

Article original**Apport de la Coloration de Ziehl-Neelsen sur Coupes Histologiques dans le Diagnostic de Tuberculose Ganglionnaire***Usefulness of the Ziehl Neelsen staining on the histopathological diagnosis of the lymph node Tuberculosis*

Sando Zacharie¹, Kamga Gonsu Hortense¹, Fewou Amadou¹, Kabeyene Okono Angèle¹,
Ateba Gilbert Roger², Atangana Paul Adrien³, Essame Oyono Jean Louis^{1,3}

¹Faculté de médecine et des Sciences Biomédicales, Université de Yaoundé I

²Ministère de la santé Publique, Cameroun

³Centre Pasteur de Yaoundé – Cameroun.

Auteur Correspondant : Sando Zacharie, HGOPY, B.P 4362 Yaoundé, Cameroun. Email : sandozac@yahoo.fr

RÉSUMÉ**INTRODUCTION**

Le diagnostic de tuberculose ganglionnaire peut être posé à l'histopathologie. Nous avons voulu étudier l'apport de la coloration de Ziehl Neelsen dans la recherche des Bacilles Acido – Alcoolo –résistants (BAAR) utiles au diagnostic de tuberculose sur coupes histologiques.

METHODOLOGIE

Il s'agit d'une étude transversale descriptive et rétrospective. Les blocs tissulaires inclus en paraffine et les coupes histologiques des ganglions lymphatiques interprétées comme une tuberculose après coloration à hématoéine –éosine étaient consécutivement retenus. Une relecture était faite en vue d'harmoniser, classifier et retenir les formes folliculaire, caséofolliculaire et caséuse. La recherche des BAAR était faite sur des coupes additionnelles après coloration de Ziehl Neelsen

RESULTATS

Un total de 128 blocs de tissu ganglionnaire inclus en paraffine a été retenu. Ces blocs provenaient des sujets âgés de 1 à 61 ans avec un âge moyen de 26, 21 ± 15,5 ans. La grande majorité des ganglions 111 (86, 71 %) étaient de localisation cervicale. Les BAAR étaient globalement retrouvés sur 69 (53,90 %) de ganglions. La forme caséo folliculaire était la plus fréquente avec 32/42 (76,19 %), contre 19/44 (43,19 %) pour la forme folliculaire et 18 /42 (42,86 %) pour la forme caséuse. Les valeurs prédictives positive et négative étaient respectivement de 46,38 et 83,05 pour la forme caséofolliculaire comparées aux autres formes avec une différence statistiquement significative.

CONCLUSION

La coloration de Ziehl Neelsen est faisable dans la mise en évidence des BAAR sur coupe histologique en cas de tuberculose ganglionnaire. Les valeurs prédictives sont variables selon les formes histologiques. Elles sont meilleures dans les formes caséofolliculaires par rapport aux formes folliculaires ou caséuses. L'introduction en pratique de routine des méthodes plus sensibles et spécifiques de détection de BAAR, notamment de biologie moléculaire est suggérée.

MOTS CLÉS : Ganglion lymphatique, Histopathologie, Tuberculose, Bacille Acido- Alcoolo-Résistant, Ziehl Neelsen.

ABSTRACT**INTRODUCTION**

The diagnosis of the lymph node tuberculosis can be made on histopathological examination. We aimed at studying the usefulness of the Ziehl Neelsen staining in improving the histopathological diagnosis of tuberculosis from lymph node tissue by demonstrating acid fast bacilli (AFB).

METHODOLOGY

It was a retrospective transversal descriptive study. The paraffin embedded lymph node tissue and hematoxylin –eosin stained slides with the prior diagnosis of tuberculosis were consecutively retained for our study. The confirmation of the diagnosis was made by a second examiner, and the final histological diagnosis was classified either as follicular, caseo-follicular, and caseous types. The acid fast bacilli (AFB) were searched for in additional slides stained with the Ziehl Neelsen method.

RESULTS

A total of 128 paraffin lymph nodes embedded tissue were retained for the study. They came from patients aged 1 to 61 years with a mean age of 26±15,5 years. 111 (86.71 %) lymph nodes were cervical. The AFB were found in 69 (53.90 %) of the lymph nodes. The most frequent types were the caseo-follicular types in 32/42 (76,19 %), the follicular types in 19/44 (43. 19 %) and the caseous types in 18/42 (42.86 %) of the slides. The positive predictive value and the negative predictive value for the caseo follicular types were respectively 46.38 ET 83.05, and were statistically different, when compared to other forms.

CONCLUSION

Ziehl Neelsen stain can be used as a means of identifying AFB in the lymph node tissue with tuberculosis. The predictive value varies with the histopathological type. It is better in the caseo-follicular types than in the follicular or caseous types.. We recommend the introduction of the more sensitive and more specific methods as molecular biology in identifying AFB.

KEY WORDS : Lymph node, histopathology, tuberculosis, Acid Fast Bacilli, Ziehl Neelsen.

INTRODUCTION

Neuf millions de nouveaux cas de tuberculose sont notés dans le monde, avec 2 millions de décès selon l'OMS [1,2]. Elle est causée par le bacille de Koch [3]. Au Cameroun l'OMS estime à 319 cas de tuberculose pour 100 000 habitants [4]. L'augmentation du nombre de personnes affectées par le bacille tuberculeux est en grande partie due à l'infection au VIH et à la virulence de l'agent infectieux. Le diagnostic de tuberculose pose souvent problème étant donné une clinique et une symptomatologie non spécifique d'une part et d'autre part l'inaccessibilité, parfois l'indisponibilité des moyens de diagnostic complémentaire. Par ailleurs les localisations et manifestations pulmonaires classiques peuvent être absentes, les autres localisations tissulaires lorsqu'elles sont présentes sont alors utiles pour le diagnostic. L'atteinte des ganglions lymphatiques peut à cet effet se présenter comme une manifestation de la maladie [5-7]. Le diagnostic anatomopathologique sur tissu ganglionnaire est alors déterminant. Toutefois les diagnostics posés sur coupe ordinaire après coloration à l'hématoxyline-eosine ne permettent pas souvent de présenter une preuve de la présence de bacille acido Alcool résistant (BAAR) ou spécifiquement du bacille de Koch, agent responsable. Dans notre contexte marqué notamment par une inaccessibilité aux techniques de biologie moléculaire en routine, la coloration de Ziehl Nielsen, plus accessible, est faisable sur coupes histologiques et peut conforter le diagnostic morphologique. Toutefois l'évaluation de cette coloration dans nos conditions d'exercice fait défaut. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes proposés d'étudier l'apport de la recherche des BAAR par coloration de Ziehl Nielsen sur coupes histologiques dans le diagnostic de tuberculose ganglionnaire.

METHODOLOGIE

Matériels et méthodes

Il s'agit d'une étude rétrospective et descriptive. Elle s'est déroulée sur une période allant du 1^{er} janvier 2007 au 31 Décembre 2012 dans les laboratoires d'anatomie Pathologique du centre Pasteur de Yaoundé et de l'Hôpital Gynéco-obstétrique et Pédiatrique, au Cameroun. Les comptes rendus d'anatomie pathologique, concluant à un diagnostic morphologique de tuberculose ganglionnaire retenus consécutivement ont permis de rechercher des archives les coupes histologiques correspondantes ainsi que les blocs tissulaires inclus en paraffine des sujets concernés. Les coupes histologiques colorées à l'hématoxyline éosine étaient relues pour établir les types histologiques de tuberculose ganglionnaire. Le diagnostic histologique de tuberculose était basé sur les critères couramment utilisés [6] ; ils consistaient pour l'essentiel en la présence d'un granulome montrant des cellules épithélioïdes associées à des lymphocytes et des macrophages et des cellules géantes multinuclées, souvent associés à de la nécrose caséuse. Les types histopathologiques sur coupes ordinaires colorées à l'Hématoxyline-éosine étaient

établis en regroupant selon les formes folliculaires, caséo folliculaires et les formes caséuses. De nouvelles coupes histologiques à partir des blocs tissulaires enrobés en paraffine étaient effectuées pour les colorations au Ziehl Nielsen dans le but de rechercher des bacilles Acido Alcool Résistants (BAAR). Dans cette coloration les germes sont colorés par la Fuschsine en milieu alcoolique et en présence de phénol et Alcool, le premier ayant un rôle d'accentuer ou rôle accélérateur. Les BAAR restent colorés après une différenciation Alcool- Acide et prennent une teinte rouge dans un fond bleu à vert pâle à la fin de la manipulation. Sur le plan statistique nous avons utilisé le logiciel Epi info les proportions et les pourcentages pour représenter les résultats et le test de Chi-Carré pour les comparaisons avec un seuil de signification de $P \leq 0,005$.

RÉSULTATS

Population

Un total de 128 cas était retenu, dont 58 du Centre Pasteur du Cameroun et 70 de l'Hôpital Gynéco-Obstétrique et Pédiatrique de Yaoundé, dont 73 (57, 03) de sexe masculin et 55 (42, 97 %) de sexe féminin. Les sujets avaient un âge variant de 1 à 61 ans avec un âge moyen de $26, 21 \pm 15,5$ ans.

Localisation des ganglions lymphatiques:

111 (86, 71 %) ganglions étaient de localisation cervicale, 9 (7,0 1 %) de localisation axillaire et 7 (5,46 %) de localisation inguinale et 1 (0,80 %) non précisé.

Répartition des cas selon le type histologique :

Nous avions 44 (34,38 %) cas de forme caseo folliculaire, 42 (32,81 %) cas de forme folliculaire et 42 (32,81 %) cas de forme caséuse.

Résultat de recherche de recherche de BAAR après coloration de Ziehl Neelsen :

La recherche des BAAR après coloration de Ziehl Neelsen a trouvé des BAAR sur 32/ 42 (79,19 %) parmi les cas de type caséofolliculaire, 19 / 44 (43,19 %) de cas de type folliculaire et 18 / 42 (42,86 %) de type caséux. Au total donc les BAAR étaient retrouvés sur 69/128 (53,91%) sur l'ensemble des cas de ganglions lymphatiques. La coloration de Ziehl Nielsen sur coupes histologiques a permis de mettre en évidence des BAAR sur 69 (53,90 %) de l'ensemble de ganglions lymphatiques. Ces bactéries étaient plus fréquemment observées dans les formes caseo folliculaires comparées aux autres formes, la différence étant statistiquement significative. En effet, la sensibilité du test est de 79,19 % et une spécificité de 58,98 %. Ces valeurs sont nettement faibles pour les autres types histologiques. Par ailleurs, la valeur prédictive positive est médiocre (46, 38 %) et la valeur prédictive négative assez élevée (83,05 %), avec une différence statistiquement significative ($p < 0,001$) (Tableau I).

Tableau I : Sensibilité, spécificité et valeurs prédictives liées à la recherche des Bacilles Acido- Alcoolo-Résistants selon les trois types histologiques des ganglions lymphatiques tuberculeux.

Types histologiques N=128	BAAR +	BAAR -	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)	p- Value
Caséo folliculaire	32	10	79,19	56,98	46,38	83,05	<0,001
Folliculaire	19	25	43,18	40,48	27,54	57,63	0,078
Caséeux	18	24	42,86	40,7	26,09	59,32	0,080
Total	69	59					

DISCUSSION

La tuberculose ganglionnaire est assez fréquente [7,8]. Les critères morphologiques sont suffisamment établis pour permettre le diagnostic de tuberculose ganglionnaire sur coupe histologique après simple coloration à l'hématéine éosine [6,9]. C'est ainsi que 128 cas de tuberculose ganglionnaire ont été diagnostiqués à l'histologie dans nos deux formations médicales. Notre série montre une prédominance masculine (57,03 %), ce qui est conforme aux données de la littérature [10,11]. La moyenne d'âge dans notre série est de 26,21 ans, ce qui traduit une atteinte importante chez les sujets jeunes, constat antérieurement fait au Cameroun [12] et au Togo [13]. Les adénopathies prélevées étaient essentiellement de localisation cervicale (86,71 %), Chiffre proche de celui trouvé dans la série de Ghizlane Hamzaoui et al au Maroc [7] et Besabih [14]. Ceci peut s'expliquer par une bonne accessibilité et une facilité chirurgicale pour ce qui concerne une biopsie ganglionnaire sur cette localisation. Par ailleurs le fait que ces ganglions se situent autour de la porte d'entrée oropharyngée et aérienne des germes facilite leur atteinte.

Dans la littérature des différentes classes histologiques sont utilisées [6, 14-19]. Nous avons utilisé la classification de Mfinanga et al [18]. Notre série comportait les formes caseo folliculaires, folliculaires et caséeuses dans des proportions très rapprochées. La prédominance des formes caseofolliculaires est signalée dans d'autres études [15]; d'autres travaux ont présenté des séries avec une faible proportion des formes caséeuses et des formes folliculaires [16]. Toutefois notre collectif a l'avantage de faciliter une étude comparée des sous groupes histologiques pour ce qui concerne la mise en évidence des BAAR à la coloration de Ziehl Nielson. Ainsi, près de 53,90 % de l'ensemble des cas de notre série montraient la présence de BAAR après coloration de Ziehl Nielson ; Ce résultat est proche de 49,16 % des cas trouvés dans une série de 59 cas de Javalakshmi P et al [15] mais nettement supérieure au chiffre de 21,5 % trouvés dans la série de Mfinanga [18]. Aussi avons-nous noté que la probabilité de mettre en évidence des BAAR était plus élevée dans les formes caséo folliculaires (76,19 %) que dans les formes folliculaires (43, 19 %) et dans les formes caséeuses (42,86 %). Par ailleurs pour cette forme caséo folliculaire, la valeur prédictive positive pour la recherche des BAAR est médiocre (46, 38 %) et la valeur prédictive

négative assez élevée (83,05 %), avec une différence statistiquement significatives. Par ailleurs la sensibilité du test est de 79,19 % et une spécificité de 58,98 %. Ces valeurs sont nettement faibles pour les autres types histologiques. Ceci peut s'expliquer par la présence de nombreux BARR au sein de nombreux histocytes et caséum dans la forme caséo folliculaire comparée aux autres formes histologiques. D'ailleurs Javalakshmi trouve qu'il n'y a aucune association entre la nécrose caséuse et le contenu en BAAR [15]. Ceci peut également s'expliquer par une possible modification ganglionnaire de rechute tuberculeuse liée aux antécédents méconnus de traitement antituberculeux chez nos patients car ledit traitement modifie l'histologie du ganglion et réduit la proportion de ganglions avec BARR à seulement 10 % [19]. D'autres explications incluent la faible sensibilité et l'absence de spécificité de la coloration de Ziehl Nielsen en général dans la mise en évidence des BAAR et une insuffisance d'entraînement des pathologistes à reconnaître les BAAR à ladite coloration. Enfin la sensibilité de l'histologie pour le diagnostic de tuberculose est élevée et dépasse 90 %, tandis la spécificité est faible n'atteignant pas 50 % [17,18]. Quelques situations peuvent simuler morphologiquement le granulome tuberculoïde telles la sarcoïdose, la maladie de griffure de chat, la Pasteurellose, les mycoses [9]. Enfin d'autres travaux montrent que le diagnostic de tuberculose basé uniquement sur la mise en évidence de BAAR par la coloration de Ziehl Nielson sur coupe histologique est sous estimé comparativement à la recherche du bacille tuberculeux par culture ou par technique de biologie moléculaire telle la PCR [17,20].

CONCLUSION

La mise en évidence des BAAR après coloration de Ziehl Nielsen est possible sur coupes histologiques de tuberculose ganglionnaire mais ses valeurs prédictives sont variables selon les types histologiques. Elles sont meilleures pour les formes caséo folliculaires comparées aux formes folliculaires et aux formes caséeuses. Une amélioration de la détection des BAAR, notamment par une introduction en pratique routinière des techniques de biologie moléculaire est souhaitée dans nos laboratoires.

RÉFÉRENCES

- [1] Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report. (WHO/HTM/TB/2009.426). 2010. Genève. Organisation mondiale de la Santé.
- [2] OMS, StopTbPartnership. Plan Mondial Halte à la Tuberculose 2011-2015. 2010. http://www.stoptb.org/assets/documents/global/plan/stopTB2011_overview_FR.pdf. consulté le 01 Décembre 2013 à 16 heures.
- [3] Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 ; 99(6):3684-9.
- [4] World Health Organization (2013). Global tuberculosis report 2013. Geneva (Switzerland).
- [5] Programme National de Lutte Contre la tuberculose. Situation épidémiologique de la tuberculose au Cameroun, rapport du 12 mai 2014. <http://www.pnlt.cm/index.php/component/k2/item/630-situation-epidemiologique-de-la-tuberculose-au-cameroun>. consulté le 18 novembre 2014 à 15 heures.
- [6] Kumar V, Ramzi S, Cotran RS, Robbins SL. Robbins Basic Pathology 7th Edition, Philadelphia Pennsylvania, Saunders, 2003.
- [7] Ghizlane Hamzaoui, Lamyae Amro, Hafsa Sajjai, Hind Serhane, Nezha Mouden, Abdellah Ennezari, Abdelhaq Alaoui Yazidi. Tuberculose ganglionnaire: aspects épidémiologiques, diagnostiques et thérapeutiques, à propos de 357 cas. *The Pan African Medical Journal*. 2014;19:157
- [8] Sando Z, Fouelifack FY, Fouogue Tsuala J, Fouedjio JH, Ngo Ndeby YS, Djomou F, Fewou A, Essame Oyono JL. Etude histopathologique des adénopathies cervicales à Yaoundé, Cameroun. *The Pan African Medical Journal*. 2014;19:185.
- [9] Diebold J, Camilleri JP, Reynes M, Callard P. Anatomie pathologique générale: Les formes étiologiques de l'inflammation. Ed internationale, 1886.
- [10] Ayoub AK, Fourati M, Les adénopathies cervicales tuberculeuses à propos de 147 cas. *Tunisie médicale*, 1984, 62,2, 159-162.
- [11] Monod JP, Lehman W, De Haller R. Les adénites cervicales tuberculeuses. *Médecine et hygiène*, 1986, 2945-8.
- [12] Mbakop A, Fouda Onana A, Noumenba, Noumen JL, Michel G, Abondo A. Tuberculose ganglionnaire au Cameroun, aspects cliniques et anatomopathologiques. A propos de 333 cas. *Med Tropicale* 1991 ; 149-153.
- [13] Assimadi K, Tikhani O, Tatagnan K et al. Localisation extra pulmonaire de la tuberculose chez l'enfant Togolais. *Afr Med* 1989 ; 28 : 575-9.
- [14] Bezabih M, Mariam DW, Selassie SG. Fine Needle aspiration cytology for suspected tuberculous lymphadenitis. *Cytopathology* 2002 Oct ; 13 (5) : 284-90.
- [15] Javalakshmi P, Malik AK, Soo-Hoo HS. Histopathology of lymph nodal tuberculosis – University Hospital experience. *Malays J Pathol* 1994 juin ; 16 (1) 43-7.
- [16] Pécarrère JL, Raharisolo C, Drominy JA, Aurégan G, Peghini M, De Rotalier P, et al. A propos de 660 cas de tuberculoses histologiques extra pulmonaires étudiées à L'institut Pasteur de Madagascar. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 1995 ; 62 : 83-9.
- [17] Beyene D, Ashenafi S, Yamuah L, Aseffa A, Wiker H, Engers H, Klatser P, Sviland L. Diagnosis of tuberculous lymphadenitis in Ethiopia: correlation with culture, histology and HIV status. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008 Sep;12(9):1030-6.
- [18] Mfinanga SG, Sviland L, Chande H, Mustafa T, Mørkve O. How does clinical diagnosis of mycobacterial adenitis correlate with histological findings? *East Afr J Public Health*. 2007 Oct;4(2):47-50.
- [19] Oktay MF, Topcu I, Senyigit A, Bilici A, Arslan A, Cureoglu S, Yildirim M. Follow-up results in tuberculous cervical lymphadenitis. *J Laryngol Otol*. 2006 Feb;120(2):129-32. Epub 2005 Nov 25.
- [20] Noordhoek GT, Kolk AH, Bjune G, Catty D, Dale JW, Fine PE, Godfrey-Faussett P, Cho SN, Shinnick T, Svenson SB, et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis: a blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol*. 1994 Feb;32(2):277-84.