

NOTE TECHNIQUE.

Méthodes de recherche du bacille de Koch : selon Osol-Johansson et Hallberg

PAR

A. DUBOIS.

La recherche du bacille de Koch est de facilité fort variable selon la nature du cas clinique et de l'exsudat analysé. La même remarque vaut pour la lèpre où l'examen hyperpositif des cas lépromateux s'oppose aux recherches ardues et souvent négatives faites chez les cas N. En matière de tuberculose on a toujours comme ressource — outre la concentration — la culture ou l'inoculation au cobaye; le léprologue est moins heureux. Aussi c'est en songeant à la pratique léprologique que je veux attirer l'attention sur des méthodes de coloration dont le rendement paraît supérieur au Ziehl classique.

Les essais que j'en ai fait ou que j'ai conseillés à d'autres me paraissent en effet confirmer leur supériorité. Je n'essaierai pas de fixer numériquement celle-ci, ma statistique n'est pas très importante. Le Dr. De Raedt, à qui j'ai conseillé d'étudier la première de ces méthodes, et F. Wouters, qui a eu l'occasion aussi de l'appliquer, disposeront de statistiques plus étendues; l'un et l'autre m'ont affirmé la supériorité nette de la méthode de Osol sur la méthode classique (plusieurs fois supérieure). Personnellement, sur 18 comparaisons que j'ai faites, avec les mêmes produits, de l'Osol et du Ziehl, j'ai trouvé 14 fois l'Osol supérieur, parfois en proportions considérables : 415 : 110 —

98 : 5 — 110 : 6 et 4 fois assez modérément inférieure : 256 : 292 — 53 : 70. Le total des bacilles comptés dans ces 18 examens comparatifs donne Ziehl : 1545 ; Osol : 2526 (*). Sur 11 examens comparatifs Ziehl-Hallberg, ce dernier a toujours été supérieur ; le total étant Ziehl : 1009, Hallberg : 1487.

Parmi ces 11 examens, 9 ont compris les 3 méthodes et 4 fois le Hallberg a été supérieur (3 fois faiblement) à l'Osol. Les chiffres totaux étaient en ce cas : Ziehl 640, Osol 945, Hallberg 1030. J'ajouterai que 2 fois des frottis d'organes négatifs au Ziehl ont été positifs à l'Osol (tuberculose-bacille de Stephansky). Chez un lépreux L observé pendant la rédaction de cette note, le mucus nasal était fortement positif au Ziehl classique et au Hallberg et faiblement à l'Osol.

Technique. Méthode d'Osol. — Je la décris d'après deux travaux assez récents de Johansson (1) et de Egli (2). Les circonstances de guerre m'ont empêché de prendre connaissance du travail original de Osol (3) qui remonte déjà à 1927.

Le « referate » du travail d'Osol du *Zentralbl. f. Bakt.* (3) donne la technique suivante :

1. — Colorer les frottis à la fuchsine phéniquée en chauffant jusqu'à vapeur (2 minutes) et continuant à faire bouillir faiblement pendant 1 minute et demie en versant de la fuchsine en abondance.

2. — Laver à l'eau.

3. — Décolorer plusieurs fois à l'acide sulfurique à 10 % (*) pendant 1-15 secondes en lavant chaque fois à l'eau.

4. — Sécher au papier filtre prudemment.

5. — Décolorer avec sulfite de soude à 10 % 5 volumes, alcool 96° 1 volume.

6. — Sécher comme au n° 4.

L'auteur estime le rapport Osol : Ziehl à 151 %.

Johansson a introduit, au lieu du sulfite de soude alcoolique,

(*) On a ordinairement compté 20 champs microscopiques.

(*) Comme dans la plupart des ouvrages on n'indique pas s'il s'agit de poids ou de volume.

la solution d'ammoniaque et c'est elle que j'ai utilisée. Pour le dire en passant, Johansson formule sa solution sulfitée à l'inverse de celle indiquée ci-dessus, soit : 1 volume sulfite plus 4 volumes alcool.

Voici la technique de Egli que j'ai suivie à peu de chose près :

1. — Etalement très mince entre 2 lames (j'ai fait les étalements à l'anse ou par frottis d'organes et d'épaisseur ordinaire).
2. — Fixer et sécher plusieurs heures à l'air (ne paraît important que, si comme Osol, on fait des frottis épais).
3. — Colorer 3 fois par ébullition (aufkochen) à la fuchsine phéniquée.
4. — Décolorer à l'acide sulfurique à 5 p. c.
5. — Laver.
6. — Passer pendant 10-15 secondes la solution de sulfite ou de NH_3 . (solution commerciale ordinaire).

Egli examine les préparations au fond noir, ce que j'ai rarement fait.

On peut se demander à quoi tient le rendement meilleur de l'Osol. J'élimine immédiatement l'épaisseur des frottis. Egli fait des frottis très minces, j'en ai fait d'ordinaires. Inutile de dire que, pour comparer les méthodes, ils ont été faits aussi semblables que possible (en cas de produit fluide, étaler une goutte sur une surface déterminée). Cependant, il paraît raisonnable d'attribuer une certaine valeur à l'épaisseur du frottis. En matière de lèpre, la question ne se pose guère..., les petites quantités de suc dermique prélevées ne peuvent faire qu'une couche mince.

J'élimine aussi le rôle du fond noir conseillé par Egli. Je n'y ai pas vu d'avantage. Débutant, j'étais un peu surpris par ces bacilles brillants sur le fond noir et j'ouvrais fréquemment le diaphragme de mon objectif à immersion de façon à voir la couleur rouge. Je n'ai pas vu, à cette occasion, disparaître des bacilles ou en apparaître en rétablissant le fond noir.

Pour l'Afrique, le fond noir compliquerait inutilement la

recherche faite d'éclairage convenable en bien des cas. Restent alors comme facteurs : la chaleur, l'ammoniaque et l'absence de coloration de contraste. Le premier me paraît jouer un rôle incontestable. L'ébullition est déconseillée par les classiques. Il semble qu'il n'y ait pas lieu d'être inquiet à ce sujet. L'expérience de la fabrication de la lépromine montre que le bacille de Hansen reste acido-résistant après ébullition durant 20 minutes. Il m'est difficile, cependant, d'affirmer que l'ébullition soit plus effective que des chauffages plus modérés.

Quant à l'ammoniaque (ou au sulfite), elle recolore probablement des bacilles décolorés par l'acide.

L'absence de colorant de contraste aurait aussi une certaine utilité et, en particulier, est nécessaire en cas de frottis épais (Osol type).

Le bacille tuberculeux n'est pas aussi indifférent aux colorants usuels de bactériologie qu'on le dit classiquement et il ne m'étonnerait pas que certains bacilles soient parfois surcolorés par le Bleu du Ziehl classique, bien que celui-ci soit du bleu simple non mordancé.

A première vue, il apparaît comme facile de déterminer numériquement la valeur de ces facteurs : quoi de plus simple que de faire un Osol sans NH_3 ou un Ziehl sans bleu, etc., et de comparer aux préparations-contrôles.

En réalité, les variations statistiques sont telles qu'il faudrait compter un très grand nombre de champs pour avoir des résultats très valables. Aussi, jusqu'à nouvelle étude, je m'abstiendrai de déclarer que tel ou tel point de la technique d'Osol est essentiel.

Ajoutons que la méthode d'Osol ne s'applique pas aux coupes, au moins avec l'ammoniaque.

Je crains que le manque de colorant de contraste ne rende parfois difficile la mise au point, dans le cas de frottis où il y aura très peu d'exsudat (lèpre par exemple). En ce cas, le fond noir serait plus aisé.

Technique de Hallberg. — J'ai suivi la description non de l'auteur, dont je n'ai pu lire le travail (4), mais de Dissman (5),

dû reste identique à celle indiquée dans le « Bulletin de l'Institut Pasteur » (4).

Réactifs. — A. — Solution saturée de Nachtblau Grübler dans l'alcool éthylique à 95° (5 gr. dans 100 c.c.).

B. — Eau 100 c.c.
KOH 10 % 0,2 c.c.
Phénol liquéfié 2,5 c.c. (*)

Ces deux solutions — inaltérables au contraire du produit final qui s'altère en quelques jours — sont, au moment du besoin, mélangées dans la proportion de 1 volume A et 10 volumes B.

C. — Acide chlorhydrique à 25 % 3 c.c. (**)
Alcool éthylique à 70° 100 c.c.

D. — Colorant de fond rouge ou brun.

Coloration. — 1. — Les frottis fixés (à la chaleur) sont couverts de la solution A + B et chauffés doucement jusqu'à l'ébullition (aufkochen selon Dissman), laissés 5 minutes et égouttés.

2. — Décoloration (rapide) à l'alcool acide C jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de nuages bleus (en fait, la préparation est à peu près incolore. (Faire cette opération en 2 ou 3 fois quelques secondes).

3. — Laver.

4. — Colorer soit au Brun Bismarck à 2 % aq. 5-10 secondes, soit à la fuchsine phéniquée diluée 1/10 1 à 2 minutes, soit avec d'autres colorants rouges. Personnellement, j'ai utilisé la fuchsine. Les bacilles sont bleu sombre ou franc sur fond rouge.

La méthode de Hallberg s'applique sans difficulté aux coupes. Je n'ose affirmer ici sa supériorité, cependant — encore une fois, sans en tirer un argument décisif — la méthode n'a montré des bacilles dans des coupes d'organe (tuberculose) où le Ziehl avait été négatif.

(*) J'ignore s'il s'agit de Phénol cristallisé liquéfié à la chaleur ou du Phénol liquéfié de la Pharmacopée (PH. B. IV). L'erreur ne dépasse pas 10 %.

(**) J'ai utilisé acide ordinaire dilué 1 vol. plus 3 vol.

J'ai utilisé pour les coupes, comme colorant de contraste, soit la fuchsine phéniquée diluée 1/10, soit mieux, la safranine anilinée.

En relation avec les colorations d'acido-résistants, je crois utile de rappeler les travaux de Pooman (6). Cet auteur a constaté — et j'ai vérifié ce fait — qu'une rapide coloration de bacilles de Koch ou de Hansen au Ziehl laisse la plupart des bacilles incolores (en négatif). Si maintenant on verse sur la préparation (plus exactement sur une similaire) un peu d'acide dilué ou d'alcool (même de l'eau à une certaine action), on voit beaucoup de bacilles se colorer en rouge et le fond se décolorer. Pour Pooman, les bacilles sont acidophiles ou acidopositifs. Il croit que les bacilles contiennent des substances — acides selon lui — qui transforment la fuchsine en leucodérivé et le rôle des acides dilués ou de l'alcool serait de faire à nouveau apparaître le colorant.

A dire vrai, cette explication paraît assez problématique, mais le fait même est exact.

Pooman indique la technique suivante.

1. — Colorer à la fuchsine phéniquée 1 minute.
2. — Court lavage à l'eau.
3. — Traiter par une solution de Bleu de Méthylène à 1 % dans l'alcool pendant 20 secondes, si le fond, après lavage, n'apparaît pas assez bleu, remettre de la solution de bleu 5-10 secondes.
4. — Court lavage. Dessécher en agitant dans la flamme sans user du papier filtre.

L'auteur a aussi indiqué (6 b) une méthode s'appliquant aux coupes dont je n'ai pas l'expérience.

Ces constatations de Pooman rappellent celles de Maciel (cfr. Langeron 7) de 1927.

En terminant, il paraît intéressant de signaler la méthode de culture de Kirchner que j'ai citée dans un travail précédent (8). Cette méthode m'a fréquemment permis d'isoler des souches, soit en partant de crachats passés à l'acide sulfurique, soit en

partant de produits stériles comme le liquide rachidien, soit parfois par hémoculture de cobayes.

Sùla (9), dans un travail récent, en a signalé la valeur par comparaison avec le Lœwenstein.

En cas de culture positive, on a l'attention assez rapidement attirée par de petits grains blancs composés entièrement de BK. Au microscope, l'aspect en torsade de ces petits grumeaux est caractéristique du développement (fig. 1).

BIBLIOGRAPHIE.

1. A. Johansson, Die Grundlagen einiger Bakterienfärbungen. *Ztbl. f. Bakt.*, 1938, vol. 141, p. 424.
 2. H. Egli, Der Nachweis von Tuberkelbazillen im direkt Austrich gefärbt nach Osol, betrachtet im Dunkelfeld als Methode der Wahl. *Schweiz. Med. Woch.*, 1942, n° 6, p. 166.
 3. A. Osol, Tuberkelbazillenfärbung in dicken Austrich. *Deut. Med. Woch.*, 1927, S. 1002 (cité d'après *Zentrbl. Bakt.*, 1927-28, vol. 88, p. 64).
 4. Hallberg, A new method for staining tubercle bacilli. *Acta Med. Scand.*, 1941, t. 108, p. 12 (d'après *Bull. Inst. Past.*, 1944, vol. 42, p. 66).
 5. Dissman, Erfahrungen mit der Karbolnachtsblaufärbung der Tuberkelbacillen nach Hallberg. *Zentralbl. f. Bakt.*, 1943, t. 150, p. 268.
 6. Pooman :
 - a) Eine einfache Methode zur Färbung von Lepraerregern u. Tuberkelbazillen. *Arch. f. Schiffs u. Trop. Hyg.*, 1936, vol. 40, p. 112.
 - b) Weitere Erfahrungen bei der Färbung von Lepra u. Tuberkelbazillen. *Ibidem*, p. 563.
 7. Langeron, Précis de Microscopie, Paris, 1942, p. 1202.
 8. A. Dubois, Action inhibante de dérivés chaulmoogriques sur la culture en milieu liquide du bacille tuberculeux aviaire. *Ann. Soc. B. Méd. Trop.*, 1944, t. 24, p. 1.
 9. L. Sùla, Der Nachweis der Tuberkelbazillen in der Tiefenkultur im flüssigen Nährboden nach Kirchner. *Zentrbl. f. Bakt.*, 1943, vol. 151, p. 39.
-



Culture des bacilles de Koch dans le fond du milieu de Kirchner.
Coloration de Ziehl.