

## DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE DE LA TUBERCULOSE

La mise en évidence du bacille de la tuberculose par la microscopie ou la mise en culture constitue le diagnostic de certitude de la tuberculose pulmonaire ou extra-pulmonaire. Le rôle du laboratoire est de confirmer le diagnostic de tuberculose, d'identifier les mycobactéries afin de s'assurer qu'il s'agit d'une mycobactérie du complexe tuberculosis, de déterminer la sensibilité aux antituberculeux et de détecter les résistances notamment à l'INH et la RIF.

### I- Les prélèvements

#### 1-Les crachats : expectorations

Prélevés le matin à jeun après un effort de toux profond afin de ramener les sécrétions bronchiques. Recueillis dans des flacons propres, à fermeture étanche et à large ouverture, portant une étiquette (collée sur le pot et non sur le couvercle) avec nom et prénom du malade ainsi que son service demandeur.

La présence de bacilles dans les sécrétions respiratoires étant discontinu le prélèvement doit être répéter 3 jours de suite.

Tout prélèvement doit être accompagné d'une fiche de renseignements indiquant l'identité du malade, son âge et son adresse, ainsi que la nature et la durée du traitement antituberculeux reçu éventuellement avant le prélèvement.

#### 2-Autres prélèvements :

##### Le tubage gastrique :

Réalisé quand le malade ne peut pas expectorer (femmes et enfants). Il consiste à prélever dans l'estomac, à l'aide d'une sonde naso-gastrique les sécrétions bronchiques qui ont été dégluties pendant la nuit. Il s'effectue le matin à jeun au lit du malade.

##### Prélèvements sous fibroscopie :

- Aspiration bronchique
- Brossage endobronchique
- Lavage Broncho-alvéolaire

##### Prélèvements extra-pulmonaire :

\*Sans flore microbienne contaminante:

Liquides d'épanchement de séreuses, LCR, biopsies chirurgicales, ponctions ganglionnaires, pus d'abcès fermés.

\*Prélèvements contaminés par une flore microbienne :

Urines, pus d'abcès fistulisés ...

### **Conservation et transport :**

Les prélèvements, quand ils ne sont pas emmenés immédiatement au laboratoire doivent être conservés à +4°C durant une période ne dépassant pas les 5 jours.

Le transport doit se faire dans des boites spécifiques et une glacière (à +4°C) quand la durée de transport dépasse les 3h.

### **II-Examen microscopique :**

Il permet de détecter rapidement les tuberculeux les plus contagieux. Il constitue l'examen clef dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire dans les pays à haute prévalence, car il permet la mise en route rapide du traitement des cas présentant une microscopie positive. Malheureusement pas assez sensible, le produit pathologique examiné doit contenir au moins 10 000 bacilles/ml pour être positif. C'est pourquoi dans les tuberculoses extra-pulmonaires (pauci-bacillaires), l'examen microscopique est rarement positif.

### **Méthode :**

Un frottis sur lame d'une parcelle du prélèvement est réalisé, puis examiné au microscope après coloration.

Deux colorations sont couramment utilisées : la coloration de Ziehl-Neelsen à chaud et la coloration à l'auramine.

**Coloration de Ziehl-Neelsen :** elle comprend 3 étapes :

-Coloration : la fuchsine

-Décoloration : l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dilué au 1/4 puis alcool à 95°.

-Contre coloration : bleu de méthylène.

Les bacilles Acido-Alcool-Résistants (B.A.A.R.) apparaissent rouges sur fond bleu.

La lecture se fait au microscope optique standard (grossissement 100).

Cette technique est simple, rapide et peu coûteuse. Le nombre de bacilles présents dans l'expectoration d'un malade est en relation directe avec son degré de contagiosité.

### **Expression des résultats :**

Nombre de BAAR	Réponse
Absence de BAAR/300 champs	Lame Négative
1 à 9 bacilles/300 champs	Lame douteuse Prélèvement à refaire
10 à 99 bacilles/100 champs	Lame faiblement positive (+)
1 à 10 bacilles/champs	Lame moyennement positive (++)
> 10 bacilles/champs	Lame fortement positive (+++)

**Coloration à l'auramine :** La fuchsine est remplacée par l'auramine, les bacilles fixent le colorant fluorescent et le conservent après effet de l'acide et de l'alcool.

Le frottis coloré est examiné au microscope à fluorescence avec un objectif au faible grossissement (25 ou 40)

La sensibilité et la spécificité des 2 colorations sont comparables.

L'avantage de la coloration à l'auramine est la facilité et la rapidité de la lecture.

### **III-CULTURE :**

La culture est le moyen le plus fiable de faire le diagnostic de la tuberculose. La sensibilité de la culture est 2 à 3 fois supérieure à celle de l'examen microscopique. Elle permet aussi de pratiquer un test de sensibilité aux antibiotiques.

#### **1-Milieus de culture des mycobactéries :**

##### **a-Milieus solides :**

-Milieu de Löwenstein-Jensen (L.J) : milieu à l'œuf. C'est le milieu de référence et le plus employé.

-Milieu de coletsos : favorise la culture de M.bovis et M.africanum .

-Milieux de Middelbrook : 7H10 et 7H11 : permettent une bonne croissance du bacille tuberculeux à condition qu'ils soient incubés dans une atmosphère contenant 10% de CO<sub>2</sub>.

**b-Milieus liquides :** permettent une détection plus rapide de M.tuberculosis (12 jours).

-Milieu liquide de Middelbrook 7H9.

-Milieu MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube).

La détection de la culture peut se faire à l'œil nu ou grâce à des automates (Bactec).

**c-Milieus mixtes (liquide/solide) :** système de culture biphasique qui combine un flacon contenant un milieu liquide Middelbrook 7H9 et un tube (à visser sur le flacon) contenant 3 lames : un milieu de Middelbrook 7H11, un milieu de Lowenstein-Jensen et une gélose chocolat (destinée à l'isolement des germes banaux).

Ce système permet une détection plus rapide des mycobactéries et ne nécessite pas l'acquisition d'un appareillage pour la lecture des flacons.

#### **2-Décontamination des prélèvements :**

La plupart des produits pathologiques, à l'exception de ceux qui viennent de lésions fermées (séreuses, articulations, prélèvements lors d'interventions chirurgicales), sont contaminés par d'autres bactéries. Pour détruire ces bactéries qui peuvent contaminer le milieu de culture, il est nécessaire de décontaminer le prélèvement avec des antiseptiques basiques. Les produits pathologiques sont ensuite centrifugés, le liquide surnageant éliminé et le culot est ramené à pH neutre par un acide faible.

### **3-Ensemencement :**

Le culot de centrifugation est ensemencé dans au moins deux tubes contenant un milieu de culture (Lowenstein-Jensen). Dans le cas de lésions fermées, le prélèvement est ensemencé directement sans décontamination.

### **4-Mise à l'étuve (incubation) :**

Les tubes ensemencés sont placés dans une étuve à 37°C. *M. tuberculosis* poussant très lentement, ne donnera des colonies visibles à l'œil nu qu'après 3 à 4 semaines d'incubation.

### **5-Lecture :**

Au bout de 28 jours, on observe à l'œil nu les colonies, à la surface du milieu de Lowenstein Jensen. En cas d'apparition de colonies, un frottis coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen sera effectué pour vérifier la présence de BAAR, avant de déclarer la culture positive. Si la culture est négative il faut refaire une deuxième lecture au 42ème jour d'incubation. Si c'est négatif une 3ème et dernière lecture se fera au 72ème jour d'incubation avant de déclarer la culture négative.

### **6-Expression des résultats :**

Le nombre de colonies est en relation directe avec la richesse en bacilles des lésions. C'est pourquoi les colonies sont comptées et les résultats donnés en nombre de colonies par tubes.

Nombre de colonies/tube	Lecture
Absence de colonies	Culture négative
1 à 9 colonies	Nombre exact de colonies
10 à 100 colonies	+
100 à 200 colonies	++
> 200 colonies	+++

### **IV-Identification :**

Lorsque les colonies apparaissent, elles doivent être identifiées :

#### 1-Aspect macroscopique sur milieu de Lowenstein Jensen (L-J) :

Les colonies des mycobactéries de la tuberculose ne sont pas pigmentées.

-*M.tuberculosis* : colonies rugueuses en « chou fleur » : croissance eugonique.

-*M.bovis* : colonies lisses, petites et fines : croissance dysgonique.

-*M.africanum* : colonies rugueuses, plates avec bourgeon central. «Aspect en tache de bougie » : croissance dysgonique.

#### 2-Caractères biochimiques : niacine test, nitrate réductase, catalase à 22°C et 68°C.

3-Culture sur L-J contenant des inhibiteurs : acide thiophène 2 carboxylique (TCH), acide para-amino-salicylique (PAS), D-cyclosérine (CS), Pyrazinamide (PZA).

Mycobactérie	Délai de culture	Niacine	Nitrate réductase	Catalase 22°	Catalase 68°	TCH	PAS	CS	PZA
BK	15-28j	+	+	+	-	R	S	S	S
M.africanum	60-90j	V	V	+	-	V	S	S	S
M.bovis	20-40j	-	-	+	-	S	S	S	R/S
M.atypique	V	-	V	+	+	V	R	V	

V : variable ; S : sensible ; R : résistant

#### **V- Etude de la sensibilité aux antibiotiques :**

-Indiqué en cas : de suspicion de résistance (échec thérapeutique), d'interruption du traitement, de rechute, de notion de contagé avec un cas de tuberculose multirésistante.

-Pour déterminer la résistance d'une souche bacillaire aux antibiotiques, la méthode classique utilisée est la « méthode des proportions ». C'est une technique de référence qui permet de déterminer la proportion de bacilles capables de cultiver en présence d'antibiotiques à une concentration donnée.

-Elle consiste à ensemencer une quantité connue d'une souche de M.tuberculosis sur des milieux de culture (L-J) incorporés d'antibiotiques et des milieux sans antibiotiques. Après incubation, le nombre de colonies est soigneusement compté sur les tubes témoins et les tubes avec antibiotiques. On déduira ensuite la proportion (N) de bacilles résistants existant dans la souche étudiée.

En dessous d'une certaine proportion, dite « proportion critique », la souche est dite sensible. Au-delà elle est dite résistante.

La proportion critique est de 1% pour la majorité des antituberculeux.

$$N(\%) = \frac{\text{Nombre de colonies sur milieu+ATB}}{\text{Nombre de colonies sur milieu témoin}}$$

#### **On distingue :**

-L'antibiogramme indirect : les résultats ne peuvent être obtenus qu'après 2 à 3 mois après le prélèvement.

-L'antibiogramme direct : se fait directement sur le prélèvement, s'il est très riche en bacilles. Les résultats sont alors disponibles en 4 à 6 semaines.

### **VI-Méthodes de biologie moléculaire :**

Elles permettent :

- La détection directe des mycobactéries dans les prélèvements par PCR. La sensibilité est supérieure à 95% si l'examen direct est positif, mais elle n'est que de 60-70 % s'il est négatif. Elle ne permet pas d'exclure une tuberculose en cas de test négatif. L'avantage est la rapidité de détection de l'agent pathogène (quelques heures).
- L'identification des mycobactéries : elle utilise des techniques d'hybridation direct ou après PCR.
- La détection de la résistance aux antibiotiques : mise en évidence par PCR en temps réel des mutations responsables de la résistance à la RIF.