



Comment réaliser un examen de frottis cutané pour la lèpre

ILEP Guide d'apprentissage n° 3

Qu'est-ce qu'un frottis cutané ?

Un frottis cutané est un examen visant à prélever un échantillon de matière au niveau d'une petite incision pratiquée dans la peau ; cet échantillon est ensuite coloré pour la recherche du *M. leprae*, un bacille acido-résistant.

Pourquoi prendre un frottis cutané ?

- Pour confirmer un diagnostic de lèpre multibacillaire à frottis positif chez un suspect.
- Pour aider à confirmer une rechute multibacillaire chez un patient traité antérieurement.
- Pour aider à classer les nouveaux malades.



Qui peut prendre un frottis cutané ?

Toute personne qui a été formée à prendre un frottis cutané et est autorisée à le faire.

Attention: La prise d'un frottis cutané est une procédure invasive. Lavez-vous les mains, portez des gants et utilisez du matériel stérile ainsi qu'une nouvelle lame pour chaque patient. N'effectuez pas de frottis sans nécessité.

Auteurs principaux : Dr Guido Groenen, Dr Paul Saunderson et Prof. Baohong Ji au nom de la Commission médico-sociale de l'ILEP.

Traduction : Dr Etienne Declercq.

Illustrations : Brent Hawkins à partir des originaux de Sandy Patience.

Photos : Ida Baarsen 1i, iv ; GLRA 1ii ; TLMI 1iii ; Geoff Crawford 2 ; Linda Lehman 3 ; OMS/TDR 5i, ii.

© Fédération Internationale des Associations contre la Lèpre (ILEP) 2003

ilep@ilep.org.uk

Se préparer à prendre un frottis cutané

Equipement



Gants



Tampons
et
alcool



Manche de
bistouri et
nouvelles
lames



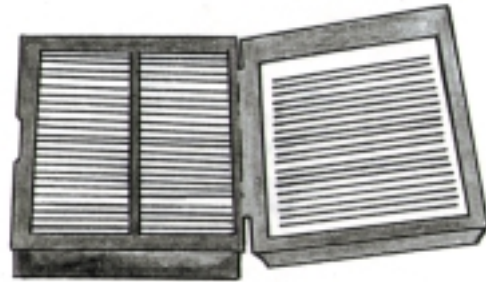
Pansements



Récipient sûr
pour éliminer
les lames
utilisées



Lampe à
alcool



Boîtier à lames microscopiques et nouvelles lames

Disposez tout le matériel dont vous avez besoin sur une table propre.

Vous avez également besoin d'un marqueur de lames et d'un formulaire de demande d'examen de laboratoire.



Expliquez au patient

Demandez au patient de s'asseoir et de se détendre. Expliquez-lui ce que vous voulez faire et quel en est le but. Répondez à ses questions. Obtenez du patient son autorisation et remplissez le formulaire de demande d'examen de laboratoire.

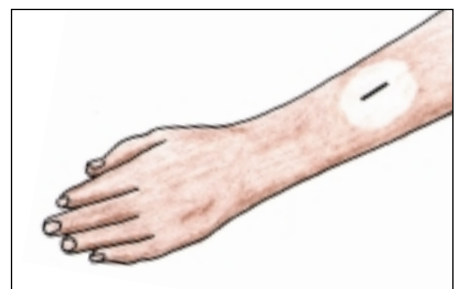
Sélectionnez les sites de prélèvement

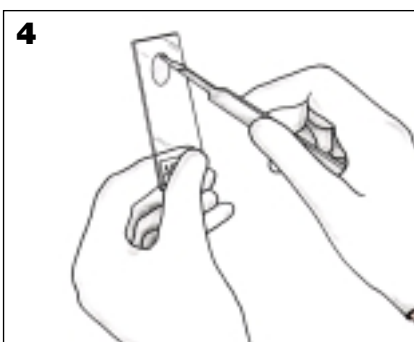
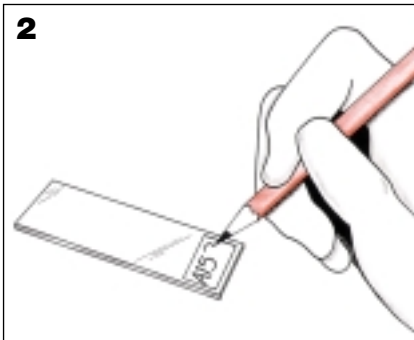
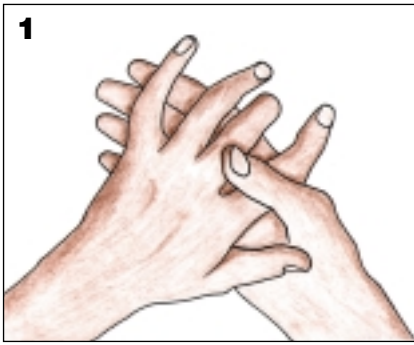
Seuls deux sites seront sélectionnés pour la prise d'un frottis :

1. Le lobe d'une oreille.
2. Une lésion. Sélectionnez la lésion paraissant la plus active mais pas sur le visage. 'Active' signifie surélevée et rougeâtre. Prenez le frottis dans la partie la plus active de la lésion (habituellement la bordure).

S'il n'y a pas de lésion cutanée appropriée, prenez le second frottis du lobe de l'autre oreille ou d'un site où des lésions actives ont été notées antérieurement, ou encore d'un site qui s'est révélé positif dans le passé.

Beaucoup de programmes avaient l'habitude de prélever des frottis à partir de quatre, voire six sites, mais aujourd'hui, deux sites sont considérés comme suffisants dans la majorité des cas.





Comment prélever un frottis cutané

- Lavez-vous les mains (**1**) et enfilez des gants.
- Prenez une nouvelle lame microscopique, propre et non griffée. A l'aide d'un marqueur pour lames, inscrivez le numéro d'identification (ID) du patient à l'extrémité de la lame (**2**). Ce numéro doit se retrouver sur la demande d'examen de laboratoire.
- Nettoyez la peau aux sites de prélèvement avec un tampon d'ouate imbibé d'alcool. Laissez sécher.
- Allumez la lampe à alcool.
- Mettez une nouvelle lame sur le manche de bistouri. Si vous posez le bistouri, assurez-vous que la lame ne touche rien.
- Pincez fermement la peau entre pouce et index ; maintenez la pression pour évacuer le sang.
- Faites une incision dans la peau d'environ 5 mm de long et 2 mm de profondeur (**3**). Continuez à pincer afin que l'incision reste exsangue. En cas de saignement, enlevez le sang avec le tampon d'ouate.
- Tournez le bistouri de 90° et tenez-le à angle droit par rapport à l'incision. Raclez une ou deux fois l'intérieur de l'incision avec le côté du bistouri, afin de récolter du fluide tissulaire et de la pulpe. L'échantillon ne doit pas contenir de sang car ce dernier peut gêner la coloration et la lecture.
- Relâchez la peau et essuyez tout saignement avec un tampon d'ouate.
- Étendez le matériel récolté sur la lame, du même côté que le numéro d'identification. Étendez-le de manière uniforme avec le plat du bistouri, en formant un cercle de 8 mm de diamètre (**4**).
- Frottez le bistouri avec un tampon imbibé d'alcool. Passez la lame à travers la flamme de la lampe à alcool durant 3 à 4 secondes. Laissez-la refroidir sans qu'elle ne touche rien.
- Répétez les étapes ci-dessus pour le second site. Étendez ce frottis à côté du premier, mais sans qu'ils ne se touchent.
- Débarrassez-vous de la lame de bistouri en la mettant dans le récipient approprié.
- Pansez les blessures et remerciez le patient.
- Laissez sécher la lame 15 minutes à température ambiante mais à l'abri de la lumière directe du soleil.
- Fixez le frottis en passant lentement la lame à 3 reprises, frottis vers le haut, dans la flamme d'une lampe à alcool (**5**). Ne surchauffez pas. La lame ne doit pas être trop chaude au toucher.
- Mettez la lame dans un boîtier à lames et envoyez-la au laboratoire avec la demande d'examen.

Comment colorer un frottis cutané

Colorez le frottis en utilisant la méthode de Ziehl-Neelsen à chaud. Colorez avec de la fuchsine phéniquée à 1 %, qui colore tout en rouge. Lavez avec de l'acide-alcool à 1 %, qui décolore tout sauf le *M. leprae*. Contre-colorez la lame au bleu de méthylène à 0,2 %. Les bacilles de la lèpre sont alors visibles sous forme de bâtonnets rouges sur un fond bleu.

Equipement

Une bouteille de chacun des produits suivants :

Solution de fuchsine phéniquée 1 %

Acide-alcool 1 %

Solution de bleu de méthylène 0,2 %

Montre ou horloge

Porte-lames

Evier avec eau courante

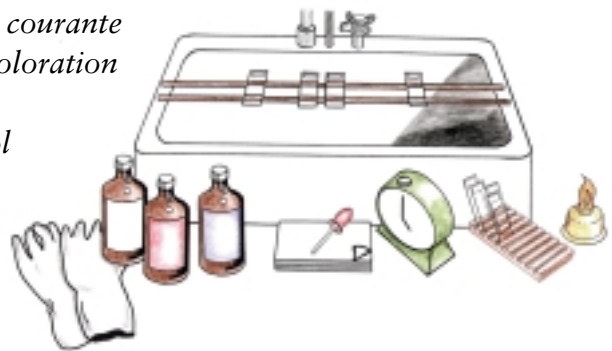
Baguettes de coloration

Pipette

Lampe à alcool

Papier filtre

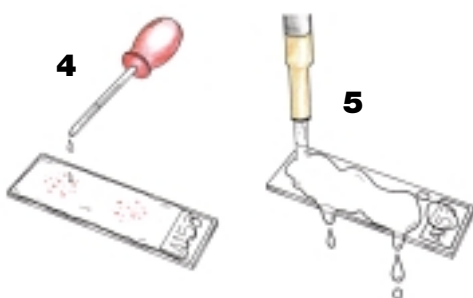
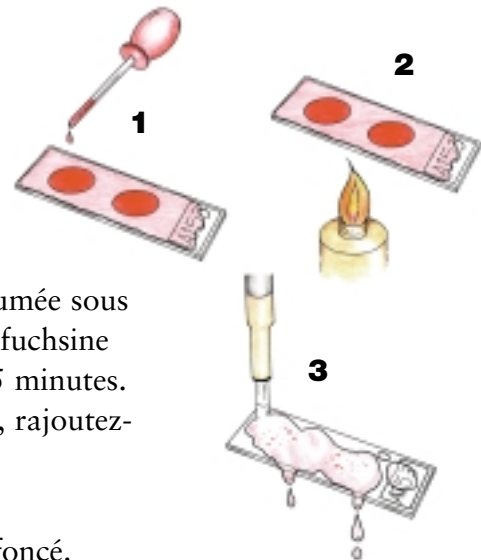
Gants



- Enregistrez la lame dans le registre de laboratoire.
- Déposez la lame sur le porte-lames, face avec le frottis vers le haut. On peut colorer jusqu'à 10 lames en même temps. Assurez-vous que les lames ne se touchent pas l'une l'autre.

Coloration

- Juste avant son utilisation, filtrez la solution de fuchsine phéniquée à 1 % à travers un papier filtre ordinaire.
- Couvrez toute la lame avec la solution de fuchsine phéniquée à 1 % (1).
- Chauffez doucement la lame en tenant une lampe à alcool allumée sous celle-ci jusqu'à ce que de la vapeur commence à monter de la fuchsine phéniquée (2). Répétez cette manœuvre 3 fois en l'espace de 5 minutes. Assurez-vous que le colorant ne bout pas. Si le colorant sèche, rajoutez-en un peu et chauffez à nouveau.
- Lavez doucement au robinet (3). Rincez jusqu'à ce que l'eau d'écoulement devienne incolore. Les frottis vont rester rouge foncé.

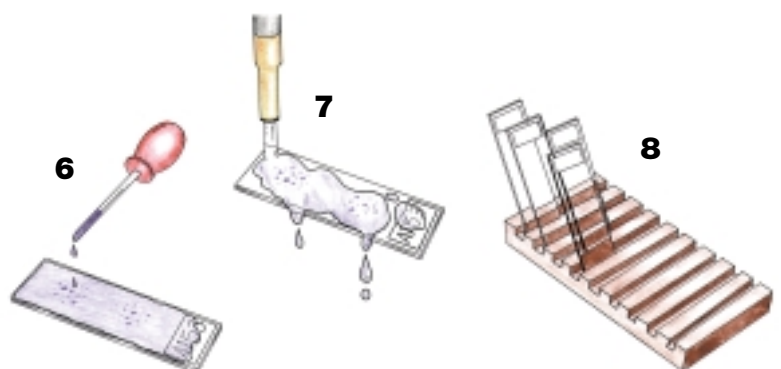


Décoloration

- Couvrez avec la solution d'acide-alcool à 1 % pour 10 secondes (4). Une autre méthode consiste à couvrir avec de l'acide sulfurique à 5 % pendant 10 minutes.
- Rincez doucement à l'eau (5).

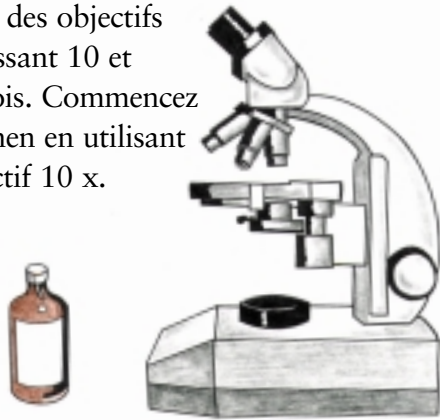
Contre-coloration

- Couvrez avec du bleu de méthylène à 0,2 % pendant 1 minute (6).
- Rincez à l'eau (7), et laissez sécher la lame en position inclinée sur le porte-lames, la face avec le frottis vers le bas (8).
- La lame est maintenant prête pour la lecture.

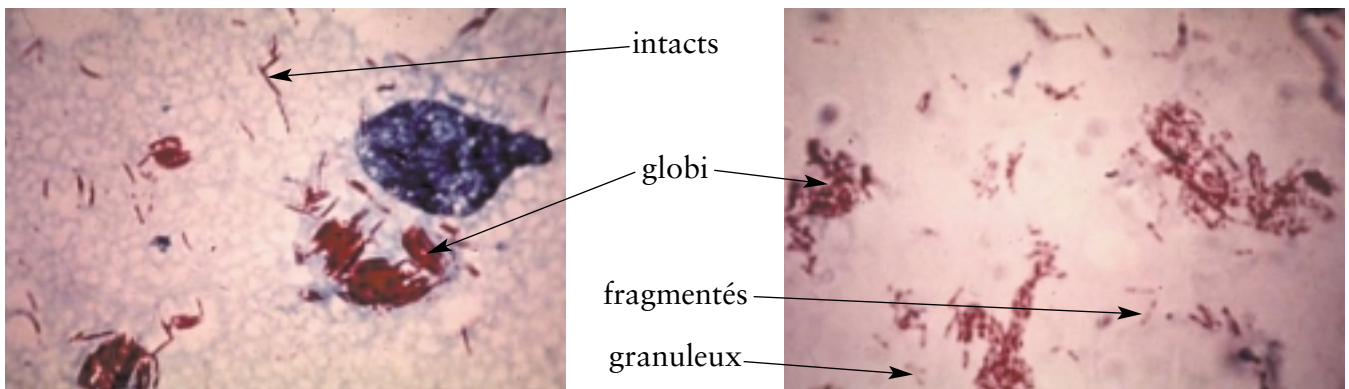


Comment lire un frottis cutané

Vous avez besoin d'un microscope avec un oculaire grossissant 10 fois et des objectifs grossissant 10 et 100 fois. Commencez l'examen en utilisant l'objectif 10 x.



- Placez la lame sous le microscope avec les frottis vers le haut et le numéro d'identification vers la gauche.
- Focalisez l'image en utilisant l'objectif 10 x.
- Versez une goutte d'huile à immersion sur le frottis.
- Changez vers l'objectif 100 x. Celui-ci touchera l'huile d'immersion (si nécessaire, réglez la vis d'ajustement macrométrique afin que la lentille à immersion touche l'huile).
- Ouvrez complètement le diaphragme et mettez le condensateur en sa position la plus élevée.
- Focalisez précisément avec la vis d'ajustement micrométrique.



Recherchez les bacilles acido-résistants. Ils apparaissent comme de fins bâtonnets sur fond bleu. Ils peuvent être droits ou incurvés, et la couleur peut être distribuée régulièrement (bacilles intacts) ou irrégulièrement (bacilles fragmentés ou granuleux). Des bouquets de bacilles sont appelés « globi ». Les bacilles intacts suggèrent la présence d'organismes viables et peuvent être vus chez les nouveaux cas non encore traités ou chez les rechutes.

Après avoir examiné le premier champ, allez au suivant. Examinez environ 100 champs par frottis.

- Si des bacilles acido-résistants sont observés, quantifiez la charge bacillaire selon l'échelle suivante pour obtenir l'indice bactériologique (IB). Calculez l'IB pour chaque frottis séparément:

	Indice bactériologique (IB)
0	0 bacille dans 100 champs
1+	1 – 10 bacilles dans 100 champs
2+	1 – 10 bacilles dans 10 champs
3+	1 – 10 bacilles, en moyenne, dans chaque champ
4+	10 – 100 bacilles, en moyenne, dans chaque champ
5+	100 – 1000 bacilles, en moyenne, dans chaque champ
6+	> 1000 bacilles, en moyenne, dans chaque champ
- Inscrivez les résultats des deux frottis dans le registre de laboratoire.
- Rincez la lame dans du xylène. Ne frottez pas la lame.
- Entreposez les lames dans une boîte pour un futur contrôle de qualité.
- Les lames qui ne sont pas conservées pour le contrôle de qualité seront détruites ou désinfectées, bouillies et lavées pour un nouvel usage pour des examens de routine (de selles ou d'urine, par exemple). Les lames ne devraient pas être réutilisées pour d'autres examens de frottis cutanés ou de crachats.
- Donnez le résultat à la personne qui a demandé le frottis cutané.

Note : Rapportez l'IB pour chacun des frottis de la lame. Pour les patients à frottis positifs, on considère soit l'IB moyen, soit l'IB le plus élevé comme l'IB de ce patient.

Comment préparer les réactifs

Matériel nécessaire pour préparer les réactifs

Poudre de fuchsine base

Alcool éthylique à 95 % *

Cristaux de phénol

Acide chlorhydrique (HCl)

Poudre de bleu de méthylène

Eau pure

Cylindre gradué de 1000 ml

2 seringues de 10 ml

3 flacons bruns de 1 litre

Balance

*Si non disponible, on peut utiliser de l'alcool méthylique ou de l'alcool dénaturé.

Préparation

Ces instructions sont indiquées pour 1 litre de réactif. Si vous avez besoin de moins de 1 litre, adaptez les quantités des ingrédients en conséquence. Préparez de nouveaux réactifs une fois par mois.

Vous pouvez garder les réactifs dans de grandes bouteilles brunes. Pour effectuer la coloration, une plus petite quantité de réactif est versée dans une bouteille de colorant, par exemple, un flacon à bec de 250 ml.

Solution de fuchsine phéniquée à 1 %

1ère étape. Préparez 100 ml de solution saturée de fuchsine :

- Ajoutez 10 g de poudre de fuchsine base à 100 ml d'alcool éthylique à 95 %.
- Mélangez bien.

2ème étape. Préparez la solution de travail de fuchsine phéniquée à 1 % :

- Mettez 50 g de cristaux de phénol dans un flacon.
- Placez ce flacon dans un bassin d'eau chaude jusqu'à ce que les cristaux deviennent liquides.
- Versez le liquide (50 ml) dans un cylindre gradué de 1000 ml.
- Ajoutez de l'eau pour faire 900 ml.
- Ajoutez 100 ml de solution saturée de fuchsine pour obtenir 1000 ml et mélangez bien.

Conservez dans une bouteille sombre. Filtrez avant emploi ou versez sur la lame à travers un petit entonnoir avec papier filtre.

Acide-alcool 1 %

- Remplissez un cylindre de 1 litre avec 1000 ml d'alcool éthylique à 95 %.
- Enlevez 10 ml d'alcool avec une seringue de 10 ml.
- Versez une petite quantité d'acide chlorhydrique (HCl) dans un petit bol. Attention ! Ceci est une substance caustique et toxique. Ne pas toucher ! Ne pas inhaler !
- Prenez 10 ml de l'HCl avec une seringue sèche de 10 ml.
- Rajoutez très lentement l'HCl à l'alcool dans le cylindre. **Ne rajoutez jamais l'alcool à l'acide.**
- Reversez dans la bouteille d'acide le reliquat d'acide du bol.
- Versez l'acide-alcool du cylindre dans un grand flacon de couleur foncée.

Une alternative à l'acide-alcool 1 % est la **solution d'acide sulfurique (H₂SO₄) à 5 %** :

Prenez 950 ml d'eau distillée. Ajoutez lentement 50 ml d'acide sulfurique concentré ; ne **jamais** ajouter de l'eau à l'acide. Conservez dans une bouteille de couleur sombre.

Solution de bleu de méthylène à 0,2 %

- Ajoutez 2 g de poudre de bleu de méthylène à 1 litre d'eau. Mélangez bien.

Conservez dans une bouteille sombre. Filtrez régulièrement.