

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 tuberculosus, 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, 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 endo-bronchique
- 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 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.

Le produit pathologique examiné doit contenir au moins 10 000 bacilles/ml pour être positif à l'examen microscopique. C'est pourquoi dans les tuberculoses extra-pulmonaires (paucibacillaires), 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 : à la fuchsine

-Décoloration : l'acide sulfurique (H₂SO₄) dilué au 1/4 et par l'alcool à 95°.

-Contre coloration : au 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).

Les BAAR se trouvant sur 100 champs microscopiques (environ une longueur) seront comptés.

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 Prélèvement à refaire douteuse
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 est, la facilité et la rapidité de la lecture, pour la coloration à l'auramine

III-CULTURE :

La culture est le moyen le plus fiable de faire le diagnostic de la tuberculose

Elle permet de pratiquer un test de sensibilité aux antibiotiques.

Milieus solides :

Le milieu de Löwenstein-Jensen (LJ), milieu à l'œuf, est le milieu de référence.

Le milieu de coletsos favorise la culture de *M.bovis* et *M.africanum* .

Milieus liquides :

Le milieu MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) permet de détecter les bacilles en 8 à 14 jours.

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.

Ensemencement :

Le culot de centrifugation est ensemencé dans au moins deux tubes contenant un milieu de culture (Loewenstein-Jensen). Dans le cas de lésions fermées (ou lors d'interventions chirurgicales), le prélèvement doit se faire avec la plus grande asepsie et être ensemencé directement sur le milieu de culture sans décontamination.

Mise à l'étuve : Les tubes ensemencés sont placés dans une étuve à 37°C pendant 4 à 12 semaines. Les mycobactéries tuberculeuses poussant très lentement donneront des colonies visibles à l'œil nu après au moins 3 semaines d'incubation.

Lecture : Au bout de 28 jours, on observe à l'œil nu les colonies, à la surface du milieu de culture.

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	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 grâce à : leur aspect macroscopique, leur réponse à des tests biochimiques ainsi que leur culture sur L-J contenant différents inhibiteurs (P.nitrobenzoate (PNB), Hydroxylamine (HYD), Acide thiophène 2 carboxylique (TCH), D-cyclosérine (CS), Pyrazinamide (PZA)).

MYCOBACTÉRIES	Délai de culture	Niacine	Nitrate reductase	CATALASE 22°	CATALASE 68°	PNB	CS	PZA	TCH
BK	15-28j	+	+	+	-	S	S	S	R
Africanum	60-90j	V	V	-	-	S	S	S	V
Bovis	20-40j	-	-	+	-	S	S	R / S	S
BCG	15-28j	-	-	+	-	S	R	R	S
Atypiques	V	-	V	+	+	R	V	V	V

V : variable ; S : sensible ; R : resistant

V- L'étude de la sensibilité aux antibiotiques :

Pour déterminer la résistance d'une souche bacillaire aux antibiotiques, la méthode classique utilisée est la « méthode des proportions », elle détermine la proportion de bacilles capables de cultiver en présence d'antibiotiques, à une concentration donnée (1% pour la majorité des antibiotiques).

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

$N > \% \text{ critique} \rightarrow$ souche R

$N < \% \text{ critique} \rightarrow$ souche S

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.

Les tests de sensibilité sont des techniques délicates, de coût élevé et fournissent des résultats tardifs. Ils ne sont pas utiles en routine pour conduire le traitement des malades.

VI-Nouvelles méthodes de diagnostic de la tuberculose :

Elles permettent :

*La détection directe des mycobactéries dans les prélèvements par PCR en temps réel ou Génotypage direct.

*L'identification des mycobactéries :

-Elle peut se faire sur prélèvement à microscopie positive et sur culture;

-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. Le résultat est obtenu en 2h.

Ces techniques, nécessitent un équipement sophistiqué et coûteux. L'examen microscopique direct et la méthode classique de culture sur milieu solide sont actuellement les méthodes les plus utilisées pour le diagnostic de la tuberculose.