

Annexe 1

LE DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE DE LA TUBERCULOSE

1. RAPPELS SUCCINCTS

- **La mise en évidence du bacille tuberculeux en microscopie et/ou en culture** est le critère essentiel du diagnostic de certitude de la tuberculose qu'elle soit pulmonaire ou extra-pulmonaire.
- **Les mycobactéries**
Le bacille de la tuberculose est une mycobactérie.
Les mycobactéries sont caractérisées par leur aptitude à ne pas être décolorées par les acides dilués et l'alcool, après avoir été colorées par la fuchsine.
Elles sont dites acido-alcoolo-résistantes
L'acido-alcoolo-résistance est un caractère tinctorial utilisé en microscopie après coloration de Ziehl Neelsen pour poser le diagnostic positif de la tuberculose.
- **La transmission du bacille tuberculeux**
Un malade tuberculeux pulmonaire à microscopie positive transmet le bacille de la tuberculose (Bacille de Koch) à un autre sujet essentiellement par voie aérienne, lorsqu'il tousse ou après un éternuement.

2. LE DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE PULMONAIRE : LES PRELEVEMENTS

2.1. L'expectoration

Les crachats sont les prélèvements les plus fréquemment reçus au laboratoire.

Chez un malade suspect de tuberculose pulmonaire il convient, chaque fois que possible, de faire trois (3) prélèvements selon les modalités suivantes :

Après la consultation, le premier échantillon (appelé spot specimen) est recueilli sous la supervision de l'infirmier dans un crachoir rigide, à ouverture large, avec un couvercle à vis, fermant hermétiquement.

L'infirmier doit expliquer au malade que l'expectoration doit se faire après un effort de toux profond et vigoureux afin de ramener des mucosités bronchiques.

Il doit confier un deuxième crachoir au malade et lui demander de recueillir un deuxième prélèvement durant la nuit ou le matin au réveil (overnight ou collection specimen) et de le ramener le plus rapidement possible au laboratoire.

Lorsque le malade revient un troisième prélèvement peut être fait sur place (spot specimen).

Le risque de contamination est considérable lorsque le malade tousse, aussi le prélèvement doit être effectué à l'extérieur ou dans une pièce isolée, devant une fenêtre ouverte et loin de toute autre personne

2.2. Le tubage gastrique

La tuberculose de l'enfant est pauci-bacillaire et la mise en évidence du bacille tuberculeux est rarement obtenue.

Les enfants de moins de 12 ans sont habituellement incapables d'expectorer volontairement.

Des tubages gastriques pour le recueil des sécrétions bronchiques dégluties durant la nuit sont nécessaires pour la recherche et l'isolement du bacille tuberculeux par l'examen direct et la culture.

Cet examen nécessite une courte hospitalisation de l'enfant.

Technique

Le matériel se résume à une sonde nasogastrique à usage unique et à une seringue de 10 ou 20 ml à usage unique.

La mise en place de la sonde naso-gastrique obéit à la même technique que pour le gavage et elle se pratique au lit du malade, avant le lever, enfant à jeun. :

En prenant comme repère la distance nez - ombilic, on introduit doucement la sonde par voie nasale en demandant à l'enfant de respirer calmement,

On s'assure que la sonde est bien dans l'estomac par l'épreuve à la seringue (injection de 10 ml d'air en auscultant l'épigastre),

On aspire à l'aide de la seringue une quantité suffisante (5 à 10 ml) de liquide gastrique.

Si le volume des sécrétions recueillies est insuffisant, on peut injecter 10 ml de sérum physiologique puis le ré-aspirer.

Le contenu du liquide gastrique recueilli est alors versé dans un tube à vis stérile pour être adressé au laboratoire de bactériologie.

Il faut généralement pratiquer une série de 3 tubages gastriques à raison de un tubage par jour pour assurer le diagnostic. .

3. TECHNIQUE DE L'EXAMEN MICROSCOPIQUE

3.1. Confection du frottis à partir d'un crachat :

Le frottis se fait obligatoirement sur une lame neuve, préalablement dégraissée et séchée. Le numéro attribué au malade sur le registre du laboratoire doit être inscrit à une extrémité de la lame.

A partir du prélèvement, on choisit une parcelle muco-purulente ou hémorragique que l'on étale sur la lame, à l'aide d'une anse de platine

L'étalement se fait par mouvements circulaires sur environ 3 cm de long et 2 cm de large. Le frottis doit être séché à l'air.

3.2. Fixation du frottis :

La fixation du frottis se fait à la chaleur, par 3 à 4 passages rapides de la lame au dessus d'une flamme d'un bec Bunsen ou d'une lampe à alcool.

3.3. Coloration de Ziehl Neelsen

Coloration :

Placer la lame sur un support en verre ou en métal et la recouvrir de fuchsine phéniquée de Ziehl filtrée.

A l'aide d'un coton monté sur une tige, trempé dans l'alcool et flambé, passer la flamme sous la lame recouverte de fuchsine et arrêter immédiatement de chauffer dès émission de vapeurs. Laisser agir trois minutes.

Chauffer une deuxième fois, puis une troisième fois, jusqu'à émission de vapeur en laissant agir à chaque fois pendant trois minutes.

Eviter l'ébullition et le dessèchement du colorant. Ajouter si besoin de la fuchsine au fur et à mesure.

A la fin du temps de coloration, rejeter la fuchsine et rincer la lame à l'eau du robinet en évitant de ne pas détacher le frottis (par un jet du robinet trop fort par exemple).

Décoloration :

Recouvrir la lame d'acide sulfurique dilué au quart. Laisser agir pendant trois minutes.

Rincer la lame de la même manière que précédemment.

Recouvrir la lame avec de l'alcool à 95° pendant 5 minutes.

Rincer à nouveau. Le frottis est alors légèrement teinté de rose ou incolore.

N.B. : En cas de nécessité le temps de décoloration à l'alcool peut être supprimé et remplacé par une deuxième décoloration à l'acide (1 mn).

Contre coloration :

Recouvrir la lame de bleu de méthylène. Laisser agir pendant 30 secondes à 1 mn.

Rincer et sécher à l'air.

4. LECTURE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

La lecture se fait au microscope ordinaire à lumière blanche, à l'aide d'un objectif (x 100) à immersion. Les bacilles acidoalcoolo-résistants (B.A.A.R.) vont apparaître en rose - rouge sur un fond légèrement bleuté.

4.1. Mise au point :

Avant de pratiquer la mise au point, déposer une goutte d'huile à immersion sur la préparation.

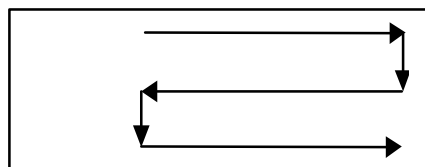
Amener l'objectif au contact de la goutte d'huile de façon à obtenir une image nette. La surface observée alors représente un champ microscopique.

4.2. Lecture en créneau

Le frottis doit être lu sur toute sa longueur, ce qui correspond à 100 champs microscopiques. On note le nombre de bacilles (bâtonnets rouges) qui sont décelés.

- Si aucun bacille n'est découvert sur 100 champs, on décale le chariot du microscope d'un cran vers l'avant ou vers l'arrière pour lire en sens inverse la ligne suivante (lecture en créneau) et ainsi de suite jusqu'à parcourir 3 longueurs de lame ou 300 champs microscopiques. .
- Si 1 à 9 bacilles sont découverts sur 300 champs, on note le nombre exact de bacilles découverts et on déclare le résultat douteux (\pm), Examen à refaire.
- Si 1 à 99 bacilles sont découverts sur 100 champs, on note le nombre exact de bacilles découverts et on déclare le résultat positif à (1+). Si on découvre moins de 10 BAAR sur les 100 premiers champs, on poursuit la lecture jusqu'à 300 champs.
- Si plus de 1 bacille est découvert sur 1 champ, on poursuit la lecture de 10 champs et on note le nombre moyen de bacilles découverts par champ microscopique. (2+).
- Si plus de 10 bacilles sont découverts sur 1 champ, on poursuit la lecture de 10 champs et on note le nombre moyen des bacilles découverts par champ (3+)

Lecture en créneau de la lame



4.3. Expression des résultats

Cinq éventualités peuvent se présenter lors de la lecture des lames :

Lame négative :

0 bacille sur 300 champs :

Inscrire : 0 BAAR / 300 champs (0)

Lame douteuse :

1 à 9 bacilles sur 300 champs ;

Exemple : 4 BAAR / 300 champs (±) Refaire l'examen

Lame faiblement positive

10 à 99 bacilles sur 100 champs ;

Exemple : 35 BAAR / 100 champs (1+), ou (+)

Lame moyennement positive :

1 à 10 bacilles par champ, (moyenne sur 10 champs)

Exemple : 6 BAAR / 1 champ (2+), ou (++)

Lame fortement positive :

>10 bacilles par champ, (moyenne sur 10 champs),

Exemple : 25 BAAR / 1 champ (3+), ou (+++)

5. LE DIAGNOSTIC DES TUBERCULOSES EXTRA-PULMONAIRES

Le diagnostic bactériologique des tuberculoses extra-pulmonaires se fait par la mise en culture des produits pathologiques sur milieu de Lowenstein-Jensen ou sur tout autre milieu approprié pour la culture des mycobactéries.

Les prélèvements provenant des localisations extra-pulmonaires de la tuberculose sont de deux types :

Les prélèvements pauci-microbiens qui proviennent de cavités fermées, et qui doivent être recueillis dans des tubes stériles, sous des conditions rigoureuses d'asepsie, pour éviter toute contamination extérieure.

C'est le cas :

- des liquides de ponction rachidienne, pleurale, péritonéale ou péricardique,
- du pus de ponction d'abcès fermés ou de ponction ganglionnaire,
- des biopsies chirurgicales qui doivent être déposées dans un tube stérile contenant une eau physiologique stérile.

Ces prélèvements doivent être adressés rapidement au laboratoire pour être ensemencés en l'état sur le milieu de culture.

L'ensemencement au lit du malade, à partir de l'aiguille de ponction est souhaitable lorsqu'il est possible.

Les prélèvements poly-microbiens, qui proviennent de lésions ouvertes doivent être recueillis dans un récipient stérile ou propre, fermé hermétiquement et adressés au laboratoire où ils feront l'objet d'un traitement particulier de décontamination.

Ces prélèvements sont constitués d'urine, de selles ou de pus d'abcès fistulisé ou de lésions superficielles muqueuses ou cutanées.

Les résultats de ces cultures ne peuvent être obtenus que tardivement, après 28 à 42 jours d'incubation.

6. LA FICHE DE RENSEIGNEMENTS

Tout prélèvement doit être accompagné d'une fiche de renseignement indiquant l'identité du malade, son âge et son adresse, la nature et la durée du traitement antituberculeux reçu éventuellement avant le prélèvement. Elle doit contenir le nom du médecin traitant et celui de la structure de prise en charge.

Tous les prélèvements sont enregistrés sur le registre du laboratoire réservé au dépistage de la tuberculose. Les cas positifs seront reportés sur un registre spécial de déclaration des cas de tuberculose (annexe 8).

7. LA CONSERVATION DES PRELEVEMENTS

Les prélèvements d'origine pulmonaire sont contaminés, quelles que soient les précautions prises pour les recueillir, par les germes qui pullulent normalement dans le rhino-pharynx et dans la bouche.

Lorsqu'il n'est pas possible d'examiner les prélèvements le jour même, ils doivent être conservés soit au froid, à + 4 degrés, (au maximum pendant 5 jours), soit à l'aide du bromure de cétyl-pyridinium à 10%, pour éviter la multiplication de ces germes qui risquent de nuire à la vitalité des bacilles.

8. LE TRANSPORT DES PRELEVEMENTS

Le transport doit être fait dans une glacière réservée à cet effet, contenant des «ice box » et des portoirs dans lesquels sont fixés les crachoirs, ou au moins dans une boîte contenant des portoirs, la durée du transport ne devant pas excéder trois heures dans ce cas.

Les crachoirs doivent être opaques, hermétiquement fermés et soigneusement étiquetés. L'étiquette doit porter le nom et prénom du malade et le numéro du dossier. Elle doit être collée sur le corps et jamais sur le couvercle du crachoir. Les pots de prélèvements sont placés dans la boîte qui sert à leur transport. Les fiches de renseignements de chaque prélèvement sont mises dans une enveloppe à part.