMC - Biologie Médicale 2006; 1(3):1-10.
2. Antwi-Baffour S. Prolong Storage of Blood in EDTA Has an Effect on the morphology and osmotic fragility of erythrocytes. International Journal of Biomedical Science and Engineering 2013; 1(2):20-23.
3. Tessier-Marteau A, Geneviève F, Godon A, Macchi L, Zandecki M. Anomalies et erreurs de détermination de l'hémogramme avec les automates d'hématologie cellulaire. Ann Biol Clin (Paris) 2010; 68(4):393-407.
4. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: platelets. Clin Lab Haematol 2007;29(1):4-20.
5. MediLab Group. Conditions préanalytiques en hématologie. MediLab - Info 2013;(3):1-3.
6. Védy S, Boom B, Perez P, Schillinger S, Ragot C, Bakkouch S, *et al.* Automatic platelets numbering with citrate as anticoagulant: is the result valid? Ann Biol Clin (Paris) 2011;69(4):453-458.

7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples: approved guideline. CLSI document EP09-A3, 3rd Ed. Wayne, PA: CLSI;2013. p. 1-15.
8. Westgard J. Consolidated comparison of hematology performance specifications [Internet]. WESTGARD QC. 2018 [cité 14 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.westgard.com/hematology-goals.htm>.
9. Nabity MB, Harr KE, Camus MS, Flatland B, Vap LM. ASVCP guidelines: Allowable total error hematology. *Vet Clin Pathol* 2018;47(1):9-21.
10. Podda GM, Pugliano M, Casazza G, Soru P, Scavone M, Vismara G, *et al.* Measurement of platelet count with different anticoagulants in thrombocytopenic patients and healthy subjects: accuracy and stability over time. *Haematologica* 2019;104(12):e570-e572.
11. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Int J Nurs Stud* 2010;47:931-938.
12. Desquilbet L. Guide pratique de validation statistique de méthodes de mesure: répétabilité, reproductibilité, et concordance. *HAL Archives* 2012;v3:1-48.
13. Dumont P, Goussot V, David A, Lizard S, Riedinger J-M. Identification and validation of a factor of commutability between platelet counts performed on EDTA and citrate. *Ann Biol Clin (Paris)* 2017; 75(1):61-66.
14. Vaughan JL, Fourie J, Naidoo S, Subramony N, Wiggill T, Alli N. Prevalence and causes of thrombocytopenia in an academic state-sector laboratory in Soweto, Johannesburg, South Africa. *S Afr Med J*. 2015;105(3): 215-219.
15. Jali AG, Nkambule BB. Prevalence and aetiology of moderate and severe thrombocytopenia in a tertiary and quaternary centre in KwaZulu-Natal. *Afr J Lab Med* 2020;9(1):1-5
16. Hui P, Cook DJ, Lim W, Fraser GA, Arnold DM. The frequency and clinical significance of thrombocytopenia complicating critical illness: a systematic review. *Chest*. 2011;139(2):271-278.
17. Ali N, Auerbach HE. New-onset acute thrombocytopenia in hospitalized patients: pathophysiology and diagnostic approach. *J Community Hosp Intern Med Perspect*. 2017;7(3):157-167.
18. McCrae KR. Thrombocytopenia in pregnancy (chapter 44). In: Michelson AD, éditeur. *Platelets*. 3<sup>e</sup> éd. London: Academic Press; 2013. p. 909-928.
19. Smock KJ, Perkins SL. Thrombocytopenia: an update. *Int J Laborat Hematol*. 2014;36(3):269-78.
20. Lewinski UH, Cycowitz Z, Cohen AM, Gardyn J, Mittelman M. The incidence of pseudothrombocytopenia in automatic blood analyzers. *Haematologia* 2000;30(2):117-21.
21. Berkman N, Michaeli Y, Or R, Eldor A. Edta-dependent pseudothrombocytopenia: A clinical study of 18 patients and a review of the literature. *Am J Hematol* 1991;36(3):195-201.
22. Silvestri F, Virgolini L, Savignano C, Zaja F, Velisig M, Baccarani M. Incidence and diagnosis of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia in a consecutive outpatient population referred for isolated thrombocytopenia. *Vox Sang* 1995;68(1):35-39.
23. Tomicic M, Vuk T, Gulan-Harcet J. Anticoagulant-induced pseudothrombocytopenia in blood donors: Letter to the Editor. *Transfus Med* 2015;25(1):47-48.
24. Baccini V, Geneviève F, Jacqmin H, Chatelain B, Girard S, Wuilleme S, *et al.* Platelet counting: ugly traps and good advice. Proposals from the French-Speaking Cellular Hematology Group (GFHC). *J Clin Med* 2020;9(3):1-27.
25. Guiheneuf E, Duhin M, Bouju T, Harrivel V. Comparaison de la numération plaquettaire sur tube citrate de Na 9NC par rapport au tube EDTA K2 dans l'optique de l'accréditation Iso15189. Poster présenté au: 35<sup>ème</sup> Congrès de la Société française d'hématologie; 1-3 Avril 2015; Paris, France.
26. Stokol T, Erb HN. A comparison of platelet parameters in EDTA- and citrate-anticoagulated blood in dogs. *Vet Clin Pathol* 2007;36(2):148-154.
27. Hughes NC, Bajaj N, Fan J, Wong EY. Assessing the matrix effects of hemolyzed samples in bioanalysis. *Bioanalysis* 2009;1(6):1057-1066.
28. Yavuz HB, Yaman H, Tat M, Akidan O, Orem A, Karahan SC *et al.* A practical solution of matrix interference effect with saline replacement in samples of chemotherapy received patients whose differential count of leukocyte cannot be measured. *Int J Med Biochem* 2021;4(3):161-165.
29. Doucet J. Développement de méthodes innovantes pour la réduction de l'effet matrice dans les dosages immuno-enzymatiques. Applications pour la quantification des anticorps thérapeutiques monoclonaux et de biomarqueurs au cours des études cliniques et précliniques [Thèse Doctorat]. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon; 2010. p127.
30. Choccalingam C, Kanna Nandagopal Radha R, Snigdha N. Estimation of platelet counts and other hematological parameters in pseudothrombocytopenia using alternative anticoagulant: magnesium sulfate. *Clin Med Insights Blood Disord* 2017;10:1-6.
31. Bao Y, Wang J, Wang A, Bian J, Jin Y. Correction of spurious low platelet counts by optical fluorescence platelet counting of BC-6800 hematology analyzer in EDTA-dependent pseudo thrombocytopenia patients. *Transl Cancer Res TCR* 2020;9(1):166-172.
32. Harrison P, Ault KA, Chapman S, Charie L, Davis B, Fujimoto K, *et al.* An interlaboratory study of a candidate reference method for platelet counting. *Am J Clin Pathol* 2001;115(3):448-459.



## ARTICLE ORIGINAL

# Evaluation de la microscopie à fluorescence à lampe LED dans le diagnostic de la tuberculose

## Evaluation of LED fluorescence microscopy in the diagnosis of tuberculosis

Salma Maalej<sup>1</sup>,  
Amal Chakroun<sup>1</sup>,  
Salma Smaoui<sup>1,2</sup>,  
Salma Hachicha<sup>1,2</sup>,  
Nesrine Ben Said<sup>1</sup>,  
Asma Ghorbel<sup>1,2</sup>,  
Férièle Messadi-Akrout<sup>1,2</sup>

1 Faculté de Pharmacie de  
Monastir, Université de Monastir,  
Tunisie

2 Laboratoire régional d'hygiène,  
Sfax, Tunisie

Reçu le 17 Janvier 2022  
accepté le 4 Avril 2022

Auteur correspondant :  
Dr Salma Maalej

Adresse :  
Route Tunis km6 - SakietEzzit Sfax

Courriel :  
maalejsalma91@yahoo.fr

### Résumé

#### Introduction :

La tuberculose (TB) restel'une des pathologies les plus courantes dans le monde. Pendant longtemps, la coloration de Ziehl-Neelsen (ZN) a été la technique de référence pour l'examen direct mais actuellement l'auramine(AUR) tend à la remplacer. Notre étude avait comme objectif d'évaluer l'apport de la coloration à l'AUR par rapport à la coloration de ZN dans le diagnostic de la TB.

#### Patients et méthodes :

Il s'agit d'une étude rétrospective sur une période allant du 1<sup>er</sup> juillet 2013 au 31 juillet 2016, qui a inclus tous les prélèvements d'origine pulmonaire et extra-pulmonaire ayant bénéficié de la coloration de ZN et celle à l'AUR (n=4583).

#### Résultats :

Un total de 38892 prélèvements d'origine pulmonaire et extra-pulmonaire a été examiné dont 4583 frottis ont été examinés à l'AUR soit un taux de 11,8%. La comparaison de l'AUR par rapport à ZN a montré un taux de concordance de 97,7%. Par rapport à la coloration de référence ZN, l'AUR était significativement plus sensible pour les crachats et les prélèvements ganglionnaires ( $p<0,05$ ). La sensibilité de l'AUR augmente surtout pour les formes pauci-bacillaires (PB). En considérant la culture comme technique de référence, nos résultats montrent que le microscope à fluorescence est significativement plus sensible que la microscopie optique ZN (49,5% *versus* 41,5%), alors que la spécificité et la VPN des deux méthodes sont comparables. En considérant la PCR comme méthode de référence, notre étude montre un gain non significatif en sensibilité de l'AUR par rapport à ZN de 8% (44% *versus* 36%). La spécificité est bonne avec un taux de 98,9% pour les deux colorations.

#### Conclusion :

La généralisation de la méthode de coloration par l'AUR dans notre laboratoire permettrait d'améliorer les performances diagnostiques ce qui aurait un impact positif sur la prise en charge des patients.

**Mots-clés :** Tuberculose, Auramine, Ziehl-Neelsen

### Abstract

#### Introduction :

Tuberculosis (TB) remains one of the most common pathologies in the world. For a long time, Ziehl-Neelsen (ZN) staining was the reference technique for direct examination, but currently auramine (AUR) tends to replace it. Our study aimed to evaluate the contribution of AUR staining compared to ZN staining in the diagnosis of TB.

#### Patients and methods :

This is a retrospective study over a period from July 1<sup>st</sup>, 2013 to July 31<sup>st</sup>, 2016, which included all the samples of pulmonary and extra-pulmonary origin having benefited from ZN staining and that at the AUR (n=4583).

#### Results :

A total of 38892 samples of pulmonary and extra-pulmonary origin were examined, of which 4583 smears were examined with the AUR, i.e. a rate of 11.8%. The comparison of AUR *versus* ZN showed a concordance rate of 97.7%. Compared to the ZN reference stain, AUR was significantly more sensitive for sputum and lymph node samples ( $p<0.05$ ). The sensitivity of the AUR increases especially for the pauci-bacillary forms. Considering culture as the reference technique, our results show that the fluorescence microscope is significantly more sensitive than ZN optical microscopy (49.5% *versus* 41.5%), while the specificity and the VPN of the two methods are comparable. Considering PCR as the reference method, our study shows a non-significant gain in sensitivity of AUR compared to ZN of 8% (44% *versus* 36%). The specificity is good with a rate of 98.9% for both stains.

#### Conclusion :

The generalization of the AUR staining method in our laboratory would improve diagnostic performance which would have a positive impact on patient care.

**Keywords :** Tuberculosis, Auramine staining, Ziehl-Neelsen

**INTRODUCTION**

La tuberculose (TB) reste l’une des pathologies les plus courantes dans le monde entier. Malgré les progrès médicaux qui ont contribué à l’amélioration de la situation épidémiologique de la TB, son incidence reste élevée vu les mauvaises conditions socio-économiques dans certains pays (1). Le diagnostic de la TB repose dans un premier temps sur l’examen direct (ED). En effet, ce dernier permet de fournir des résultats rapides en moins d’un jour (2). Pendant longtemps, la coloration de Ziehl-Neelsen (ZN) a été la technique de référence grâce à la rapidité de diagnostic, sa spécificité élevée et son faible coût (3). Cette technique est de moins en moins utilisée et tend à être remplacée par d’autres colorations afin d’améliorer la sensibilité et de réduire le temps de lecture des frottis (4). La coloration à l’auramine (AUR) a bénéficié de progrès technologiques en faisant recourir à un microscope à fluorescence avec des lampes à diodes électroluminescentes (LED) comme alternative à la lampe classique à vapeur de mercure (5). Dans ce contexte, nous avons mené cette étude dont l’objectif était d’évaluer l’apport de la coloration à l’AUR par rapport à la coloration de ZN dans le diagnostic de la TB.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES**

**Prélèvements**

Il s’agit d’une étude rétrospective réalisée au laboratoire régional d’hygiène de Sfax sur une période de 3 ans allant du 1<sup>er</sup> juillet 2013 au 31 juillet 2016. L’étude a inclus tous les prélèvements d’origine pulmonaire et extra-pulmonaire ayant bénéficié de la coloration de ZN et celle à l’AUR (n=4583). Les prélèvements reçus provenaient de patients suivis dans les services cliniques

des centres hospitaliers universitaires (CHU) de Sfax (Hédi Chaker et Habib Bourguiba), des autres CHU (Sousse et Mahdia), des hôpitaux régionaux (Tataouine, Médenine, Gabes et Sidi Bouzid) et de médecins de libre pratique.

**Traitement des prélèvements**

Tous les prélèvements d’origine pulmonaire (autres que les crachats) et extra-pulmonaire ont bénéficié d’une coloration ZN et d’une coloration à l’AUR (Double coloration). Seuls les crachats provenant de services cliniques dans lesquels l’incidence de la TB est élevée (service de pneumologie ou service de maladies infectieuses) ou provenant de CHU ou hôpitaux régionaux hors gouvernorat de Sfax (Tataouine, Médenine, Gabès, Sidi Bouzid, Sousse et Mahdia) ont eu une double coloration. Les prélèvements d’origine extra-pulmonaire comprenaient les liquides de ponctions (liquide pleural, liquide d’ascite, liquide céphalo-rachidien (LCR), liquide articulaire, liquide péricardique, liquide péritonéal, moelle osseuse et liquide amniotique), les tissus (ponction ou biopsie ganglionnaire, biopsie disco-vertébrale, biopsie vésicale...), l’urine et le sang.

Lors de la réception, l’aspect macroscopique de ces prélèvements a été noté (clair, purulent, muco-purulent, hématique). Pour chaque échantillon, deux frottis ont été confectionnés sous un poste de sécurité microbiologique. Tous les prélèvements tissulaires (biopsies ou ponctions) ont bénéficié d’un broyage dans un mortier stérile en respectant les conditions rigoureuses d’asepsie. La lecture a été faite selon l’échelle de Ridley pour la coloration de ZN. La lecture des frottis colorés à l’AUR était semi-quantitative et exprimée en nombre de croix. Les codes de lecture des deux colorations sont présentés dans le Tableau 1.

**Tableau 1 : Code de lecture des frottis colorés par la méthode de Ziehl-Neelsen (Echelle de Ridley) et ceux colorés par la méthode à l’Auramine**

Nombre de BAAR ZN	MF AUR (*25)	MF AUR (*40)	Résultat
Pas de BAAR pour 100 champs	Pas de BAAR dans la lame	Pas de BAAR dans la lame	Négative
1 à 9 BAAR pour 100 champs	1 à 29 BAAAR par lame	1 à 19 BAAR par lame	Nombre exact De BAAR
10 à 99 BAAR pour 100 champs	30 à 299 BAAR par lame	20 à 199 BAAR par lame	+
1 à 10 BAAR par champ	10 à 100 BAAR par champ	5 à 50 BAAR par champ	++
Plus de 10 BAAR par champ	Plus de 100 BAAR par champ	Plus de 50 BAAR par champ	+++

BAAR: bacille acido-alcoololo-résistant; MF: microscope à fluorescence; ZN : Ziehl-Neelson ; AUR: auramine.

Pour les échantillons d'origine pulmonaire, après décontamination selon la méthode de Pétroff, le culot a été ensemencé sur deux tubes Lowenstein Jensen (LJ). Quant aux prélèvements d'origine extra-pulmonaire, avant la décontamination, 200 µl de l'échantillon ont été ensemencés sur deux tubes LJ et un tube Coletsos. Après la décontamination par le kit Myco-prep<sup>®</sup>, le culot de centrifugation a été ensemencé sur deux tubes LJ, un tube Coletsos et un tube MGIT 960. La lecture a été faite quotidiennement durant la première semaine afin d'éliminer les cultures contaminées puis de façon hebdomadaire pendant 2 mois pour les prélèvements pulmonaires et 3 mois pour les prélèvements extra-pulmonaires. Le milieu liquide MGIT 960 a été incubé à 37°C dans l'automate BACTEC MGIT pendant 42 jours. La lecture a été automatique et se faisait toutes les heures par comparaison à un calibrateur.

Une *Polymerase Chain Reaction* (PCR) GeneXpert<sup>®</sup> MTB/RIF a été faite devant toute suspicion clinique d'une TB ou d'une résistance aux antituberculeux et les résultats ont été exploités dans cette étude.

#### Acquisition et analyses des données

La base de données a été élaborée en utilisant le logiciel Excel dans sa version 2007. La génération des paramètres statistiques a été réalisée moyennant le logiciel Epi Info<sup>™</sup> version 7. Pour l'analyse statistique, le test Mac Nemar a été utilisé. Il consiste en un test Khi-deux ( $\chi^2$ ) pour échantillons appariés. Les paramètres statistiques (sensibilité, spécificité, VPN et VPP) ont été calculés par rapport à une méthode de référence (la culture puis la PCR). Une valeur prédéterminée de  $p < 0,05$  a été considérée statistiquement significative pour l'ensemble de ces tests.

## RÉSULTATS

### 1. Présentation des échantillons

#### Répartition des prélèvements selon la nature

Durant la période d'étude, un total de 4583 prélèvements pulmonaires et extra-pulmonaires a été examiné par la méthode de ZN et l'AUR. Les prélèvements pulmonaires étaient majoritaires ( $n=2802$  ; 61,1%) et prédominaient par les prélèvements sous forme de crachat (43,9%).

#### Répartition des prélèvements par année

Durant la période d'étude, un total de 38892 prélèvements d'origine pulmonaire et extra-pulmonaire a été examiné au sein du laboratoire régional d'hygiène de Sfax. Seulement 4583 frottis ont été examinés à l'AUR soit un taux de 11,8%.

Le nombre d'échantillons ayant bénéficié d'une coloration à l'AUR a été multiplié par 4 au fur et à mesure des années passant de 6,3% (366/5826) durant le deuxième semestre de 2013 à 26,9% (2274/8440) durant les 7 premiers mois de l'année 2016.

### 2. Comparaison de la coloration à l'auramine par rapport à la coloration de Ziehl-Neelsen

Parmi 4583 échantillons ayant bénéficié d'une double coloration, 301 prélèvements se sont révélés positifs à l'examen direct par la coloration à l'AUR soit 6,6% et 228 échantillons étaient positifs par la coloration de ZN soit 5%. La comparaison des deux techniques de coloration a montré un taux de concordance de 97,7% ( $n=4478$  cas).

### 3. Comparaison des deux colorations selon la nature du prélèvement

La coloration à l'AUR a permis un gain de sensibilité par rapport à ZN de 1,1% pour les prélèvements d'origine pulmonaire et de 1% pour les prélèvements d'origine extra-pulmonaire. Le gain en taux de positivité était statistiquement significatif aussi bien pour les prélèvements d'origine pulmonaire et extra-pulmonaire ( $p < 0,00001$ ). Il était particulièrement significatif pour les crachats ( $p < 0,0001$ ) et les prélèvements ganglionnaires ( $p=0,003$ ). Le taux de positivité était plus élevé par la coloration à l'AUR pour tous les échantillons d'origine pulmonaire à l'exception du LBA ainsi que certains prélèvements d'origine extra-pulmonaire (liquide pleural, échantillons ganglionnaires, abcès). Seulement un prélèvement d'abcès de psoas ( $n=1$ ) était positif avec la coloration de ZN mais négatif avec celle à l'AUR. Les deux méthodes ont montré le même taux de positivité pour le reste des échantillons (Tableau 2).

### 4. Comparaison des deux colorations selon la charge bacillaire

La coloration à l'AUR s'est avérée plus sensible que celle de ZN pour la détection de cas paucibacillaire (PB) et multi-bacillaire (MB). Le taux de frottis positifs à l'AUR était 1,2 fois plus élevé que celui trouvé avec ZN pour les prélèvements PB (4,1% versus 3,4%) alors qu'il était presque le double ( $\times 1,9$ ) pour les cas MB (2,5% versus 1,3%). Parmi les prélèvements positifs par les deux méthodes, 151 étaient concordants dans la charge bacillaire soit 71,2% des cas. Une discordance a été notée pour 61 échantillons soit 28,8% des cas (Tableau 3). L'écart observé entre l'AUR et ZN était surtout élevé pour les formes PB présentant une très faible charge bacillaire (nombre exact de BAAR) (97 versus 27 soit un rapport de 3,5). Cet écart est moins élevé pour les prélèvements présentant un nombre de croix  $\geq 1$  (204 versus 201 soit un rapport de 1,01) (Tableau 4).

### 5. Evaluation de Ziehl-Neelsen et de l'auramine par rapport à la culture

Trente et un échantillons ont été exclus de notre étude à cause de la contamination de la culture sur tous les milieux utilisés. La culture a été positive dans 399 échantillons soit un taux de positivité de 8,8%. Ce taux est significativement supérieur à celui de l'ED ( $p < 0,0001$ ). Parmi les 399 échantillons positifs à la cul-

**Tableau 2 : Comparaison de la coloration à l'Auramine par rapport à celle de Ziehl-Neelsen selon la nature de prélèvement**

	Nature du prélèvement (P)	Nombre total	Nombre de P AUR : pos ZN :	Nombre de P AUR : neg ZN: neg : pos	Nombre de P AUR : pos ZN : neg (%)	Nombre de P ZN : pos AUR ; neg	P	
<b>Prélèvements d'origine pulmonaire</b>	<b>Crachats</b>	2010	170 (8,5)	1773 (8,6)	58 (2,9)	9 (0,4)	<b>&lt;0,0001</b>	
	<b>Liquide bronchique</b>	675	16 (2,4)	655 (97)	3 (0,4)	1	0,3	
	<b>Tubage gastrique</b>	62	0	58 (93,5)	4 (6,4)	0	0,0625	
	<b>LBA</b>	38	1 (2,6)	37 (97,7)	0	0	0,3	
	<b>PTD</b>	17	0	16 (94,1)	1 (5,9)	0	0,479	
	<b>Total</b>		<b>2802</b>	<b>187 (6,7)</b>	<b>2539 (90,6)</b>	<b>66 (2,4)</b>	<b>10 (0,3)</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Prélèvements d'origine extra-pulmonaire</b>	<b>Liquides de ponctions<sup>a</sup></b>		1157	10 (0,8)	1139 (98,4)	6 (0,5)	2 (0,17)	-
	<b>P. ganglionnaire</b>	<b>Ponction</b>	230	8 (3,5)	213 (92,6)	7 (3)	2 (0,9)	0,0898
		<b>Biopsie</b>	145	5 (3,5)	131 (90,3)	8 (5,5)	1 (0,7)	0,015
		<b>Total</b>	375	12	344	15	3	0,003
	<b>Tissus<sup>b</sup></b>		70	1 (1,4)	69 (98,6)	0	0	0,317
	<b>Abcès</b>		52	1 (1,9)	49 (94,2)	2 (3,8)	0	0,25
	<b>Os</b>	<b>Ponction</b>	38	0	38 (100)	0	0	0,317
		<b>Abcès de psoas</b>	14	0	13 (92,9)	0	1 (7,1)	-
	<b>Urine</b>		31	0	31 (100)	0	0	-
	<b>Moelle osseuse</b>		25	0	25 (100)	0	0	-
	<b>Autres<sup>c</sup></b>		19	0	19 (100)	0	0	-
	<b>Total</b>		<b>1781</b>	<b>25 (1,4)</b>	<b>1727 (97)</b>	<b>23 (1,3)</b>	<b>6 (0,3)</b>	<b>0,001</b>
	<b>Total</b>		<b>4583</b>	<b>212 (4,6)</b>	<b>4266</b>	<b>89 (1,94)</b>	<b>16 (0,3)</b>	<b>&lt;0,0001</b>

P : prélèvement, Neg: négative, Pos: positifs, AUR: auramine, ZN: Ziehl-Neelsen, LBA: Lavage broncho-alvéolaire, PTD: prélèvement trachéo-distal, LCR: Liquide Céphalo-rachidien.

<sup>a</sup> Liquides de ponctions incluent liquide pleural (n=421), LCR (n=343), liquide d'ascite (n=132), pus (131), liquide articulaire (n=93), liquide péricardique (n=34) et liquide péritonéal (n=3).

<sup>b</sup> Tissus: incluent les biopsies et les ponctions des tissus autres que ganglionnaires

<sup>c</sup> Autres: incluent le liquide amniotique, le sang, la sécrétion mammaire, le prélèvement vaginal et le sperme.

ture, 155 frottis étaient positifs par les deux méthodes de coloration et 44 frottis étaient positifs à l'AUR seulement soit quatre fois le nombre de positifs avec ZN (n= 10) (Tableau 5).  
L'évaluation globale de la coloration à l'AUR et celle de ZN par rapport à la culture a montré une concordance

égale à 93,5%. Un gain de sensibilité de 8 % a été noté pour la coloration à l'AUR (49,5% *versus* et 41,4%). La coloration à l'AUR s'est révélée significativement plus sensible que ZN par rapport à la culture (p<0,001) (Figure1).

**Tableau 3:** Comparaison des deux colorations selon la charge bacillaire

ZN	AUR	NEG(%)	PB(%)	MB(%)	Total (%)	p
NEG(%)		4266(93)	76(1,6)	13(2,8)	4365(95,3)	0.0015
PB(%)		14(0,3)	97(2,1)	46(1)	157(3,4)	
MB(%)		2(0,04)	15(0,03)	54(1,1)	61(1,3)	
<b>Total (%)</b>		4282(93,4)	188(4,1)	113(2,5)	4583(100)	

NEG : négatif, BAAR : bacilles acido-alcoolo-résistants, MB : multi-bacillaire, PB : pauci-bacillaire, AUR : auramine, ZN : Ziehl-Neelson

**Tableau 4:** Comparaison de Ziehl-Neelson et de l'auramine selon le nombre de croix

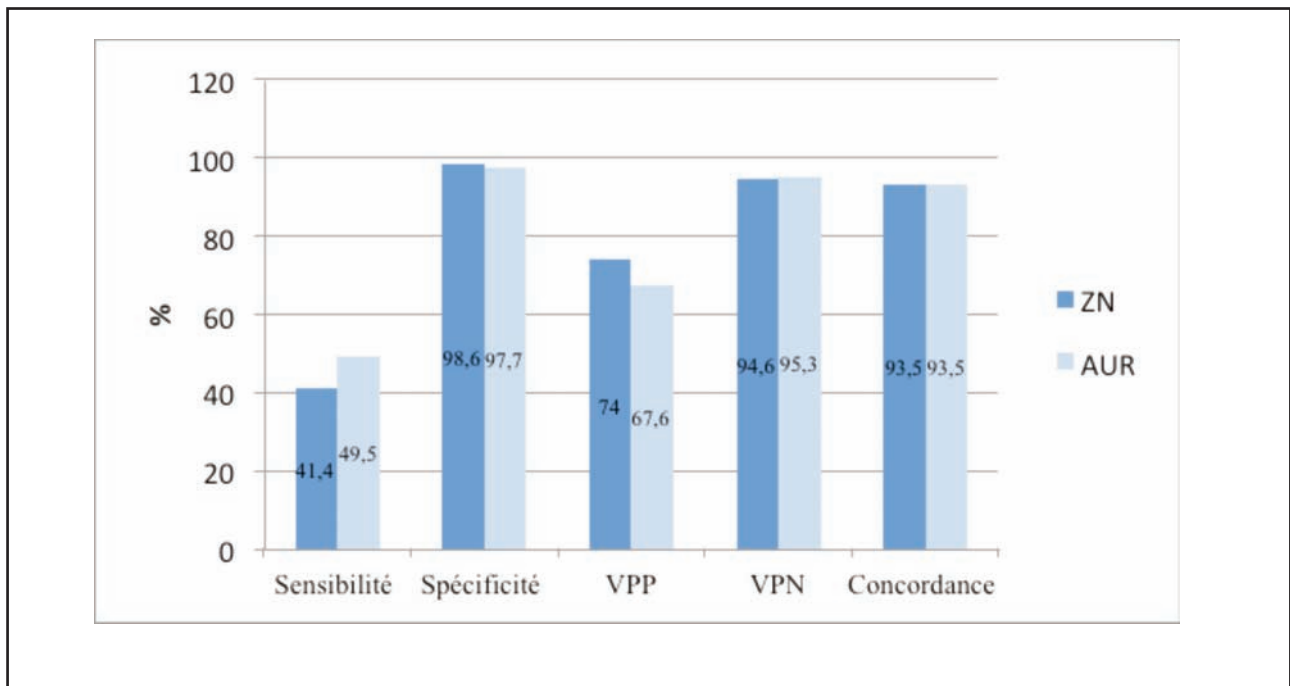
ZN	AUR	NEG	Nombre exact de BAAR	+	++	+++	Total
NEG		4266	57	19	10	3	4355
Nombre exact de BAAR		8	11	7	1	0	27
+		26	28	51	30	15	130
++		1	1	11	21	15	49
+++		1	0	3	5	13	22
<b>Total</b>		4282	97	91	67	46	4583

NEG : négatif, BAAR : bacilles acido-alcoolo-résistants, AUR : auramine, ZN : Ziehl-Neelson

**Tableau 5:** Comparaison des deux méthodes de coloration par rapport à la culture

	N de P AUR : neg ZN : neg %	N de P AUR : pos ZN : pos %	N de P AUR : pos ZN : neg %	N de P ZN : pos AUR : neg <%	N total de P	P
<b>Culture+</b>	190 (47,6)	155(38,8)	44(11)	10(2,5)	399	<0,0001
<b>Culture-</b>	4053(97,6)	52(1,3)	42(1)	6(0,1)	4153	<0,0001
<b>Total</b>	4243(93,2)	207(4,5)	86(1,9)	16(0,4)	4552	<0,0001

P : prélèvements, N : nombre, AUR : auramine, ZN : Ziehl- Neelsen, pos : positif, neg : négatif, + : positive, - : négative.



**Figure 1 : Evaluation des performances de la coloration de Ziehl- Neelsen et de l'Auramine par rapport à la culture**

**6. Evaluation de la coloration de Ziehl-Neelsen et à l'auramine par rapport à la *Polymerase Chain Reaction GeneXpert®***

Sur 4583 échantillons, la PCR a été réalisée pour seulement 228 cas (175 prélèvements extra-pulmonaires et 53 prélèvements pulmonaires). Elle s'est révélée positive pour 50 prélèvements (21,9%) et négative pour le reste (n= 178, 78,1%). Une discordance entre l'ED et la PCR

a été notée dans 27 échantillons parmi lesquels 2 étaient positifs seulement à l'ED. La PCR a permis la détection de 25 cas négatifs avec l'AUR et ZN. Ce gain de positivité était non significatif (p= 0,3) (Tableau 6).

En considérant la PCR comme référence, on note un gain non significatif (p=0,17) de sensibilité de 8% pour la coloration à l'AUR (44 % pour l'AUR versus 36 % pour ZN) (Figure 2).

**Tableau 6: Comparaison de l'examen direct par rapport à la *Polymerase Chain Reaction GeneXpert®***

ZN :neg	N de P AUR : neg ZN : pos %	N de P AUR : pos ZN : neg %	N de P AUR : pos AUR : neg %	N de P ZN : pos <%	N total de P	P
PCR+	25 (50)	15 (30)	7 (14)	3 (6)	50	0,3
PCR -	176 (98,9)	2 (1,1)	0	0	178	0,317
<b>Total</b>	201 (88,2)	17 (7,6)	7 (3,1)	3 (1,1)	228	0,3

P : prélèvement, N : nombre, AUR : auramine, ZN : Ziehl- Neelsen, pos : positif, neg : négatif, + : positif, - : négatif, PCR : *Polymerase Chain Reaction*.

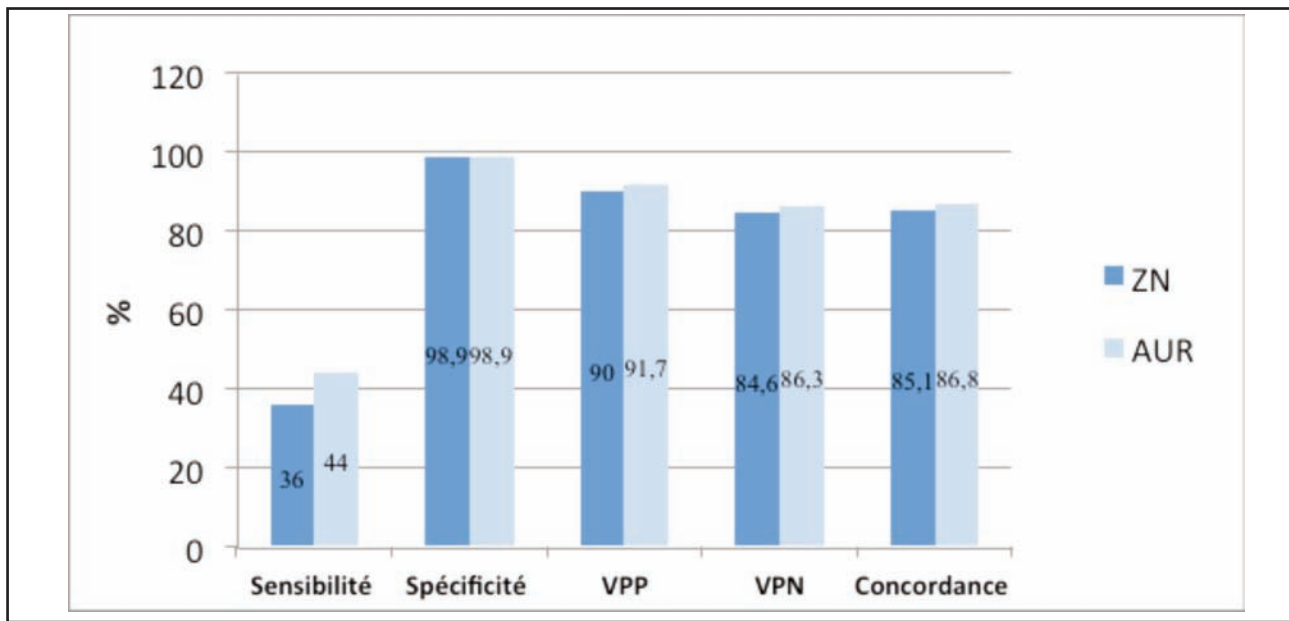


Figure 2 : Evaluation de la coloration de Ziehl-Neelsen et de l'Auramine par rapport à la *Polymerase Chain Reaction Gene Xpert*<sup>®</sup>

## DISCUSSION

La TB reste un problème majeur de santé malgré le développement d'antibiotiques actifs et les programmes nationaux de lutte contre ce fléau (7, 8). En Tunisie, l'endémicité de la TB est intermédiaire. La tuberculose peut se manifester sous différentes formes selon la localisation de l'infection. Après orientation par les signes cliniques et radiologiques, le diagnostic est basé dans un premier temps sur l'ED à la recherche de BAAR. C'est un outil de diagnostic simple, rapide, peu coûteux et qui présente une bonne spécificité surtout dans les pays à haute endémicité (9). Cependant, l'ED présente des limites. La recherche microscopique des BAAR nécessite une coloration au préalable. Les deux méthodes de coloration faites au laboratoire d'hygiène de Sfax sont celles à l'AUR et de ZN moyennant des microscopes à fluorescence et des microscopes optiques respectivement.

Par rapport à la coloration de référence ZN, le nombre de faux négatifs à l'AUR était faible (16 cas) soit une proportion de 0,4%. Ces échantillons étaient sous forme de crachats, de LB et de prélèvements ganglionnaires. La concordance observée dans notre travail était de 97,7%. Le faible nombre de faux négatifs est expliqué par l'expérience du personnel examinant les lames avec une confirmation de la part d'un biologiste en cas de positivité. L'étude élaborée par Ba *et al* au laboratoire National de référence de la TB à Dakar était en cohérence avec nos résultats et a montré une concordance égale à 96,9% entre les deux méthodes de coloration (10). La microscopie à lampes LED est actuellement préconisée par l'OMS pour être évaluée et utilisée dans les

contextes de prévalence élevée de la tuberculose (11). Ces lampes s'adaptent à un microscope qui fonctionne à une lumière claire. Elles ne nécessitent donc pas le recours à une chambre noire comme pour les lampes à mercure ce qui permet de maximiser l'utilisation de l'espace au sein du laboratoire (12, 13). En plus, la coloration à l'AUR est simple et facile à réaliser avec des réactifs commercialisés qui nécessitent une seule étape de reconstitution. Elle permet de diminuer le temps de l'examen de 75% par rapport à la coloration au ZN, ce qui aurait d'énormes avantages pour les laboratoires surchargés et recevant un débit journalier important de prélèvements tel que le laboratoire d'hygiène de Sfax (Débit de 20 lames par technicien par jour, variable d'un jour à l'autre) (11). Conformément aux données de la littérature, la coloration à l'AUR a montré sa supériorité par rapport au ZN. Dans notre étude, le taux de positivité de l'AUR est supérieur ou égal à celui de la coloration de ZN quelle que soit la nature de l'échantillon (à l'exception de l'abcès psoas). L'AUR était significativement plus sensible que ZN pour les crachats et les prélèvements ganglionnaires ( $p < 0,05$ ). La différence significative s'explique par le nombre relativement élevé de ces échantillons ( $n = 2385$ ) qui représentent à eux seuls plus que la moitié de la totalité des cas ( $n = 4583$ ). Dans notre étude, le gain en taux de positivité de l'AUR par rapport à ZN était plus marqué pour les prélèvements pulmonaires. Ce résultat est discordant avec celui publié dans les études de Krishna *et al* (14).

Toutes les études publiées s'accordent sur la performance de la coloration de l'AUR quelle que soit la charge

bacillaire. La sensibilité de l'AUR augmente surtout pour les formes PB. Ce gain en sensibilité apporte des avantages pour le diagnostic de la TB à faible charge bacillaire comme la TB infantile puisque l'expectoration volontaire est difficile chez les enfants moins de douze ans (15). C'est aussi le cas des prélèvements d'origine extra-pulmonaire provenant de cavités fermées et des frottis de personnes co-infectées avec le VIH. Dans notre étude, le taux de frottis PB positifs à l'AUR était plus élevé que celui trouvé avec ZN (4,1% versus 3,4%). Pour les formes MB, ce taux était nettement supérieur pour les frottis colorés à l'AUR (2,5% versus 1,3%). Nos résultats étaient en accord avec les données de la littérature (13, 16). Dans notre série, le taux de frottis positifs à l'AUR ayant un nombre exact de BAAR représentait 3,5 fois plus que celui obtenu avec ZN. La différence en taux de positivité de l'AUR par rapport à ZN était non significative pour les prélèvements présentant un nombre de croix supérieur ou égal à 1 avec un rapport de 1,01. Ceci s'accorde avec les résultats trouvés par Ba *et al.*, qui ont observé que l'écart entre le taux de positivité trouvé avec les deux colorations était faible pour les formes MB présentant au moins 10 bacilles pour 100 champs et particulièrement prononcé dans les cas à très faible charge bacillaire (un à trois bacilles par 100 champs) (10).

La culture reste la méthode de référence pour le diagnostic de certitude de la TB. Elle présente une haute sensibilité mais le délai d'obtention des résultats est long (11). En considérant la culture comme technique de référence, nos résultats montrent que le MF était significativement plus sensible que la microscopie optique ZN (49,5% versus 41,5%), alors que la spécificité et la VPN des deux méthodes étaient comparables. Ces résultats sont en cohérence avec les données de la littérature (10, 11, 17-20). En effet, la majorité des études comparant les deux colorations par rapport à la culture s'accordent sur le gain en sensibilité de la coloration à l'AUR par rapport à ZN aussi bien pour les prélèvements d'origine pulmonaire qu'extra-pulmonaire. Le gain en sensibilité de l'AUR par rapport à ZN varie de 0,12% à 31,38%. Dans certaines études, le gain en sensibilité s'accompagne d'une perte de spécificité (17, 21, 22). Dans d'autres, la spécificité est similaire pour les deux techniques (10, 11, 18, 19, 23-27). La perte de spécificité s'explique par le fait que les éléments inorganiques peu-

vent incorporer le colorant AUR et émettre une fluorescence comme les BAAR d'où l'induction à l'erreur (13). La PCR GeneXpert® a été approuvée par l'OMS comme un test de première intention pour le diagnostic de la TB pulmonaire, extra-pulmonaire et pédiatrique (11, 28). Ce test est en effet très fiable et permettra de faire des progrès considérables dans la détection précoce des cas de tuberculose et de tuberculose pharmacorésistante (29). De plus, il a montré son efficacité pour la détection des cas de TB chez la population co-infectée avec le VIH (30).

En considérant la PCR comme méthode de référence, notre étude montre un gain non significatif en sensibilité de l'AUR par rapport à ZN de 8% (44% versus 36%). Dans certaines études, une meilleure sensibilité de l'AUR a été notée (31, 32). La spécificité est bonne avec un taux de 98,9% pour les deux colorations. En comparaison avec l'examen microscopique, la sensibilité de la PCR est excellente en cas d'ED positif (100%). Elle est moins bonne en cas de négativité de l'ED (60 à 75%). Pour les prélèvements d'origine extra-pulmonaire, elle est encore plus faible (50 à 60%) (9). L'ED et la PCR constituent tous les deux des méthodes de diagnostic rapide de la TB. L'ED s'est révélé positif pour deux échantillons dont la PCR était négative chez une patiente sous traitement antituberculeux. Ce résultat peut être expliqué par la faible quantité de bactéries présentes dans les échantillons à caractère PB (31). Une autre hypothèse suggère que les faux négatifs sont dus à la présence d'inhibiteurs détectés dans les échantillons de tissus surtout. Chakravorty *et al.*, ont précisé que les variations de sensibilité de la PCR sont expliquées par le fait que l'extraction de l'ADN de certains échantillons tels que les ganglions lymphatiques est difficile. Elle entraîne donc une distribution non homogène de bacilles dans le spécimen d'où les résultats discordants par les différentes méthodes de diagnostic (33).

## CONCLUSION

La microscopie à fluorescence à lampes LED s'est montrée plus sensible et aussi spécifique que la microscopie conventionnelle. La coloration à l'AUR a permis un gain considérable en temps de lecture. La généralisation de cette méthode dans notre laboratoire permettra d'améliorer les performances diagnostiques ce qui a un impact positif sur la prise en charge des patients.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Mejri I, Ben Saad S, Daghfous H, Ben Khelifa M, Tritar F. Facteurs de risque de tuberculose pulmonaire étendue. *Rev Mal Respir.* 2016;33:A148.
2. Caruba GC, Martinez V, Popularea FD. Les nouveaux outils de diagnostic microbiologique de la tuberculose maladie. *Rev Med Int.* 2014;35:794-800.
3. Ninet B, Lombard PR, Schrenzel J, Janssens JP. Nouveaux tests pour le diagnostic de la tuberculose. *Rev Mal Respir.* 2011;28:823-33.
4. Loch C. La tuberculose, une histoire toujours d'actualité. *Med Sci.* 2016;32:535-6.
5. Rylance J, Pai M, Lienhardt C, Garner P. Priorities for tuberculosis research: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(12):886-892. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70201-2.
6. Mboup S, Gershy-Damet GM, Kane CT, Bélec L. In :



Biologie appliquée de l'infection à VIH et de ses comorbidités en Afrique. France: John LibbeyEurotext; 2015.

7. Cambanis A, Ramsay A, Wirkom V, Tata E, Cuevas LE. Investing time in microscopy: an opportunity to optimize smear-based case detection of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007;11:40-45.

8. Ajmi TH, Tarmiz H, Bougmiza I, Gataa R, Knani H, Mitraoui A. Profil épidémiologique de la tuberculose dans la région sanitaire de Sousse de 1995 à 2005. *RevTun Infect.* 2010;4:18-22.

9. Groupe de travail du conseil supérieur d'hygiène publique, France. Diagnostic clinique et bactériologique de la tuberculose. *Rev Mal Respir.*2003;20:741.

10. Ba F, Rieder HL. A comparison of fluorescence microscopy with the Ziehl-Neelsen technique in the examination of sputum for acid fast bacilli. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1999;3(12):1101-1105.

11. Gulati H, Mawlong M, Agarwal A, Ranee K. Comparative evaluation of clinical, cytological and microbiological profile in abdominal vs. cervical lymph nodal tuberculosis with special emphasis on utility of Auramine-O staining. *J Cytol.* 2021;38(4):191.

12. Minion J, Pai M, Ramsay A, Menzies D, Greenaway C. Comparison of LED and conventional fluorescence microscopy for detection of acid fast bacilli in a low-incidence setting. *PLoS One.* 2011;6:e22495.

13. Steingart KR, Henry M, Ng V, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2006;6:570-580.

14. Krishna M, Kumar A, Dayal S, Chaturvedi V. Determination of fluorescent stain and Ziehl-Neelsen stain for the demonstration of acid fast bacilli in cytological specimens. *Int J Res Med Sci.*2015;3:3749-3752.

15. Delacourt C. Particularités de la tuberculose chez l'enfant. *Rev Mal Respir.*2011;28:529-541.

16. Ulukanligil M, Aslan G, Tasci S.A comparative study on the different staining methods and number of specimens for the detection of acid fast bacilli. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95:855-858.

17. Ibrahim AO, Elrayah E, Gameel F. LED fluorescent microscope in laboratory diagnosis of tuberculosis. *Rawal Med J.*2017;42:396-399.

18. BhallaM, SidiqZ, SharmaPP, SinghalR, Myneedu VP, Sarin R. Performance of light-emitting diode fluorescence microscope for diagnosis of tuberculosis. *Int J Mycobacteriol.* 2013;2:174-178.

19. Mistry Y, Rajdev S, Mullan S. Comparative study of Z N staining vs. fluochrome staining and impact of sample processing on diagnosis of tuberculosis from various clinical samples. *Adv Microbiol.* 2016;6:953-958.

20. KivihyaNdugga LE, Van Cleeff MR, Githui WA, Nganga LW, KibugaDK, Odhiambo JA, et al. Comparaison complète de l'examen microscopique par Ziehl-Neelsen et par fluorescence pour le diagnostic de la tuberculose dans un contexte urbain à faibles ressources. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003;7:1163-71.

21. Rasool G, Siraj M, Naseem N, Anjum S, Lateef W, Nagi A. Detection of acid fast bacilli in tuberculous

lymph node tissue and touch preparations: A comparative study. *J Tuberc Res.* 2017;5:168-177.

22. Munot PP, Mhapuskar AA, Ganvir SM, Hazarey VK, Mhapuskar MA, Kulkarni D. Detection of Acid Fast Bacilli in Saliva using Papanicolaou Stain Induced Fluorescence Method Versus Fluorochrome Staining: An Evaluative Study. *J Int Oral Health.* 2015; 7(7):115-120. PMID: 26229384; PMCID: PMC4513763..

23. Chhina D, Gupta R, Chawla A. Comparison of Ziehl-Neelsen (ZN) and Auramine Phenol (AP) staining method to detect acid-fast bacilli in sputum smear. *Int J ResHealth Sci.*2018;6:1-5.

24. Rathod UD, Joshi A, Turbadkar S, Hirani N, Chawdhary A. Different methods of staining to optimize smear microscopy for diagnosis of pulmonary and extra pulmonary tuberculosis. *Indian J Microbiol Res.*2016;3:322-328.

25. Lawrence, Madhumita Debbarma M, Baveja C. P, Kumar S, Khanna A, Joseph Sapriina J. Comparative evaluation of fluorescent staining with Ziehl-Neelsen and Kinyoun staining in the diagnosis of clinically suspected cases of pulmonary tuberculosis. *International Journal of Contemporary Medical Research* 2016;3(7):1970-1974.

26. Noori MY, Ali F, Ali Z, Sharafat S. Comparison of Ziehl-Neelsen microscopy with fluorescent microscopy for tuberculosis diagnosis: an insight from a limited resource high burden setting. *J Jayub Med Coll Abbott abad.* 2017; 29(4):577-579. PMID: 29330981.

27. Ziaee M, Namaei M, Khazaei M, Azarkar G. Comparison of the value of twodifferentsputumstaining for diagnosis of acidfastbacilli. *Iran J ClinInf Dis.* 2008;3:99-102.

28. World Health Organization. Tuberculosis diagnostic technology and scape. 5th edition. Geneva: WHO; 2017.

29. World Health Organization. Tuberculose. [https:// www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis); 2021.

30. Faria MGBF, Andrade RLP, Camillo AJG, Leite KFS, Saita NM, Bollela VR, et al. Efetividade do GeneXpert® no diagnóstico da tuberculose em pessoas que vivem com HIV/aids. *Rev Saude Publica.* 2021;55:89. <https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2021055003125>

31. Gulati H, Mawlong M, Agarwal A, Ranee K. Comparative evaluation of clinical, cytological and microbiological profile in abdominal vs. cervicallymph nodal tuberculosis with special emphasis on utility of Auramine-O staining. *J Cytol.* 2021;38(4):191.

32. Dzodanu EG, Afrifa J, Acheampong DO, Dadzie I. Diagnostic Yield of Fluorescence and Ziehl-Neelsen Staining Techniques in the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: A Comparative Study in a District Health Facility. *Tuberc ResTreat.* 2019 Apr 10;2019:1-6.

33. Chakravorty S, Sen M, Tyagi J. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by smear, culture and PCR using universal sample processing technology. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4357-4362.

## CASE REPORT

### First case of pouchitis due to *Prevotella disiens* and *Morganella morganii* co-infection

### Premier cas de pouchite due à une co-infection à *Prevotella disiens* et *Morganella morganii*

Hajer Battikh<sup>1, 2</sup>

Anis Haddad<sup>3, 4</sup>

Feryel Turki<sup>1, 2</sup>

Melek Karaa<sup>1, 2</sup>

Chiraz Bousbiaa<sup>1, 2</sup>

Mohamed Guelbi<sup>2, 3, 4</sup>

Mohamed Jouini<sup>3, 4</sup>

Montassar J. Kacem<sup>3, 4</sup>

Meriam Zribi<sup>1, 2</sup>

1 Microbiology department. Rabta University Hospital, 1007, Tunis, Tunisia.

2 University of Monastir, Faculty of Pharmacy, 5000, Monastir, Tunisia

3 Surgery department A. Rabta University Hospital, Tunis 1007, Tunisia

4 University of Tunis El Manar, Faculty of medicine of Tunis, 1007, Tunis, Tunisia

Received November 10th 2021 accepted December 2nd 2021

Corresponding author :

Pr Hajer Battikh

Professor of Microbiology:

Address:

Microbiology department. Rabta University Hospital, 1007, Tunis, Tunisia.

E-mail address:

hajerbattikhmaaouia@gmail.com

#### Abstract

##### Objectives

We report a case of pouchitis due to *Prevotella disiens* and *Morganella morganii* in a 45-years-old woman patient with ulcerative colitis.

##### Patients and methods :

The pus sample was processed for aerobic and anaerobic culture. Identification of anaerobic bacteria and Gram-negative bacilli was realized respectively by ANC and GN cards in VITEK-2 system (BioMerieux, France). Susceptibility results were interpreted using the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) breakpoints.

##### Results :

After 18–24 h of aerobic incubation on 5% sheep blood agar and Drigalski agar, growth of *Morganella morganii* was detected. After 72h of anaerobic incubation, very small greyish colonies grew on chocolate agar and were identified as *Prevotella disiens*. It was susceptible to  $\beta$ -lactams and ciprofloxacin.

##### Conclusion :

The majority of anaerobic infections are mixed infections, involving aerobic and anaerobic bacteria that act synergistically. The treatment of anaerobic bacterial infections is complicated because of their long culture and the polymicrobial nature. It must cover anaerobes, enterobacteria and enterococci.

**Keywords :** *Prevotella disiens*, *Morganella morganii*, pouchitis, anaerobic bacteria, ulcerative colitis

#### Résumé

##### Objectifs :

Nous rapportons un cas de pouchite due à *Prevotella disiens* et *Morganella morganii* chez une femme de 45 ans souffrant de rectocolite hémorragique.

##### Patients et méthodes :

L'échantillon de pus a été mis en culture aérobie et anaérobie. L'identification de la bactérie anaérobie et celle de bacilles à gram négatif a été réalisée par les cartes ANC et GN de l'automatesystème VITEK-2 (BioMerieux, France). La sensibilité aux antibiotiques a été interprétée selon les recommandations de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

##### Résultats :

Après une incubation de 18-24h en aérobie sur gélose au sang et sur gélose Drigalski, *Morganella morganii* a été isolée. Après 72h d'incubation en anaérobiose, de petites colonies grises ont poussé sur gélose chocolat qui ont été identifiées comme *Prevotella disiens*. Cette dernière était sensible aux beta-lactamines et à la ciprofloxacine.

##### Conclusion :

La majorité des infections à germes anaérobies sont en réalité des infections mixtes, qui impliquent des bactéries aérobies et anaérobies agissant en synergie. Le traitement des infections à bactéries anaérobies est compliqué à cause de la culture bactérienne longue et la nature poly-microbienne du prélèvement. Son spectre doit couvrir les bactéries anaérobies, les entérobactéries et les entérocoques.

**Mots-clés :** *Prevotella disiens*, *Morganella morganii*, pouchite; bactéries anaérobies, rectocolite hémorragique

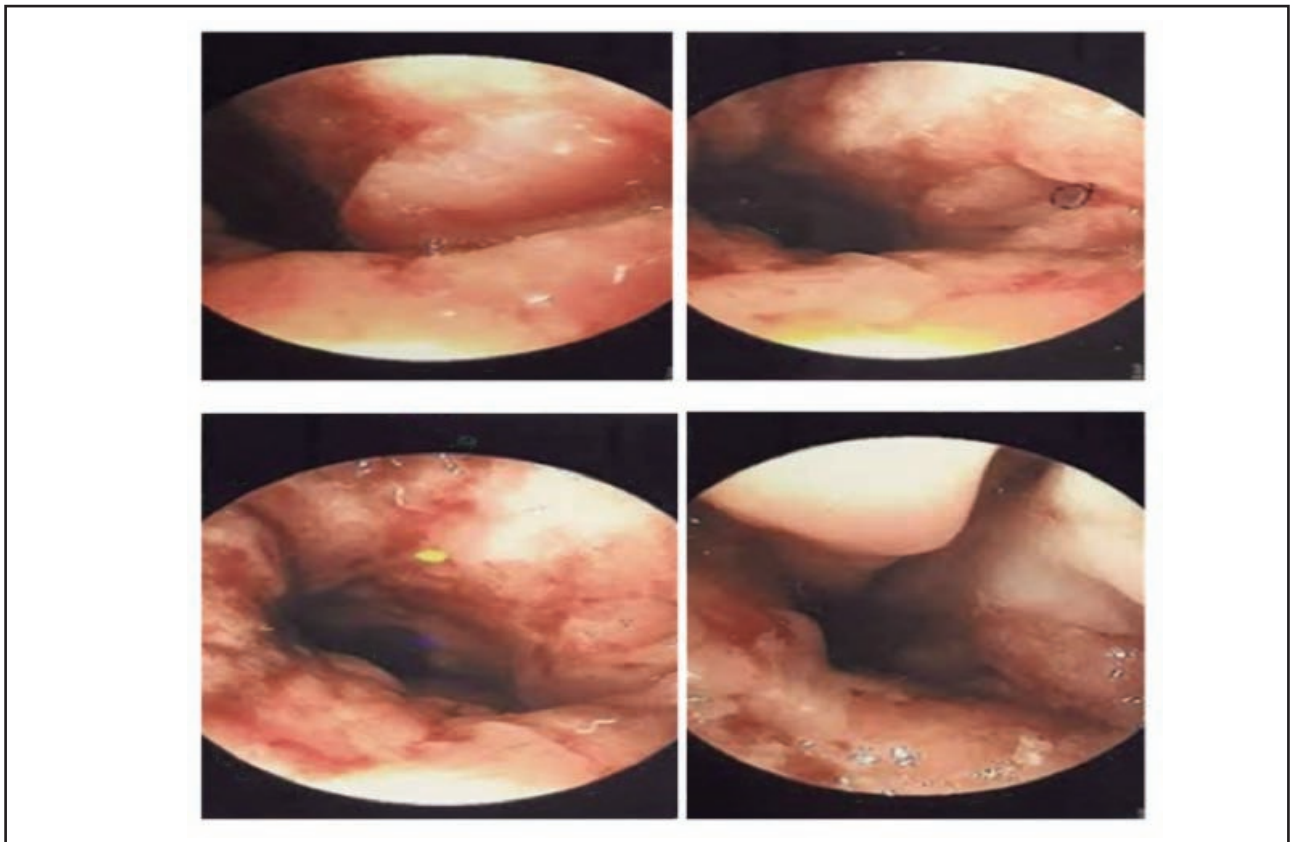
## INTRODUCTION

Pouchitis, a non specific inflammation of the ileal region, is the most frequent long-term complication following ileo-anal anastomosis in patients with inflammatory bowel diseases (IBD) (1,2). The physiopathology of pouchitis is still not well understood and involves several factors such as microbial overgrowth, colonic metaplasia, initial disease, immune dysregulation and faecal stasis (3). These different mechanisms alter the colic membrane and lead to inflammation favored by an imbalance in the production of pro and anti-inflammatory cytokines (1). Indeed, the intestinal microbiota of IBD patients are initially deregulated under the effect of multiple factors (4). This process is certainly associated with microbial proliferation (1). The involvement of strict anaerobic bacteria in the post-operative intra-abdominal infections process is evaluated at 75% to 100% (5). This could be explained by the synergy that exists between facultative aero-anaerobic bacteria and strict anaerobic bacteria: facultative aero-anaerobic bacteria consume the oxygen present in the medium for their own growth and will then create the ideal conditions for the growth of anaerobes (6). This report discusses a case of pouchitis due to

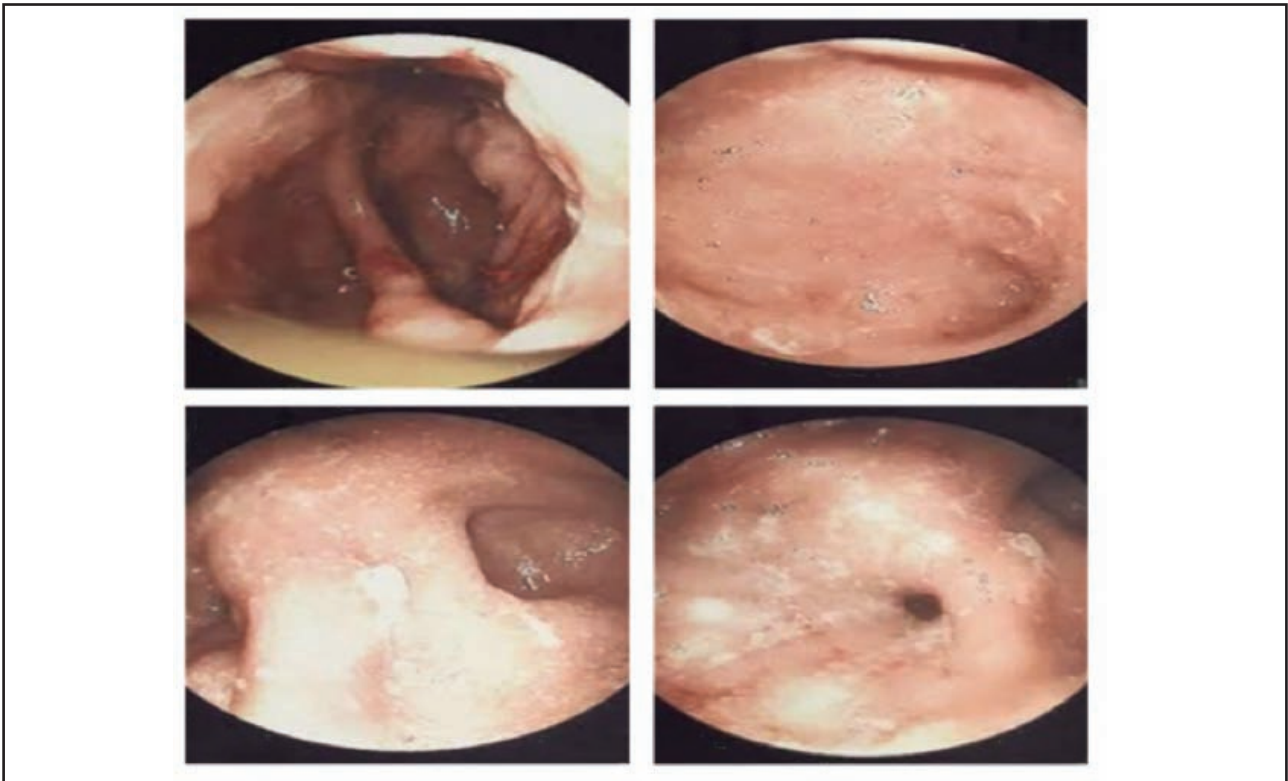
*Prevotella disiens* (*P. disiens*) and *Morganella morganii* (*M. morganii*) in patient with ulcerative colitis.

## CASE REPORT

The patient, a 45-year-old woman with ulcerative colitis since 2007, underwent a subtotal colectomy with ileostomy and sigmoidectomy for severe acute colitis in February 2017. In August 2018 she received a restoration of the digestive continuity by means of an ileorectal anastomosis. After one year, due to recurrent flare-ups of proctitis that were resistant to medical treatment, a proctectomy with an ileal pouch-anal anastomosis was performed associated with a diverting ileostomy. She was treated successively with mesalazine, corticosteroid and then azathioprine-infliximab without a favorable response. Currently, the evolution was marked by a stenosis of the ileoanal pouch anastomosis which led to pouch related sepsis. She was hospitalized on February 2<sup>nd</sup>, 2021 for surgical operation. Colonoscopy prior to the surgery showed active pouchitis with mucosa characterized by diffuse redness, severe edema with erosions and ulcers, and an ileal pouch fistula (figure 1 and 2).

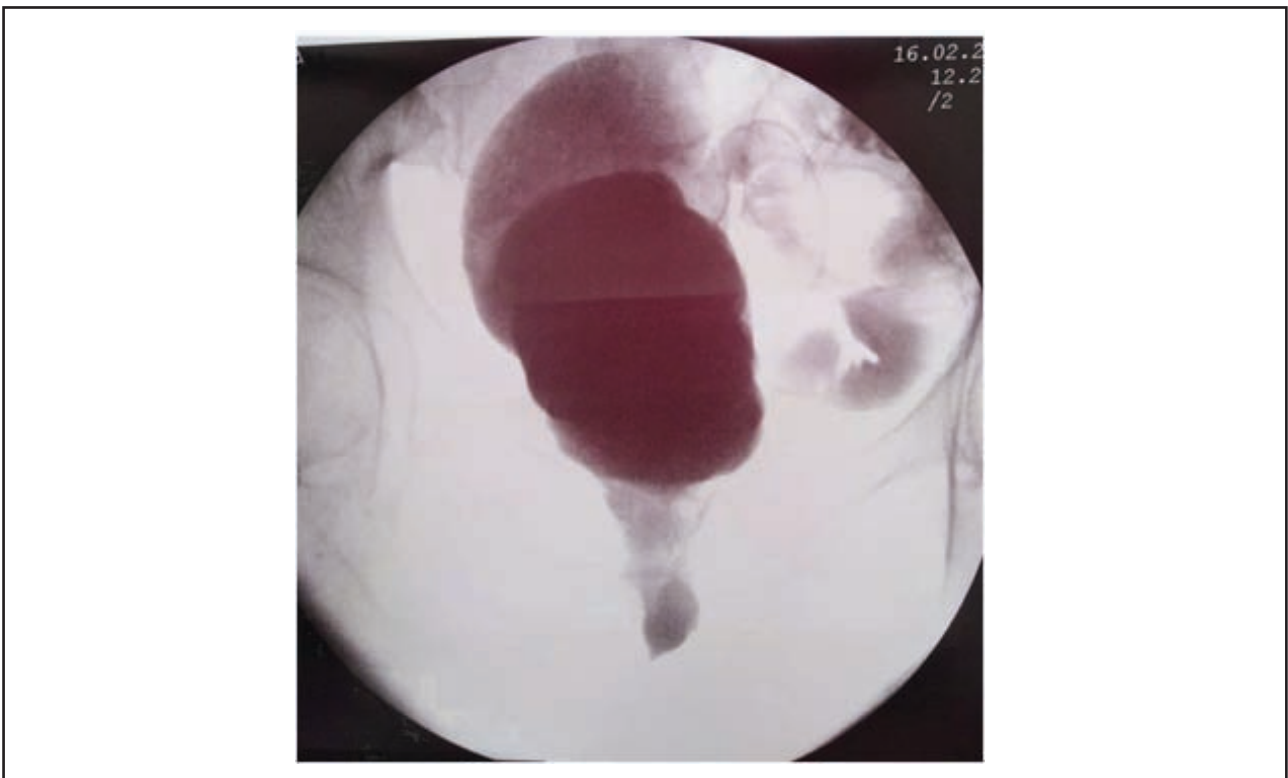


**Figure 1: Colonoscopy showed active pouchitis with mucosa characterized by diffuse redness, severe edema with erosions and ulcers**



**Figure 2: Coloscopy: Ileal pouch fistula**

A colonic opacification has been prescribed and showed the pouch and the anastomosis (figure 3).



**Figure 3: Colonic opacification showed the pouch and the anastomosis**

During surgery, the stenosis was manually dilated. Brownish-colored pus came out and was extracted by inserting a Nelaton catheter. The sample was immediately sent to the Microbiology Department and the pouch was cleaned with saline era. The patient was treated with cefotaxime, 1g three 3 times a day, and metronidazole, 500mg three times a day, while awaiting bacteriological results.

The pus was inoculated in 5% sheep blood agar, ordinary agar, chocolate agar with Polyvitex (bioMérieux, France), Drigalski agar, and heart-brain broth. As an anaerobic etiology can be present in such cases, the sample was simultaneously processed for anaerobic culture in a 5% horse blood agar. A fetid odor was noticed during the seeding of the culture media. Cultures were incubated under anaerobic conditions with Genbox (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) for a total of 5 days. After 18–24 h of aerobic incubation on 5% sheep blood agar and Drigalski agar, growth of *Morganella morganii* was found using the GN gallery of VITEK-2 system (bioMérieux, France). After 72h of anaerobic incubation, very small greyish colonies grew on chocolate agar and on blood agar incubated in anaerobic conditions with the presence of a zone of beta-hemolysis. The bacteria was non motile in direct microscopic examination of wet mount preparation. Gram staining of the isolate revealed short, slightly staining Gram-negative rods. The rods were bile-esculin medium positive, oxidase-negative, catalase-negative and resistant to vancomycin.

The isolate was confirmed as *P. disiens* by automated ANC cards in VITEK-2 system (bioMérieux, France). The report of both aerobic and anaerobic infection was conveyed to the clinicians. Susceptibility results were interpreted using EUCAST breakpoints. *P. disiens* was susceptible to cefotaxim, ticarcillin, piperacillin-tazobactam, cefalexin, cefepim, amoxicillin-clavulanic acid, ceftazidim, ampicillin, ertapenem, imipenem, ciprofloxacin. The E-test strips for metronidazole susceptibility of *P. disiens* was performed (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) on brucella agar plates supplemented with 5% horse blood, under anaerobic conditions for 48h and showed that this latter was susceptible (<0,016 mg/L).

*M. morganii* was susceptible to ticarcillin, combination piperacillin and tazobactam, cefotaxime, ceftazidime, ceftiprome, aztreonam, ertapenem, gentamicin, amikacin, norfloxacin, ciprofloxacin, and fosfomycin. It was resistant to nalidixic acid, combination trimethoprim/sulfamethoxazol.

Antimicrobial chemotherapy with cefotaxim and metronidazole continued until discharge, 15days later. Postoperative recovery was uneventful, and the patient remained afebrile and asymptomatic.

## DISCUSSION

Anaerobic Gram-negative bacilli mostly belong to the human microbiota in the oral cavity (*Fusobacterium*,

*Prevotella*, *Porphyromonas*). They are present in many types of infections mostly of polymicrobial origin (oral and dental infections, respiratory infections, intra-abdominal infections...). The species of *Prevotella* genus are predominant bacteria of the oral cavity, and are involved in all types of oral infections. They can however be responsible for various other kinds of infections (genitourinary, skin and soft tissue infection) (7). Many cases of infections due to *Prevotella* have been reported that were mostly due to *Prevotella* alone such as skin and soft tissue infections (*P. loescheii*) (8), aortitis (*P. intermedia*) (9), intra-abdominal abscesses after gastrectomy (10) and a bloodstream infection in an elderly heart failure patient (11). Other infections were described as mixed infections such as pyonephrosis due to *P. disiens* and *Escherichia coli* co-infection (12). Although the involvement of anaerobic bacteria has rarely been isolated in pouchitis, the pathophysiology suggests, depending on the microbiota of the digestive system, that they could be involved in the disease (13). The majority of bacteria that have been described as involved in pouchitis were *Escherichia coli*, *Klebsiella*, other coliforms, *Pseudomonas*, and *Morganella* in isolation or in combination (14).

Indeed, the great majority of anaerobic infections are mixed infections, involving aerobic and anaerobic bacteria that act synergistically. Suppurations occur in the neighbourhood of a normal microbiota. Intestinal infections are generally related to damage to the intestinal barrier: surgical interventions, traumas, neoplasms. The pathogenic power of *Prevotella sp.* seems to be linked to their enzymatic equipment such as proteases and fibrinolysins (16).

The aspect of pus is very suggestive: an abundant pus with a smelly odor. The culture must be carried out quickly. Their isolation and their identification by the conventional methods requires from a few days to a few weeks. The isolation of the anaerobic bacteria remains tricky. They develop slowly, require enriched media, and live in symbiosis among themselves and with the associated aerobic bacteria. The colonies of *Prevotella* are small, from 1 to 3 mm in diameter, gray, bright, and sometimes brown or black at the center (16). The Petri dishes are incubated for 48 hours under anaerobic conditions, read a first time then incubated a second time under anaerobic conditions for 5 more days. Besides the isolation on Petri dishes, it is necessary to inoculate an anaerobic broth (Rosenow, thioglycolate, Schadler, *Brucella*) (16). The *Prevotella* species are immobile in the direct microscopic examination of wet mount preparation, catalase-negative, oxidase-negative, urease-negative, they ferment glucose and are resistant to vancomycin and kanamycin at 1000µg. *P. disiens* is variable esculin-bile. Strains of *Prevotella* are naturally highly

sensitive to penicillin, but approximately 60-75% (7, 16) of the strains produce an acquired  $\beta$ -lactamase that inactivates oral aminopenicillins, 1<sup>st</sup> generation cephalosporin, 2<sup>rd</sup> generation cephalosporin and 3<sup>rd</sup> generation cephalosporin. Activity is restored when combined with a  $\beta$ -lactamase inhibitor. No strain is resistant to carbapenems. Resistance to clindamycin and metronidazole is very rare. Finally, moxifloxacin and tigecycline are active *in vitro* (7). *Prevotella* is naturally resistant to aztreonam, aminosides, trimethoprim, sulfonamides, quinolones, fosfomycin, fusidic acid, and glycopeptides (16).

## CONCLUSION

The treatment of anaerobic bacterial infections is complicated because of their long culture, the poly-microbial nature of the culture and the increasing resistance to

antibiotics of such bacteria (6). In accordance with the recommendations of the College of Infectious and Tropical Diseases (17), the probabilistic antibiotic therapy depends on the anatomical situation and takes account of the aerobic Microbiota associated. In abdomino-peritoneal infections, the spectrum of probabilistic antibiotic therapy must include anaerobes, enterobacteria and enterococci and it generally combines metronidazole and a 3<sup>rd</sup> generation cephalosporin (17).

## Funding

This research did not receive any grant from funding agencies in the public, commercial, or not for-profit sectors.

## Conflicts of interest

On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Anastomose iléo-anale : complications à long terme - EM consulte. (cité 28 févr 2021); <https://www.em-consulte.com/article/267011/anastomose-ileo-anale-complications-a-long-terme>
2. Navaneethan U, Shen B. Diagnosis and management of pouchitis and ileoanal pouch dysfunction. *Curr Gastroenterol Rep*. 2010;12(6):485-94.
3. Shen B, Lashner B.A. Diagnosis and Treatment of Pouchitis. *Gastroenterol Hepatol*. 2008;4(5):355-61.
4. Masson E. La dysbiose intestinale dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Internet). EM-Consulte. (consulté 28 févr 2021). <https://www.em-consulte.com/article/1414593/la-dysbiose-intestinale-dans-les-maladies-inflamma>
5. Société Française de Microbiologie. Bactéries anaérobies strictes. IN: REMIC: Société Française de Microbiologie. Ed: 2018: p485-495.
6. Nema S, Brahmachari S. Pyonephrosis by *Prevotella disiens* and *Escherichia coli* coinfection and secondary peritonitis in an obstructive uropathy patient: A case report and review of the literature. *J Fam Med Prim Care*. 2020;9(2):1263-1265.
7. Isnard C, Guérin F, Cattoir V. Bactéries anaérobies strictes. In : F. Denis M.C. Poly, C. Martin, V. Cattoir. I. Bactériologie médicale 3<sup>ème</sup> ed, Issy-Les-Moulineaux Cedex: ELSEVIER MASSON; 2016, p515-527
8. Mehmood M, Jaffar NA, Nazim M, Khasawneh FA. Bacteremic skin and soft tissue infection caused by *Prevotella loescheii*. *BMC Infect Dis*. 2014; 14, 162. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-162>
9. Boersma C, Kampschreur LM, Buter H, Doorenbos BM, Klinkert P, Koning GG. *Prevotella intermedia* infection causing acute and complicated aortitis—A case report. *Int J Surg Case Rep*. 2017;32:58-61.
10. Nishikawa M, Honda M, Kimura R, Kobayashi A, Yamaguchi Y, Hori S, *et al*. The bacterial association with oral cavity and intra-abdominal abscess after gastrectomy. *PLOS ONE*. 2020;15(11):e0242091.
11. Posteraro P, De Maio F, Menchinelli G, Palucci I, Errico FM, Carbone M, *et al*. First bloodstream infection caused by *Prevotella copri* in a heart failure elderly patient with *Prevotella*-dominated gut microbiota: a case report. *Gut Pathog*. 2019;1(1):44.
12. Nema S, Brahmachari S. Pyonephrosis by *Prevotella disiens* and *Escherichia coli* coinfection and secondary peritonitis in an obstructive uropathy patient: A case report and review of the literature. *J Family Med Prim Care*. 2020;9(2):1263-1265. doi: 10.4103/jfmpc.jfmpc\_907\_19.
13. Zezos P, Saibil F. Inflammatory pouch disease: The spectrum of pouchitis. *World J Gastroenterol WJG*. 2015;21(29):8739-8752.
14. I.Brook. Spectrum and treatment of anaerobic infections. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother*. 2016;22(1):1-13.
15. Kühbacher T, Schreiber S, Runkel N. Pouchitis: pathophysiology and treatment. *Int J Colorectal Dis*. 1998;13(5-6):196-207.
16. Dubreuil, Sédallian A. Bacilles anaérobies à gram négatif. In: J. Frenay, F. Renaud, R. Leclercq, P. Riegel. Précis de bactériologie. Paris: ESKA ; 2007, p 1701-1731.
17. CMIT. Infections à anaérobies -Gangrène gazeuse. In E.PILLY 27<sup>ème</sup> Edition: ALINea Plus ed; 2020; pp 356-359.

# INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

## Introduction

La Revue Tunisienne de Biologie Clinique (RTBC) est publiée par la Société Tunisienne de biologie Clinique. Les sujets publiés se rapportent à tous les aspects et toutes les disciplines de la Biologie Clinique.

La revue accepte les articles revue générale, les articles de recherche, les articles originaux, les présentations de cas pratiques, les notes de formation continue, les revues de presse ou de livres et les lettres à l'éditeur.

Les manuscrits soumis à la RTBC ne doivent pas avoir fait l'objet de publication antérieure. Tous les documents reçus sont sujets à une révision éditoriale à des fins de conformité avec le style adopté par le Journal.

Les principes éthiques doivent être pris en considération dans la préparation et la publication des manuscrits.

Les auteurs doivent clairement déclarer tout conflit d'intérêt en rapport avec le sujet.

Tous les articles sont examinés par au moins deux lecteurs anonymes sélectionnés par le comité de rédaction. Les noms des auteurs ne sont pas déclarés aux lecteurs. Le comité de rédaction s'assurera qu'il n'y a pas de conflit d'intérêts dans l'attribution des lecteurs.

Les seules exceptions à la règle de double lecture anonyme sont :

- les éditoriaux sollicités, qui peuvent dans certains cas n'être évalués que par le seul Comité de Rédaction ou par un seul lecteur extérieur ;
- les textes validés par des sociétés savantes (recommandations, consensus, etc.), et de façon générale les textes officiels, qui sont publiés sous leur forme originale sans aucune modification. Les modalités d'évaluation sont simplifiées et peuvent varier pour les numéros supplémentaires et spéciaux.

Les articles et tous les autres documents imprimés et publiés dans la RTBC représentent les opinions de leurs auteurs et ne reflètent nullement les idées de l'éditeur ou du bureau exécutif de la Société Tunisienne de Biologie Clinique.

## La langue de soumission

Les manuscrits publiés par la RTBC peuvent être rédigés en français, en anglais ou en arabe. Le titre, le résumé et les mots clés doivent être fournis dans deux langues dont obligatoirement l'anglais.

Les noms et les unités des substances chimiques ou biologiques devraient suivre les recommandations de l'IUPAC-IUBMB et de l'IFCC.

## Les types de manuscrits

**Les articles originaux :** Ils ont pour objet de présenter un travail original se rapportant à la biologie clinique pour la résolution de problèmes en pathologie humaine.

Les manuscrits soumis devraient présenter des informations concises et bien organisées et ne doivent pas dépasser les 20 pages (illustrations, références et résumé compris). Ils doivent comporter les sections suivantes dans l'ordre : une page titre, une page résumé et mots clés, les pages tableaux et figures et les pages comportant notamment les chapitres: introduction, matériel et méthodes, résultats, discussion et références.

**Les articles de revue générale :** ce sont des articles de synthèse ayants pour objet de présenter une mise au point des connaissances ou de souligner les acquisitions récentes. Ils sont rédigés par des experts ayant effectué des recherches sur le sujet s'y rapportant et sont souvent publiés sur la base d'invitation par le comité de rédaction. Des suggestions au rédacteur en chef peuvent toutefois être avancées. Les mises au point ne doivent pas comporter plus de 70 références; Les recommandations pour la rédaction sont identiques à celles concernant les articles originaux.

**Communication courte :** c'est un espace réservé à des articles consacré à l'exercice quotidien de la biologie (évaluation technique et réactovigilance, cas clinique, valeurs sémiologiques des analyses, management des laboratoires, informations utiles pour la formation continue ...). Ces communications doivent comporter moins de 2000 mots, deux tableaux ou figures et moins de 20 références.

**La Lettre à l'éditeur :** Cette rubrique vous permet de réagir et d'envoyer vos questions ou commentaires sur les articles publiés par la RTBC. La lettre à l'éditeur peut aussi concerner une nouveauté ou un événement en biologie clinique. La lettre doit être concise et peut inclure une figure ou un tableau. La pertinence et la compatibilité éthiques des lettres seront examinées par le comité de rédaction. Les lettres à la rédaction ne doivent pas excéder 2 pages ni comporter plus d'un tableau ou figure et 5 références bibliographiques.

### Préparation des manuscrits

Les manuscrits doivent être rédigés en format Word avec une interligne de 1,5, une police Times News Roman de 12 avec 1 marge de 2,5 cm des 4 côtés de la page avec une pagination.

La page de titre : Cette page doit contenir les éléments suivants:

- Le titre en français ou arabe et le titre en anglais,
- Le type du manuscrit,
- Les Noms et Prénoms dans l'ordre des auteurs suivi chacun par le numéro (mis entre parenthèse) de son adresse professionnelle
- Les numéros et adresses professionnelles de chaque auteur.
- Les coordonnées du correspondant : nom de l'auteur, titre, adresse professionnelle, et adresse e-mail.
- Les remerciements éventuels.

Le titre doit clairement refléter le contenu du manuscrit et ne doit pas dépasser 15 mots.

Le résumé : les résumés en Français ou Arabe et en anglais doivent être composés de 180 à 220 mots et comporter l'introduction, les objectifs, les méthodes, les résultats et les conclusions de l'étude. Le résumé ne doit contenir aucune abréviation ni référence.

Les mots clés : sont mis dans la page des résumés. 3 à 8 mots clés doivent être fournis dans deux langues (dont obligatoirement l'anglais). Il est de première importance que les mots clés soient en conformité avec le MeSH (accessible notamment par la page principale de PubMed).

Les unités et les abréviations : Les données numériques doivent être déclarées en unités SI. L'utilisation des unités locales non SI est autorisée sous réserve de mettre entre parenthèse l'équivalent en SI.

Dans le manuscrit les abréviations doivent être explicitées (données entre parenthèses) à leur première apparition dans le texte. Toutes les abréviations doivent être au format internationalement reconnu.

Les tableaux : Ils doivent être présentés sur des pages séparées du texte et numérotés consécutivement en chiffres romains dans l'ordre d'apparition dans le texte. Chaque tableau doit comporter un titre au-dessus. Les notes de bas de page peuvent être insérées lorsque c'est nécessaire.

Les figures : elles sont numérotées en chiffres arabes par ordre d'apparition dans le texte. Les numéros, les titres et les légendes des figures doivent être mis en dessous et sur une même page.

Les références : Les références doivent être classées par ordre numérique à la fin de l'article en fonction de l'ordre de citation dans le texte. Les noms abrégés des revues doivent être conformes aux recommandations de MEDLINE disponibles à l'adresse suivante [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/).

Seuls les articles publiés ou sous presse peuvent être inclus.

• *Exemples de références:*

o *Article d'une revue :*

Panteghini M, Forest JC. Standardization in laboratory medicine: new challenges. Clin Chim Acta 2005;355:1-12.



o *Article d'un Livre*

Panteghini M, Bais R, Van Solinge WW. Enzymes. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2006:597-643.

**Pour Soumettre un article :**

Pour soumettre un article vous devez accéder au site [http://www.rtbc.org.tn /](http://www.rtbc.org.tn/).

Pour commencer la soumission d'un manuscrit il faudrait tout d'abord vous connecter à votre compte. Si vous n'êtes pas membre du site de la RTBC il faudra créer un compte.

La soumission se fera en 10 étapes successives et vous devez préparer les fichiers suivants :

- le titre en français et en anglais
- une seule page contenant uniquement le titre de l'article, les auteurs et leurs institutions ainsi que le nom et l'adresse complète (avec email, n° de tel mobile et adresse) de l'auteur correspondant
- le résumé en français et en anglais
- les mots clés
- le fichier principal de votre article ne doit comporter ni titre, ni auteur ni aucun signe permettant de reconnaître son origine (afin de garantir le maximum d'impartialité dans le processus d'évaluation)
- un document à part contenant les tableaux et figures avec leurs numéros et titres
- les images à insérer doivent être au format imprimable Jpg (300 pixels/pouce), .PSD, .Tiff ou AI)..
- le formulaire de cession de Copyright : Le manuscrit doit être accompagné d'une lettre indiquant que:
  - o Tous les co-auteurs ont accepté de soumettre le manuscrit à la revue,
  - o Les conclusions n'ont pas été publiées ailleurs;
  - o Le manuscrit n'est pas actuellement à l'étude par une autre revue,Les droits d'auteurs du manuscrit sont cédés à la Société Tunisienne de Biologie Clinique.  
Le formulaire de consentement est téléchargeable sur le site de la revue ([www.rtbc.org.tn](http://www.rtbc.org.tn))

Les Caractères accentués ne doivent pas être utilisés dans les noms des documents. Evitez d'utiliser MS Power Point pour les textes, tableaux et figures.

La soumission en ligne se fait en 10 étapes. Tant que vous n'avez pas validé définitivement votre soumission qui se trouve à la dernière étape vous aurez toujours l'occasion de la modifier. Vous pouvez à tout moment interrompre la soumission. Les étapes déjà saisies ne seront pas perdues et vous aurez la possibilité de la continuer en accédant à l'espace «Mes Soumissions».

**Principes éthiques** applicables aux recherches in vivo impliquant des sujets humains et animaux : Tous les manuscrits rapportant des études impliquant des sujets humains ou des animaux doivent être accompagnés d'une lettre d'approbation obtenue du comité d'éthique de l'institution où le travail est accompli. Le comité de rédaction se réserve le droit de demander des rapports similaires pour les études in vitro.

Les adresses postales et email de la revue et du comité de rédaction sont accessibles sur le site web de la STBC : <http://www.stbc.org.tn>

*Ces instructions aux auteurs sont conformes aux «Exigences uniformes pour les manuscrits présentés aux revues biomédicales», préparé par le Comité international des rédacteurs de revues médicales (<http://www.icmje.org>) .*

*Dernière mise à jour : Mars 2015*

# N O T E S

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....