

EVALUATION DE LA METHODE BACTERIOLOGIQUE DANS LE DIAGNOSTIC DE LA DREPANOCYTOSE

KAIMBA C.L.¹, KANTE O.¹, NIANG B.¹, BADJI J.A.²

RESUME

Objectif : L'objectif principal de ce travail était de procéder à l'évaluation du test bactériologique dans le diagnostic de la drépanocytose en utilisant des souches d'entérobactéries.

Matériel et méthodes: il s'agit de l'évaluation d'un test de diagnostic qualitatif par rapport à un test de référence qui s'est déroulé au laboratoire de diagnostic de biologie médicale du Centre Hospitalier Régional de Ziguinchor du 1er au 31 Juillet 2015. Tous les patients âgés d'au moins 6 mois à qui un test d'Emmel a été prescrit, ont été retenus pour l'étude. Sur chaque prélèvement, un test de falciformation par la méthode au métabisulfite de sodium à 2% et par la méthode bactériologique ont été réalisés.

Résultats : Cinquante (50) prélèvements ont été retenus pour l'étude et trois souches d'entérobactéries ont été testées. Il s'agit de *Citrobacter sp*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. Les résultats de l'évaluation du test bactériologique ont donné 100% pour la spécificité et 100% pour la sensibilité. De ces paramètres, on déduit un taux de faux négatifs égal à 0, un taux de faux positifs égal à 0, une valeur prédictive positive du test égale à 1 et une valeur prédictive négative aussi égale à 1.

Conclusions : Ces résultats montrent que ce test bactériologique de falciformation peut être utilisé comme alternative ou test de substitution à la méthode au métabisulfite de sodium dans le diagnostic de la drépanocytose dans les laboratoires polyvalents qui font la culture des bactéries et isolent régulièrement les entérobactéries.

Mots-clés : Drépanocytose, Test d'Emmel, Falciformation bactériologique des hématies

ABSTRACT

EVALUATION OF THE BACTERIOLOGICAL METHOD IN SICKLE CELL ANEMIA DIAGNOSIS

Objective: The main objective of the present study is to evaluate the bacteriological test in the diagnosis of sickle cell disease using enterobacteria strains.

Materials and methods: the objective of this study is to evaluate a qualitative diagnostic test compared to a reference test which was conducted in the diagnostic laboratory of medical biology of the Regional Hospital Center of Ziguinchor from 1 to 31 July 2015. All patients aged at least 6 months to whom an Emmel test was prescribed were retained for the study. On each sample, a sickling test was performed using the 2% sodium metabisulphite method and the bacteriological method.

Results : Fifty (50) samples were retained for the study and three enterobacteriaceae strains were tested. These include *Citrobacter sp*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. The results of the bacteriological test gave 100% for specificity and 100% for sensitivity. From these parameters, a false negative rate equal to 0, a false positive rate equal to 0, a positive predictive value of the test equal to 1 and a negative predictive value also equal to 1 are deduced.

Conclusion : These results show that this bacteriological sickling test can be used as an alternative or substitution test to the sodium metabisulphite method in the diagnosis of sickle cell disease in multi-purpose laboratories that culture bacteria and regularly isolate enterobacteriaceae.

Keywords: Sickle cell anemia, Emmel test, Bacteriological sickling erythrocytes

1. Centre Hospitalier Régional de Ziguinchor

Auteur correspondant : Docteur Cyriaque Lucien KAIMBA, Biologiste Hôpital Régional de Ziguinchor BP 705, HLM-Biagui 1, Villa N°29, Tél. : +221777232075, Email : kacyr67@yahoo.fr

INTRODUCTION

L'hémoglobine S est couramment recherchée au laboratoire pour le diagnostic de la drépanocytose. La technique utilisée en routine et en première intention pour mettre en évidence cette hémoglobine S sans tenir compte du caractère homozygote (HbS/HbS) ou hétérozygote (HbA/HbS) est le test d'Emmel au métabisulfite de sodium à 2 % [1,2] qui est indiqué pour des sujets âgés d'au moins 6 mois. Avant cet âge, le fort taux d'hémoglobine fœtal (HbF) inhibe la falciformation et conduit à de faux résultats négatifs. La différenciation entre homozygote et hétérozygote se fait par électrophorèse de l'hémoglobine ou par isofocalisation [1,3] le plus souvent. L'alternative au test d'Emmel au métabisulfite de sodium qui est un test rapide donnant des résultats au bout de trente minutes, est jusque-là la méthode des 24 heures sans métabisulfite de sodium.

Après des faux résultats négatifs observés chez des patients drépanocytaires connus suite à une mauvaise préparation de la solution de métabisulfite de sodium ou suite à une détérioration de la poudre utilisée pour la préparation de la solution, notre laboratoire était obligé après quelques temps sans faire le test d'Emmel de recourir à la méthode de détermination de l'hémoglobine S sans métabisulfite de sodium sur 24 heures [2].

La détermination de l'hémoglobine S pouvant être une urgence dans la prise en charge thérapeutique des douleurs dans les crises de la drépanocytose en plus de l'anémie chez les sujets homozygotes [4-6], il est alors nécessaire de trouver un moyen alternatif de diagnostic rapide dans le cas où la méthode au métabisulfite de sodium serait indisponible. La méthode bactériologique pourrait-elle ainsi être une alternative à la méthode biochimique au métabisulfite de sodium à 2% ? C'est pour répondre à cette question que nous avons décidé d'évaluer la méthode bactériologique de falciformation évoquée par le Laboratoire Biologie Tropicale (Bioltrop) sur son site en la date du 20 Janvier 2015 [2] en vue de l'utiliser en routine.

L'évaluation de cette méthode avec des résultats concluants permettra de contourner les problèmes de réactif mal préparé ou détérioré qui entraînent des résultats faussement négatifs. Elle permettra également de palier aux problèmes de rupture éventuelle et de coût de réactif. Enfin, elle permettra d'avoir une alternative au test au métabisulfite de sodium à 2% pour le diagnostic rapide et en routine de l'hémoglobine S.

L'objectif principal de ce travail est de procéder à l'évaluation de la méthode bactériologique dans le diagnostic de la drépanocytose en utilisant des souches d'entérobactéries isolées après culture. L'objectif secondaire de ce travail est de valider le mode opératoire utilisé au cours de l'évaluation en vue de

son utilisation en routine.

Afin atteindre les objectifs, nous allons procéder à la détermination de la sensibilité et de la spécificité du test bactériologique par rapport au test biochimique au métabisulfite de sodium à 2%. La méthode au métabisulfite de sodium à 2% est choisie comme étant la méthode de référence. De la sensibilité et de la spécificité du test bactériologique, on pourra déduire le taux de faux positifs, le taux de faux négatifs, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative de ce test bactériologique.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Matériel

L'étude s'est déroulée à l'hôpital Régional de Ziguinchor et a duré un mois (1er au 31 Juillet 2015). Il s'agit de l'évaluation d'une méthode de diagnostic qualitatif par rapport à une méthode de référence. La méthode à évaluer est la méthode bactériologique pour le diagnostic de la drépanocytose (mise en évidence de l'HbS) et la méthode de référence est la méthode au métabisulfite de sodium à 2%.

Les patients âgés d'au moins six mois sans distinction de sexes, sont des malades hospitalisés ou suivis à titre externes et à qui un test d'Emmel est prescrit. Les enfants de moins de six mois qui ont encore un taux d'hémoglobine fœtale élevé inhibant la falciformation pour donner des résultats faussement négatifs sont exclus de l'étude.

Comme type d'échantillons, nous avons utilisé du sang total prélevé sur EDTA (anticoagulant).

Plusieurs souches d'entérobactéries en fonction de celles qui seront isolées dans le laboratoire vont être utilisées au cours de cette évaluation. Une fois isolées, ces souches vont être entretenues par repiquage tous les deux jours sur milieu Müller-Hinton.

Matériel de laboratoire utilisé comprend :

- Microscope avec objectif X 40
- Lames et lamelles
- Solution de métabisulfite de Na à 2%
- Eau distillée
- Souches bactériennes
- Densitomètre
- Eau physiologique
- Tubes à essai
- Etuve à 37°C
- Pipette de 1000 µl, de 10 à 100 µl
- Tube de prélèvement contenant l'EDTA comme anticoagulant
- Gants
- Mouchoirs en papier

1.2. Méthodes

1.2.1. La méthode de référence au métabisulfite de sodium à 2% [1,2]

1.2.1.1. Principe

Ce principe exploite le pouvoir réducteur du métabisulfite sur les hématies contenant l'hémoglobine S. Il consiste à provoquer entre lame et lamelle de microscope la désoxygénation (réduction) totale de l'échantillon de sang à examiner : l'hémoglobine S se polymérise alors sous forme de cristaux insolubles allongés qui déforment des hématies. Cette déformation est facilement observable au microscope, grossissement x 40.

1.2.1.2. Mode opératoire

- Mettre une très petite goutte de sang (environ 5 µl) sur une lame
- Juste à côté ou dessus, mettre une goutte environ 4 fois plus grosse (environ 20 µl) de réactif
- Mélanger rapidement mais soigneusement
- Aspirer environ la moitié du liquide
- Couvrir rapidement d'une lamelle sans faire de bulles d'air
- Laisser reposer 30 minutes
- Rechercher la falciformation au microscope, objectif X 40.

NB : il faut préparer la solution de métabisulfite de sodium extemporanément et manipuler par série.

1.2.2. Méthode bactériologique [1,7]

1.2.2.1. Principe

Ce principe exploite le pouvoir réducteur des entérobactéries sur les hématies contenant l'hémoglobine S. Il consiste à provoquer entre lame et lamelle de microscope la désoxygénation (réduction) totale de l'échantillon de sang à examiner : l'hémoglobine S se polymérise alors sous forme de cristaux insolubles allongés qui déforment les hématies. Cette déformation est facilement observable au microscope, grossissement X 40.

1.2.2.2. Mode opératoire

- Avec une pipette prélever et déposer dans un tube à essai propre et sec 120µl de l'émulsion bactérienne
- Avec une pipette, prélever et déposer sur les 120µl d'émulsion bactérienne 20µl de sang total bien homogénéisé prélevé sur EDTA (dilution au 1/7ème)
- Agiter soigneusement le mélange
- Prélever et déposer 20µl du mélange sur une lame
- Recouvrir de lamelle sans faire de bulle d'air (très important)
- Aspirer le surplus de liquide débordant avec un

mouchoir en papier (type Cleanex*)

- Laisser reposer la préparation sur une surface plane au moins 30 mn
- Lire au microscope au grossissement X 40 à la recherche des hématies falciformes (lire en plusieurs endroits : au centre, sur les bords !)

NB : commencer la manipulation par la préparation de l'émulsion bactérienne.

L'émulsion bactérienne est préparée extemporanément de la manière suivante : dans un tube à essai, préparer dans de l'eau physiologique une émulsion dense de souche d'entérobactérie isolée après culture (densité comprise entre 5 et 15McF). A défaut du densitomètre, il faut s'assurer visuellement du caractère dense (lactescent) de l'émulsion. Après usage, les solutions bactériennes doivent être éliminées. Réaliser comme dans le test au métabisulfite de sodium des analyses par séries. Les bactéries présentes dans l'émulsion peuvent mourir après un certain temps passé sur la paillasse. Ces bactéries perdent ainsi leurs propriétés réductrices conduisant à de faux résultats négatifs. Il en est de même pour les souches bactériennes non repiquées depuis plus de 48 heures. Il faut utiliser un sang témoin positif (sang d'un malade drépanocytaire connu testé au même moment que les prélèvements).

1.2.3. Détermination de la sensibilité et de la spécificité [8]

La sensibilité est définie comme étant le rapport du nombre de malades positifs au test bactériologique sur le nombre de malades positifs au test biochimique au métabisulfite de sodium à 2%.

La spécificité est définie comme étant le rapport du nombre de patients négatifs au test bactériologique sur le nombre de patients négatifs au test biochimique au métabisulfite de sodium à 2%.

Valeur prédictive positive est donnée par le rapport des vrais positifs (donnés par test référence) sur l'ensemble des tests positifs (donnés par le test à évaluer).

Valeur prédictive négative est donnée par le rapport des vrais négatifs (donnés par test référence) sur l'ensemble des tests négatifs (donnés par le test à évaluer).

Taux de faux positifs est donné par le rapport du nombre de malades négatifs au test de référence et positif au test à évaluer sur le nombre total de patients négatifs au test de référence.

Taux de faux négatifs est donné par le rapport du nombre de malades positifs au test de référence et négatif au test à évaluer sur le nombre total de patients positifs au test de référence.

2. RESULTATS ATTENDUS [1,2]

- Le test est négatif si les hématies conservent leur forme ronde.
- Le test est positif si les hématies prennent progressivement une forme de faucille, de feuilles de houx, de banane aux extrémités pointues, souvent dentelées.

NB : Un sujet sain possède moins de 1 % de cellules falciformes.

3. RESULTATS OBTENUS

3.1. Evaluation de la méthode bactériologique

- Nombres de souches bactériennes testées : au cours de l'étude, trois souches d'entérobactéries ont été simultanément utilisées. Il s'agit de Citrobacter sp, Escherichia coli et Klebsiella pneumoniae.

Tableau I : récapitulatif des résultats obtenus

Nombre de prélèvements Testés	Nombre de cas de TE positif	Nombre de cas de TB positif	Nombre de cas de TE négatif	Nombre de cas de TB négatif
50	7	7	43	43

TE= test d'Emmel ; TB= test bactériologique

NB : Les mêmes malades qui sont positifs au test bactériologique pour chacune des trois souches sont les mêmes qui sont positifs au test avec le métabisulfite de sodium. Aussi, les malades négatifs à la méthode bactériologique pour chacune des trois souches utilisées sont les mêmes qui sont négatifs à la méthode au métabisulfite de Na.

Du tableau I, on tire les résultats suivants :

- Sensibilité du test bactériologique par rapport au test au métabisulfite de sodium : 100%
- Spécificité du test bactériologique par rapport au test au métabisulfite de sodium : 100%
- Valeur prédictive positive du test bactériologique par rapport au test au métabisulfite de sodium : 1
- Valeur prédictive négative du test bactériologique par rapport au test au métabisulfite de sodium : 1
- Faux positifs : 0
- Faux négatifs : 0

3.2. Commentaires des résultats

Les trois souches d'entérobactéries que nous avons utilisées pour cette évaluation ont donné des résultats identiques. Le métabolisme des entérobactéries étant en général réductrice [7], nous pouvons admettre que n'importe quelle souche d'entérobactérie peut

être utilisée pour effectuer l'analyse car possédant toutes le pouvoir réducteur.

Les résultats obtenus ont donné une sensibilité de 100% et une spécificité de 100% quelle que soit la souche bactérienne testée. De ces valeurs, on peut déduire un taux de faux négatifs qui est égal à 0, un taux de faux positifs égal à 0, une valeur prédictive positive du test égale à 1 et une valeur prédictive négative aussi égale à 1. Ces résultats montrent que le test de falciformation bactériologique équivaut bien le test au métabisulfite de sodium à 2% et peut dans ce cas lui être substitué ou être utilisé comme alternative à ce dernier.

Le mode opératoire utilisé au cours de cette évaluation a été validé sur le plan opérationnel. Une secrétaire du laboratoire qui n'a aucune information, aucune connaissance théorique sur la méthode a juste suivi ce mode opératoire et est arrivée aux mêmes résultats qu'une technicienne supérieure qui a suivi ce mode opératoire. Ces résultats obtenus au cours de cette validation opérationnelle de la méthode bactériologique sont identiques aux résultats obtenus par la méthode chimique au métabisulfite de sodium à 2%.

CONCLUSION

Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent que sur le plan de la sensibilité et de la spécificité, la méthode bactériologique de diagnostic de la drépanocytose par la mise en évidence de l'hémoglobine S équivaut la méthode chimique au métabisulfite de sodium à 2% quelle que soit la souche d'entérobactérie utilisée. Cette méthode bactériologique peut ainsi être utilisée aisément en routine au laboratoire comme méthode alternative ou substitutive à la méthode au métabisulfite de sodium à 2% en respectant les conditions et le mode opératoire tels que validés au cours de cette étude.

REFERENCES

1. BALEDENT F. (en capitale pour les articles de périodique) Diagnostic biologique de la drépanocytose, Développement et Santé, n°150, Déc. 2000
2. GILLE Y, PIERSON A, CUZIAT J. Test d'Emmel : recherche de l'hémoglobine S dans la drépanocytose, Bioltrop, Jan. 2015
3. Bonkian C., Drépanocytose et grossesse : revue de 13 observations à la maternité régionale universitaire A. Pinard, Mém., Prom. 2009
4. BROZOVIC M, ANIONWU E. Sick cell disease in Britain, J. Clin. pathol. 1984, Dec, 37 (12): 1321-6
5. KUDSK K.A, TRANBAUGH F.G. Acute surgical illness in patients with sickle cell anemia, Am. J. surg. 1981, Jul., 142 (1): 113-7
6. Tiendrebeogo T.J. Prise en charge des syndromes drépanocytaires majeurs chez les enfants de 0 à 15

ans au centre hospitalier universitaire pédiatrique Charles Degaulle et au centre médical Saint Camille de Ouagadougou : Marqueurs génétiques caractéristiques cliniques et cout médical direct de la prise en charge, Th., doct., Med., fév. 2013

7. Joly B, Reynaud A. Entérobactéries : systématiques et diagnostic, Ed. Lavoisier (Tic et Doc)

8. Sackett D, Haynes R, Guyatt G, Tugwell P. Clinical epidemiology, A basic science for clinical medicine, 2nd ed. Boston: Little, Brown and Co,1991.