

INTRODUCTION

La tuberculose est une maladie infectieuse causée par une bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Trois espèces de mycobactéries sont fréquemment rencontrées en clinique humaine *Mycobacterium tuberculosis* ou bacille de Koch (BK), *Mycobacterium bovis* et *Mycobacterium africanum*. Il existe d'autres mycobactéries, dites mycobactéries atypiques qui ne provoquent pas la tuberculose, mais peuvent causer diverses infections, en particulier chez les patients immunodéprimés.

Les mycobactéries sont des bacilles aérobies stricts qui se caractérisent par une paroi très particulière au sein du monde bactérien qui leur confère, entre autres, des propriétés tinctoriales spécifiques, l'**Acido-Alcool-Résistance**. Cette propriété est utilisée pour le diagnostic microscopique de la tuberculose par la coloration de Ziehl Neelsen ou par la coloration à l'auramine.

L'examen microscopique reste un outil simple, rapide, peu coûteux permettant la détection des formes de tuberculose bacillifères contagieuses responsables de la transmission de la maladie dans la communauté. Il constitue également un indicateur essentiel pour le suivi de l'épidémiologie et pour l'évaluation du **PNLTL**(Programme National de lutte contre la tuberculose et la lèpre). De plus il reste nécessaire pour surveiller la réponse du patient sous traitement

La tuberculose est essentiellement **une maladie des poumons**, c'est pourquoi la majorité des prélèvements qui parviennent au laboratoire est d'origine pulmonaire.

Il existe d'autres localisations, de la tuberculose, moins fréquentes, pour lesquelles d'autres prélèvements sont envoyés au laboratoire: biopsies ou ponctions ganglionnaires, urines, abcès, lésions cutanées, liquides d'épanchement, LCR, selles, sang, etc. Ces produits pathologiques nécessitent, en plus de l'examen direct, une mise en culture, car ils ne contiennent généralement pas suffisamment de bacilles pour qu'on puisse les détecter à l'examen direct.

En Mauritanie la tuberculose constitue un grand problème de santé publique avec une forte incidence estimée en 2016 à 102/100 000 habitants (PNLTL).Des efforts restent à déployer concernant le dépistage et le diagnostic au laboratoire pour arriver à maîtriser cette maladie

Dans le cadre de l'examen direct des frottis d'expectoration colorés restent l'outil avec le meilleur rapport qualité-prix, incontournable pour le diagnostic des formes contagieuses de

tuberculose et pour le suivi des patients sous traitement; ceci malgré l'avènement de nouveaux tests diagnostiques plus sensibles mais beaucoup plus coûteux.

Cet examen a bénéficié ces dernières années de nouvelles avancées technologiques avec l'avènement des microscopes à fluorescence LED ou Light Emitting Diode. Ainsi la coloration à l'auramine tend à remplacer la classique coloration de Ziehl Neelsen dans les laboratoires de « bacilloscopie » avec un gain de sensibilité et de rapidité.

Le réseau de laboratoire est une composante très importante dans les programmes de lutte anti-tuberculeuse; sa mise en place, son renforcement et son maintien constituent un élément de base pour assurer un diagnostic de qualité et au-delà une prise en charge efficace du patient.

Le rôle du laboratoire de bacilloscopie est primordial, il assure un diagnostic rapide sensible et à faible coût. Tous les efforts doivent être fournis pour garantir sa qualité.

L'objet de ce guide est de permettre aux techniciens de laboratoire de bacilloscopie de se conformer aux directives générales du laboratoire national de référence afin d'uniformiser les tests de diagnostic en vue d'asseoir un réseau de laboratoire efficient.

Ce guide abordera tous les aspects du diagnostic microscopique de la tuberculose depuis le prélèvement des échantillons jusqu'à la remise des résultats. Les principes de base d'un système d'assurance qualité seront également traités afin d'améliorer la fiabilité et l'efficacité des services de laboratoire.

Les objectifs des laboratoires de diagnostic de la tuberculose :

- **La détection des cas de tuberculose en particulier les cas contagieux**
- **La détection rapide des résistances**
- **Le dépistage autour des cas.**
- **Le suivi du traitement jusqu'à la guérison.**
- **La surveillance de la tuberculose dans la communauté**

I. RECUEIL DES ECHANTILLONS

1. Spécifications des récipients de prélèvements (ou crachoirs)

Le récipient doit être fait de plastique translucide ou transparent incassable, à goulot large, à fermeture hermétique pour empêcher l'échantillon de couler ou de se dessécher (bouchon à vis) et à étiquetage facile. Sa capacité est de 30 à 50 ml, il doit être à **USAGE UNIQUE**

2. Procédure de recueil des échantillons:

Nombre d'échantillons:

Le patient suspect de tuberculose pulmonaire doit effectuer **trois** collectes d'expectorations en deux jours pour la recherche de mycobactéries. Si les laboratoires sont soumis à un système d'assurance qualité externe (EQA), avec une microscopie documentée de bonne qualité 2 échantillons suffisent. Dans ce cas de figure, la définition des **cas de tuberculose** a été révisée à **un seul frottis positif défini comme un ou plusieurs BAAR dans au moins 100 champs microscopiques**. Si l'assurance qualité n'est pas appropriée 3 échantillons restent nécessaires pour le diagnostic.

Pour le suivi du traitement: l'examen d'un échantillon unique d'expectoration «DU MATIN » est requis. Ce prélèvement est fait à la fin de la phase intensive, une fois au cours de la phase de continuation et une fois à la fin du traitement.

Stratégie Spot – matin – spot

-1^{er} jour : Echantillon n°1 (spot ou sur place): lors de la visite initiale, le malade fourni sous surveillance et sur place un échantillon. Lorsqu'il se présente au laboratoire, on lui remet un crachoir pour le prélèvement du lendemain

2^{eme} jour : Echantillon n°2 : Le malade apporte son échantillon recueilli tôt le **matin** dans les deux heures qui suivent son réveil

Echantillon n°3 (spot): Le malade fournit un autre échantillon sur place et sous surveillance. Cette procédure est recommandée par l'OMS et L'Union .

Avantages

Un échantillon spot est disponible dans le cas où le patient ne retourne pas avec le spécimen du matin

Inconvénients

- ▶ Nécessite deux visites à la clinique.
- ▶ Le diagnostic prend au moins 2-3 jours.
- ▶ Augmente la charge de travail.
- ▶ Il y a un risque élevé de manquer un cas si seulement le premier échantillon est reçu.

Stratégie le jour même: spot-spot

Une microscopie de bonne qualité de deux échantillons d'expectorations consécutifs (spot - spot) identifie la grande majorité (95 – 98 %) des cas positifs de tuberculose.

Avantages : cette stratégie

- ▶ Réduit considérablement la charge de travail des laboratoires
- ▶ Permet d'avoir le diagnostic le jour même
- ▶ Est préférable pour les patients parce qu'elle réduit le nombre de visites tout en maintenant en grande partie la sensibilité

Inconvénients: Très légère perte du nombre de cas détectés

3. Conditions de recueil des crachats et instructions aux patients:

- Les crachats doivent être prélevés en plein air ou dans une salle bien aérée et ensoleillée, située le plus loin possible des autres consultants.
- Une personne entraînée doit expliquer au malade comment tousser pour ramener une expectoration qui vient du plus profond des poumons
- Les crachats salivaires, les sécrétions nasales, ou la présence de particules alimentaires ne sont pas conformes et peuvent fausser les résultats.
- Les patients doivent être avisés de prendre les mesures suivantes pour produire un bon échantillon :
 - Rincez la bouche avec de l'eau pour éliminer les aliments et d'autres particules
 - Inhalez profondément 2–3 fois et expirez fort
 - Toussez profondément pour produire l'expectoration
 - Placez le récipient ouvert près de votre bouche pour collecter l'échantillon ; évitez la contamination de l'extérieur du récipient
 - Lavez-vous les mains après la collecte de l'échantillon
- Il faut toujours identifier le crachoir sur sa paroi et non sur son couvercle.
- Le technicien doit s'assurer de la quantité (1 à 4 ml) et de la qualité du prélèvement (crachat purulent; mucopurulent parfois hémoptique et non pas salivaire).
- S'assurer que le malade a compris comment il doit recueillir ses crachats le lendemain matin et comment bien fermer le crachoir et le ramener au laboratoire

Il est fortement recommandé de faire :

- Pour le diagnostic des cas de tuberculose: l'examen de trois échantillons d'expectoration, «**SUR PLACE** » + «**DU MATIN** » + « **SUR PLACE** » .
- Pour le suivi du traitement : l'examen d'un échantillon unique d'expectoration «**DU MATIN** » à trois reprises:
 - **une fois à la fin de la phase intensive,**
 - **une fois au cours de la phase de continuation et**
 - **une fois à la fin du traitement.**

4. Prélèvements autres que les expectorations

Tubage gastrique

On a recours au tubage gastrique quand le malade n'arrive pas à cracher, c'est le cas des enfants et des femmes chez qui la tuberculose est souvent paucibacillaire à microscopie négative.

Le tubage est fait le plus tôt possible après le réveil (1 heure maximum) chez un patient à jeun et alité depuis la veille au soir.

Il consiste à recueillir à l'aide d'une sonde naso-gastrique et d'une seringue 5-10 ml de liquide qui sera immédiatement transporté au laboratoire pour analyse

Autres prélèvements respiratoires

Expectoration induite, aspiration bronchique, lavage broncho-alvéolaire réalisés sous fibroscopie généralement en milieu hospitalier, ils seront transportés rapidement et analyses au laboratoire.

5. Prélèvements extra-pulmonaires

Selon la localisation de la tuberculose, différents prélèvements sont réalisés: Ponction lombaire, pleurale, péricardique, péritonéale, articulaire, biopsies chirurgicales ; urines, pus d'abcès fistulisés... Tous ces échantillons sont recueillis dans des récipients stériles fermés hermétiquement et adressés rapidement au laboratoire. Ils seront gardés à +4°C si l'examen est différé

L'accent sera mis sur la recherche de BAAR en parallèle dans l'expectoration.

- **Un examen de laboratoire n'a de valeur que si le prélèvement est correctement effectué**
- **Un prélèvement défectueux, rend tout examen inutile et aboutit à une réponse sans valeur**
- **Ne pas hésiter à demander un nouveau prélèvement plutôt que d'effectuer un prélèvement non correct**

6. Règles d'étiquetage des échantillons

- ▶ **Etiqueter les crachoirs un à un**
- ▶ Indiquez sur l'étiquette le nom du patient, le numéro d'identification et la date de collecte.
- ▶ Écrivez sur l'étiquette à l'extérieur du récipient avec un stylo permanent.
- ▶ N'apposez jamais l'étiquette sur le couvercle.



II. RECEPTION ET ENREGISTREMENT DES ECHANTILLONS

- ▶ Vérifiez la quantité et la qualité des échantillons :
 - Vérifiez le volume (idéalement 1 à 5 ml); il faut un minimum de 1 ml
 - Notez l'aspect de l'expectoration (muqueuse, purulente, sanguinolante ou salivaire) sur le formulaire de rapport
 - Veillez à ce que les spécimens ne contiennent pas d'aliments ou d'autres particules.
- ▶ Vérifiez que l'information du patient est complète, et que la demande est conforme aux lignes directrices du PNLT.
- ▶ Suivez les lignes directrices du PNLT pour rejeter des échantillons.
- ▶ Assurez-vous que l'information du patient est complète sur le formulaire de demande et qu'elle correspond bien aux informations sur le récipient à échantillon.
- ▶ Enregistrez l'échantillon dans le registre de laboratoire et attribuez un numéro de série de laboratoire à cet échantillon.
- ▶ Remplir convenablement les différentes colonnes du registre de laboratoire de tuberculose:
 - Insister sur l'adresse précise du patient et de son accompagnant.
 - Différencier les trois prélèvements en mentionnant l'ordre de recueil en exposant sur le numéro d'ordre. Exemple: si le numéro d'ordre est 25, écrire respectivement pour les échantillons ; 25^1 , 25^2 , 25^3 .

1. Demande d'examen d'expectoration

- ▶ Une demande d'examen d'expectoration devrait inclure : Nom de l'unité de traitement
- ▶ Date de la demande
- ▶ Des informations sur le patient (c'est-à-dire, le nom, le sexe, l'âge, l'adresse et le numéro d'enregistrement du patient ou du cas suspect)
- ▶ Nombre d'échantillons et types d'échantillons envoyés pour examen
- ▶ Date de prélèvement des échantillons
- ▶ Raison de l'examen (par exemple, diagnostic ou suivi)
- ▶ Signature de la personne demandant l'examen

Voir annexe

2. Conservation et transport des crachats

Si les crachats ne sont pas examinés sur place, ils doivent être envoyés à un laboratoire. Le transport doit avoir lieu tous les jours ou au moins 1 ou 2 fois par semaine. Pour la conservation et le transport, des boîtes spéciales pouvant contenir 10 à 20 crachats sont utilisées.

Les règles suivantes doivent être suivies :

- ▶ Les échantillons doivent être acheminés au laboratoire aussi rapidement que possible.
- ▶ Les prélèvements doivent être gardés dans un **endroit aussi frais** que possible. La période de conservation ne doit pas excéder 3 jours à température ambiante
- ▶ A chaque fois qu'il est possible, les échantillons seront réfrigérés à +4°C pour 10 jours au maximum, surtout si une mise en culture est prévue.
Cependant un échantillon d'expectoration qui a été retardé pendant le transport peut toujours être examiné au microscope et au Gene Xpert MTB/RIF.
- ▶ Une liste comportant les noms des malades et les renseignements cliniques correspondants doit accompagner la boîte de transport (cette liste doit être sous pli fermé).
- ▶ Le nombre total d'échantillons dans un récipient de transport correspondra au nombre de formulaires de demande qui les accompagnent.
- ▶ Le numéro d'identification sur chaque récipient à échantillon correspondra au Numéro indiqué sur le formulaire de demande.
- ▶ Les formulaires d'accompagnement doivent contenir les informations requises pour chaque patient.

Emballage des échantillons:

un triple emballage des prélèvements est requis:

Emballage primaire

- ▶ Emballez le récipient étanche en ouate ou serviette en papier qui peuvent absorber les éventuelles fuites.



Emballage secondaire

- ▶ Placez le récipient emballé dans un récipient secondaire, comme un sac en plastique hermétique ou un autre récipient.
- ▶ Placez le récipient secondaire dans un support pour éviter les fuites.

Emballage tertiaire

- ▶ Placez le récipient secondaire et son contenu dans une boîte réfrigérée ou un autre récipient adéquat (glacière) en position verticale.

Appliquez le symbole de danger biologique – avec les marquages et l'étiquetage appropriés pour la catégorie d'échantillons – sur l'emballage tertiaire.



3. Transport des frottis d'expectoration

Ceci concerne les centres de santé qui ne font pas la coloration et la lecture microscopique mais préparent seulement les frottis pour les envoyer vers des laboratoires de diagnostic:

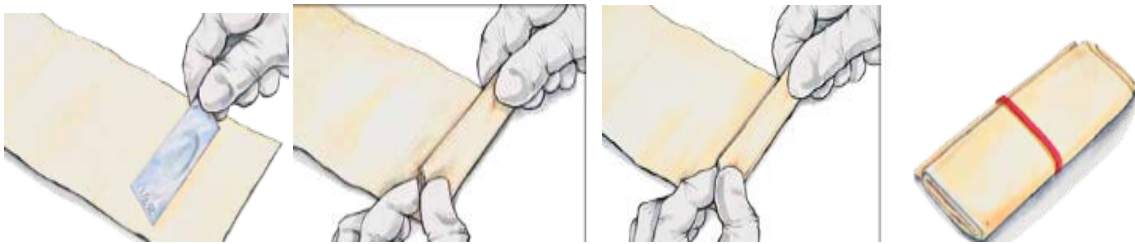
Les frottis sont préparés dès la réception des prélèvements d'expectoration selon les recommandations citées plus haut. Ils seront envoyés par courrier aux centres de diagnostic qui leur retourneront le résultat par la suite.

Pour cela:

- Les frottis fixés sont mis dans une boîte de transport (à l'abri de la poussière, de l'humidité, de la lumière, de la chaleur et des insectes).
- Ces boîtes sont scellées (scotch) pour éviter de perdre les lames pendant le transport.

- S'assurer que chaque frottis est clairement identifié, qu'il est accompagné d'une demande d'examen correctement remplie
- Le courrier comprendra la boîte de lames et les demandes d'examen.
- Les délais de ce courrier doivent être les plus courts possible pour éviter les retards de diagnostic. (2 à 3 fois par semaine)

Dans le cas où le centre ne dispose pas de boîte de transport, les frottis sont emballés dans du papier toilette (voir figure)



Mettre la 1^{ère} lame, l'enrouler 2 fois, mettre la 2^{ème}, enrouler 2 fois...,
Utiliser un adhésif pour fixer le tout
Eviter d'emballer plus de 5 lames dans le même paquet

PREPARATION DES FROTTIS D'EXPECTORATION

III. PREPARATION DES FROTTIS

Tous les laboratoires pratiquant la bacilloscopie doivent suivre les méthodes recommandées par le LNRM et le PNLT à savoir la confection des frottis et les techniques de coloration.

Les frottis sont préparés à partir d'une parcelle purulente ou hémorragique du produit d'expectoration, le plus tôt possible après leur réception.

1. Identification des lames

- Prendre une lame **neuve**, dégraissée (la réutilisation d'anciennes lames est interdite) et graver avec le diamant marqueur, le numéro d'identification du crachat sur une extrémité de la lame.
- Vérifier la conformité de l'identification de la lame avec le crachoir.
- Préparer ainsi une lame pour chaque échantillon (pas plus de 10 à 12 crachats à la fois).

2. Préparation des frottis

- Prendre chaque lame par la partie où est gravé le numéro, la poser à cheval sur un support de lame, la partie gravée tournée vers le haut.
- Prendre le crachoir correspondant au numéro de la lame, l'ouvrir, poser le crachoir à droite du support de lames et poser à côté son couvercle.
- Passer l'anse métallique à la flamme en la portant au rouge et la laisser refroidir.
- Prélever une parcelle de crachat en choisissant si possible une parcelle purulente.
- Faire un frottis aussi fin que possible de 2 cm x 1 cm sur la lame.
- Placer la lame sur le séchoir.
- Passer l'anse dans un bocal **contenant du sable et de l'alcool** à 70° avant de la flamber pour la stériliser et avant de prendre un autre crachoir.
- Préparer les autres lames de la même façon.

Remarque: Pour l'étalement, les anses peuvent être remplacées par des tiges en bois ou des anses en plastiques à usage unique.

3. Séchage des frottis

- Laisser sécher les frottis à l'air libre pendant au moins 15 minutes (15 à 30 min). **Ne pas utiliser la flamme pour sécher les frottis.**

4. Fixation des frottis

- Prendre avec une pince chaque lame par sa partie gravée, frottis tourné vers le haut.
- Passer la lame 3 fois (en 3 à 5 secondes) à travers la flamme du bec bunsen ou de la lampe à alcool.

IV. TECHNIQUES DE COLORATION

Pour mettre en évidence les mycobactéries on utilise leur propriété **d'acido alcool-résistance**, c'est-à-dire leur capacité à former des complexes stables avec des colorants basiques, fuchsine ou fluorochromes phéniqués, qui persistent malgré la double action de l'alcool et des acides forts dilués. Deux méthodes sont bien adaptées à la pratique quotidienne de cet examen, la méthode de Ziehl-Neelsen, et la méthode de coloration à l'auramine.

1. COLORATION DE ZIEHL-NEELSEN

RÉACTIFS:

- Fuchsine de Ziehl.1%
- Acide sulfurique dilué au 1/4
- Bleu de méthylène 0.1%

TECHNIQUE:

Placer les lames horizontalement sur le porte-lame, frottis tournés vers le haut, , en faisant attention qu'elles ne se touchent pas.(maximum 10-12 lames)

La coloration de Ziehl Neelsen comprend 3 étapes

1^{er} Temps: coloration :

- Couvrir la lame de fuchsine phéniquée filtrée au préalable
- Chauffer trois fois en 10 minutes jusqu'à émission de vapeurs à l'aide de la flamme d'un coton monté sur une tige trempée dans de l'alcool.
Le colorant ne doit pas bouillir ou se dessécher sur la lame; en ajouter chaque fois que c'est nécessaire.

2^{ème} Temps: Décoloration

- Rincer à l'eau immédiatement et délicatement les lames autant que possible à l'aide d'un flacon et non sous le jet du robinet qui risque de décrocher le frottis.
- Egoutter les lames et les recouvrir d'acide sulfurique dilué au 1/4, laisser agir 3minutes
- Laver abondamment à l'eau. Le frottis est alors incolore ou légèrement teinté en rose.

3^{ème} Temps –Contre coloration

- Recolorer la lame par la solution de bleu de méthylène filtrée au préalable
- Laisser agir 1 minute
- Laver à l'eau et laisser **sécher à l'air** avant l'examen microscopique.

Remarques:

- Pour la décoloration on peut remplacer l'acide sulfurique au $\frac{1}{4}$, par un mélange **acide-alcool** qu' on laissera agir 3 minutes

Leséchage des frottis entre 2 épaisseurs de papier filtre est totalement interdit

EXAMEN MICROSCOPIQUE

- 1) La lecture microscopique des lames colorées à la fuchsine par la méthode de Ziehl-Neelsen se fait à l'immersion objectif 100 x et avec des oculaires de 10. C'est-à-dire avec un grossissement final de 1000.
- 2) Commencer à lire systématiquement champ par champ en déplaçant la lame longitudinalement vers la droite
- 3) Explorer chaque champ de la périphérie vers le centre à la recherche de **BAAR** : Bâtonnets fins droits ou légèrement incurvés, réguliers ou granulés, isolés ou rassemblés en amas colorés en rouge sur fond bleu.
- 4) Examiner un minimum de 100 champs équivalent à une longueur du frottis.
- 5) Pour confirmer un frottis négatif, examiner 300 champs (trois longueurs du frottis)

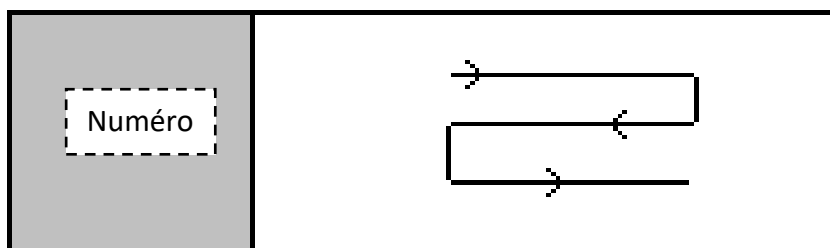


Figure : Méthode recommandée pour la lecture des frottis au microscopie

EXPRESSION DES RÉSULTATS

Le résultat de l'examen microscopique est exprimé de façon quantitative en nombre de(+), en précisant la méthode de coloration utilisée. Le nombre de bacilles présents dans l'expectoration est en relation avec le degré de contagiosité du patient. Il permet aussi de contrôler la disparition progressive des bacilles sous traitement.(tableau1)

Tableau1: code de lecture des frottis colorés par la methode de Ziehl Neelsen (objectif à immersion x100)

Nombrede BAAR	Nombre de champs	Résultats
0 BAAR	100 Champs	Négatif (pas de BAAR par 100 champs)
1-9 BAAR	100 Champs	Nombre exact de BAAR
10-99 BAAR	100 Champs	1+
1-10 BAAR	1 Champ	2+
> 10 BAAR	1 Champ	3+

Garder tous les échantillons jusqu'à ce que les frottis aient été examinés et enregistrés..
Ne jamais réutiliser les lames, même si elles sont négatives.

2. COLORATION À L'AURAMINE

C'est une technique recommandée par l'OMS depuis 2011 et depuis l'avènement de nouveau microscope à fluorescence utilisant la technologie LED pour Light Emetting Diode.

RÉACTIFS:

- Solution d'auramine à 0.1%
- Décolorant: Acide-alcool à 0.5%
- Contre colorant: bleu de méthylène à 0.3%

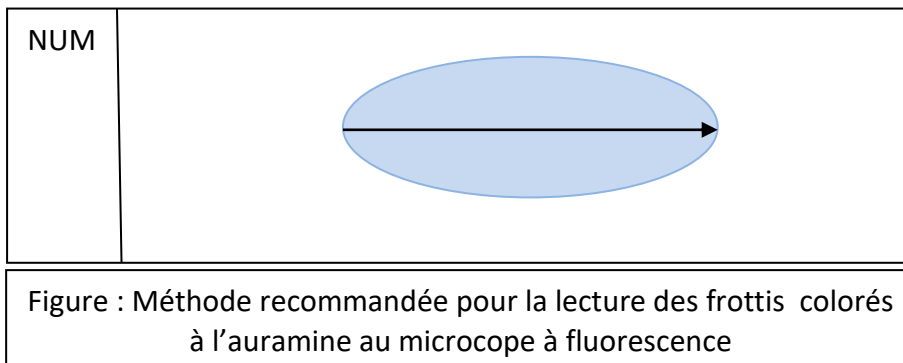
TECHNIQUE:

- Couvrir les lames avec la solution d'auramine filtrée pendant20 mn
- Rincer chaque lame à l'eau
- Enlever l'excès d'eau lame par lame
- Couvrir la lame avec la solution décolorante pendant2mn
- Rincer à l'eau
- Enlever l'excès d'eau lame par lame
- Contre coloration: bleu de méthylène1mn
- Rincer à l'eau
- Laisser sécher à l'air libre

*La contre coloration peut utiliser du permanganate de potassium à 0.5%. Dans ce cas ne pas dépasser le temps de contact (risque d'inhiber la fluorescence des BAAR)

EXAMEN AU MICROSCOPE À FLUORESCENCE:

- La lecture des lames se fait au microscope à fluorescence avec un objectif à sec (x 20) pour un dépistage rapide puis à l'objectif (x40) pour la confirmation.
- Actuellement des microscopes utilisant un éclairage LED sont disponibles et ont l'avantage d'éviter les lampes à mercure et d'être ainsi plus économique. De plus la lecture ne nécessite pas de chambre noire.
- La lecture se fera le même jour que la coloration. On doit lire au minimum 30 champs; soit une longueur de frottis avant de déclarer une lame négative. Figure
- Garder les frottis colorés à l'obscurité (dans une boîte ou protégés d'un papier) car la fluorescence s'atténue à la lumière



Par cette coloration, les mycobactéries apparaissent comme des bacilles jaune-verts fluorescents sur fond noir (figure)

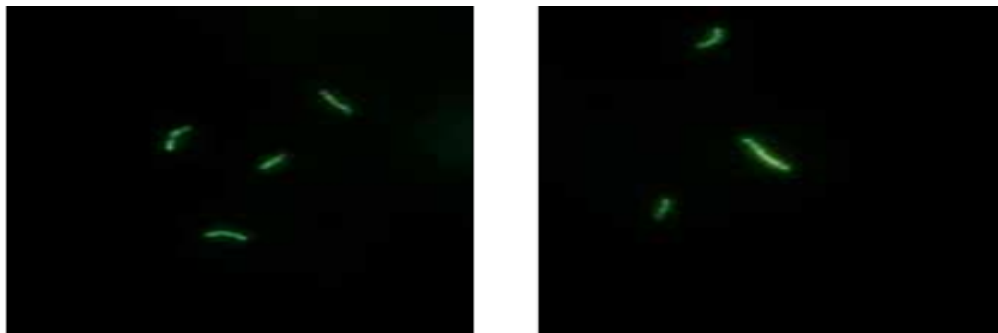


Figure :Bacille acido alcool resistant BAAR après coloration à l'auramine

EXPRESSION DES RÉSULTATS

Par cette technique le résultat de l'examen microscopique est également exprimé de façon quantitative en nombre de (+), en précisant la méthode de coloration utilisée permettant ainsi de contrôler la disparition progressive des bacilles sous traitement.(tableau)

Tableau1: code de lecture des frottis colorés par la méthode de l'auramine

Nombre de BAAR Objectif (x20)	Nombre de BAAR Objectif (x40)	Résultats
Absence de BAAR/L	Absence de BAAR/L	Négatif (pas de BAAR par 100 champs)
1-4 BAAR/L	1-2 BAAR/L	Confirmation requise*
5-49 BAAR/L	3-24 BAAR/L	Nombre exact de BAAR
3-24 BAAR/L	1-6 BAAR/champ	1+
25-250 BAAR/champ	7-60 BAAR/champ	2+
>250 BAAR/champ	>60 BAAR/champ	3+

L: longueur, *résultat à confirmer par un autre technicien, ou sur un autre frottis coloré

La coloration à l'auramine est actuellement recommandée surtout si le nombre de lames à examiner par jour est important. (supérieur à 30). Il faut par ailleurs que les techniciens soient bien formés. L'utilisation de cette méthode permet un gain de temps appréciable et améliore la sensibilité de la microscopie d'au moins 10%

V. CONSERVATION DES FROTTIS COLOREES

Pour la coloration de **Ziehl Neelsen**, les lames lues sont conservées dans une boîte de rangement.

L'huile à immersion est éliminée en plaçant les lames de frottis à l'envers sur une feuille de papier filtre toute la nuit. Les lames sont conservées par ordre numérique dans une boîte de rangement. Ceci permet au laboratoire de bacilloscopie de participer au contrôle de qualité effectué périodiquement par le LNRM.

Il faut éviter de marquer le résultat de lecture sur la lame

Il faut éviter de tremper la lame dans du toluène pour éliminer l'huile.

Pour la coloration à l'**auramine** les lames sont rangées immédiatement après lecture dans une boîte fermée à l'abri de la lumière.

VI. TRANSCRIPTION ET TRANSMISSION DES RESULTATS

Une fois que la lecture des frottis est terminée, que les contrôles assurés, (quelle que soit la technique utilisée), le microscopiste reporte le résultat final sur le registre du laboratoire., **les résultats positifs au stylo rouge**, puis sur la feuille de résultat qui sera datée, signée par le responsable et retournée au clinicien

Voire registre et fiche des résultats en annexe

VII. COMMENT PREVENIR LES ERREURS

COMMENT PRÉVENIR DES FAUX POSITIFS EN MICROSCOPIE ?

- Utiliser des lames neuves
- Utiliser un applicateur neuf pour chaque échantillon
- Utiliser de la fuchsine phéniquée filtrée
- Ecarter les lames les unes des autres pendant la coloration
- Ne pas utiliser de bacs à coloration
- Ne pas laisser la fuchsine phéniquée sécher sur la lame
- Ne pas toucher le frottis avec l'applicateur d'huile à immersion
- Ne pas mettre l'objectif à immersion au contact du frottis
- Identifier complètement et avec précision les crachoirs, les lames et les formulaires du laboratoire
- Vérifier si le numéro du formulaire de demande d'examen d'expectoration correspond à celui du crachoir avant de communiquer les résultats
- Enregistrer et communiquer les résultats avec précision

CONSÉQUENCES DES « FAUX POSITIFS » EN MICROSCOPIE

- Traitements non nécessaires – Gaspillage de médicaments
- Perte de confiance dans le PNLTL

COMMENT PRÉVENIR LES FAUX NÉGATIFS EN MICROSCOPIE

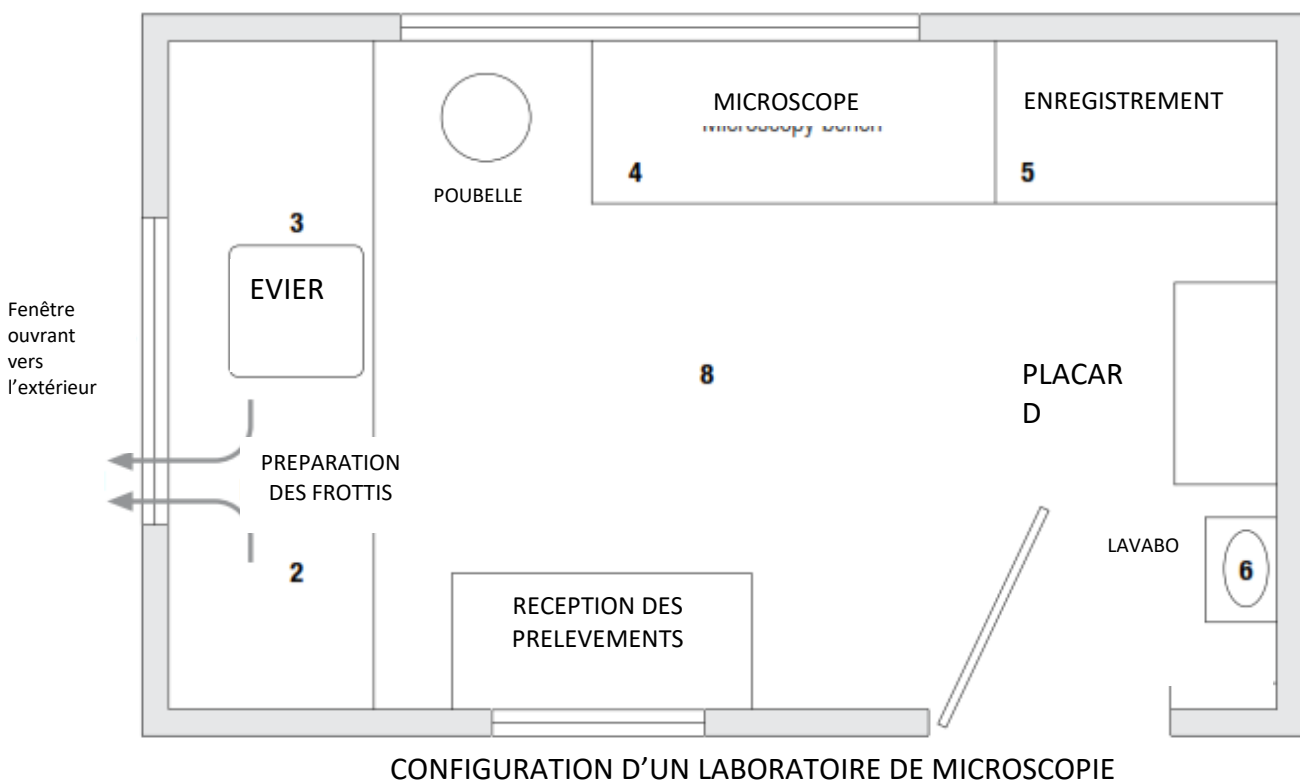
- S'assurer que l'échantillon contient de l'expectoration et non pas de la salive
- S'assurer qu'il y a au moins 3 ml d'expectoration
- Sélectionner des particules visqueuses, muco-purulentes pour l'étalement
- Les frottis ne doivent être ni trop épais ni trop minces de 2 cm x 1 cm
- Les colorants sont de bonne qualité et les temps de coloration sont respectés
- Lire l'ensemble des 100 champs avant de déclarer la lame négative
- Des BAAR bien colorés doivent apparaître sur les frottis de contrôle, connus comme positifs
- Identifier avec soin les crachoirs, les lames et les formulaires de laboratoire
- Vérifier la concordance du numéro indiqué sur le formulaire de demande d'examen d'expectoration et celui du crachoir
- Enregistrer et communiquer les résultats avec précision.

CONSÉQUENCES DES « FAUX NÉGATIFS » EN MICROSCOPIE

- Le patient n'est pas mis sous traitement, ce qui entraîne une souffrance individuelle, la dissémination de la tuberculose et un risque élevé de décès.
- On peut négliger de prolonger la phase intensive du traitement, d'où un traitement inadéquat.
- Perte de confiance dans le PNT

VIII. AMENAGEMENT DU LABORATOIRE DE DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE (BACILLOSCOPIE)

- Les salles doivent être ensoleillées bien aérées suffisamment éclairées et **propres**.
- Le sol doit être lisse facile à nettoyer (8)
- La surface de travail doit être bien dégagée de façon à ce qu'on puisse opérer à l'aise et en toute sécurité.
- Le laboratoire doit disposer d'un lavabo avec de l'eau courante, du savon et d'un désinfectant pour les mains
- Eviter l'encombrement du laboratoire pour le rendre facile au nettoyage
- **L'autoclave de décontamination** des déchets infectieux doit être installé 0 à proximité du laboratoire de bacilloscopie
- **L'incinérateur** doit être installé dans un endroit approprié et en respectant l'environnement.



Organisation du laboratoire:

Il faut séparer les activités propres ; écritures, enregistrement et microscopie des activités à risque de contamination, où on manipule les échantillons

Le laboratoire doit être organisé en 3 zones distinctes

Zone1: table pour la réception des prélèvements

Zone 2 : zone de manipulation comportant une paillasse facile à nettoyer, un lavabo où on fait les colorations et frottis

Zones 3: table ou paillasse propre où on place le microscope et où on fait l'enregistrement des résultats et tout autre travail d'écriture; voir configuration.

IX. SECURITE AU LABORATOIRE DE MICROSCOPIE

La transmission de la tuberculose se produit lorsque de petits aérosols contenant des BAAR se retrouvent dans l'air et sont inhalés. Lorsqu'une personne tousse, éternue, chante ou expire très fort elle produit des aérosols qui peuvent être contagieux si la personne souffre de tuberculose pulmonaire.

Au laboratoire toute manipulation de produits contaminés générant des aérosols présente un risque de contagion et doit donc être évitée

Les techniciens bien formés, lorsqu'ils travaillent correctement, ont un très faible risque d'être infecté au laboratoire de TB. Cependant, certaines activités telles que parler à un patient infecté ou collecter des échantillons peuvent comporter un plus grand risque.

1. Recommandations

A Eviter

- Au laboratoire des consignes doivent être respectées :
- Ne jamais boire ou manger ou fumer
- Ne jamais porter quelque chose à la bouche : stylo, doigts
- Ne jamais pipeter à la bouche
- Ne jamais lécher étiquettes ou enveloppes pour les coller
- Ne jamais appliquer des cosmétiques ou manipuler des lentilles de contact au laboratoire
- Ne jamais porter des chaussures à bout ouvert ou rester pieds nus
- Ne jamais laisser sa blouse ouverte
- Ne jamais utiliser le téléphone mobile au laboratoire

A faire

Equipement personnel de protection :

- Le **port d'une blouse** fermée avec manches longues à élastique (il est souhaitable d'avoir deux blouses: une blouse ou de préférence une sur-blouse réservée aux manipulations contaminantes et qu'on enlève impérativement lors de déplacement en dehors du laboratoire, la deuxième blouse sera réservée aux manipulations propres).
Cette blouse doit être accrochée loin des vêtements de ville
- Le **port de gants** est obligatoire lors des manipulations contaminantes; une fois terminées, les gants sont enlevés immédiatement et mis directement à la poubelle.
- Le **port de masque** est nécessaire : masque FFP2 et non pas les masques chirurgicaux
(le manque de gants et de masque ne doit pas être un handicap pour réaliser la bacilloscopie)
- **Se laver les mains au savon** immédiatement après contact avec un prélèvement, après chaque manipulation, et avant de quitter le laboratoire

2. Organisation du travail pour une manipulation aisée et sécurisante

- **Réduire au maximum la production d'aérosol :**
 - Ne jamais agiter les crachoirs

- Manipuler calmement en évitant les **manipulations brusques** lors :
 - De l'ouverture des crachoirs
 - Du prélèvement à l'anse de platine des particules purulentes pour la confection du frottis
 - De l'étalement du produit pathologique sur la lame
 - De la décontamination de l'anse par flambage au bec Bunsen(bain de sable au préalable)
- **Eviter les contaminations croisées**
 - Veillez à ce que le frottis ne touche pas les bords de la lame (Voir consigne technique)
 - Ne réceptionner que les crachoirs intacts
 - Prévoir un bocal contenant **du sable fin et de l'alcool** pour décharger l'anse des traces de crachat après la confection du frottis et avant de la flamber
- **Au niveau du local**
 - Eviter tout courant d'air au cours des manipulations
 - Interdire le nettoyage à sec dans le laboratoire (balayage). Le nettoyage se fait à l'eau additionnée d'un antiseptique.
 - Désinfecter toute les surfaces de travail à la fin de chaque procédure et à la fin de la journée
 - **Aérer** le laboratoire quand les **manipulations sont terminées** et le nettoyage est fait.
 - Respecter les zones propres

3. Mesures concernant le personnel

- La vaccination du personnel par le BCG est obligatoire
- Faire une radiographie pulmonaire une fois par an ou en cas de besoin
- Eviter de manipuler les produits tuberculeux quand on est atteint d'une infection respiratoire aigue

4. Mesure à prendre en cas de contamination accidentelle au laboratoire

A chaque fois que du matériel biologique infectieux ou potentiellement infectieux est renversé accidentellement sur la paillasse ou sur le sol :

- 1- Porter des gants
- 2- Recouvrir de papier absorbant imbibé de désinfectant
Eviter de verser le désinfectant d'en haut, ou d'utiliser des sprays provoquant des aérosols
- 3- Laisser agir 20mn à 30mn
- 4- Enlever les débris
- 5- Eponger et jeter le matériel dans un conteneur adéquat

Eponger et jeter le matériel dans un conteneur adéquat



X. ELIMINATION DES DECHETS

Le personnel du laboratoire est responsable de la gestion et élimination des déchets

L'élimination des déchets doit être conduite de manière à ne pas compromettre la santé du personnel du laboratoire et du personnel chargé de la collecte des déchets et à ne pas polluer l'environnement.

Une Filière d'élimination des déchets potentiellement infectieux doit être mise en place avec des modalités de stockage, de transport et de traitement spécifiques.

Si on dispose d'un autoclave :Les crachoirs et tout le matériel contaminé sont mis dans des collecteurs autoclavables et passés à l'autoclave.

Si les déchets sont transportés hors du laboratoire, ils doivent être scellés dans un récipient avec un couvercle verrouillable

En l'absence d'autoclave

Ajouter de l'eau de javel à 0,5% (diluée au 1/3) dans les crachoirs à la fin du travail

Les crachoirs, et tous les déchets sont stockés, dans un récipient métallique avec couvercle et stérilisés par incinération puis enfouissement

Ceci doit se faire dans une zone en plein air loin des gens.



Figure Elimination des déchets

XI. CONTROLE DE QUALITE

Afin de garantir la fiabilité des analyses effectuées au sein des laboratoires de diagnostic de la tuberculose, il est indispensable que tous les laboratoires de bacilloscopie soient soumis en permanence à un programme d'assurance qualité (AQ). L'AQ est un système destiné à améliorer constamment la fiabilité et l'efficacité des services de laboratoires. Selon l'OMS et l'UICMR, le programme d'assurance qualité de la bacilloscopie comprend plusieurs volets.

- Contrôle Qualité Interne (CQI)
- Evaluation Externe de Qualité (EEQ)
- Amélioration de la Qualité (AQ)

1. CONTROLE QUALITE INTERNE (CQI)

C'est un contrôle interne systématique des pratiques de travail, des procédures techniques, de l'équipement et de tout le matériel et réactifs incluant la qualité des colorants.

Le but est de s'assurer de la qualité des colorants, de leur non contamination par des BAAR afin de garantir un bon examen microscopique et un résultat fiable.

Le technicien qui prépare les solutions est responsable du contrôle de leur qualité.

Préparation des lames de contrôle

Lames de contrôle positives :

- Sélectionner des crachats positifs riches en bacille (+)
- Après liquéfaction (une nuit), les mélanger crachoir fermé
- Contrôler leur richesse en colorant 2-3 lames
- Préparer une collection de frottis de même taille,
- Laisser sécher les frottis à l'air, fixer
- Conserver dans des boîtes de conservation de lames avec un numéro d'identification en précisant la date de préparation des frottis. Etiqueter la boîte.
« Lames de contrôle positives »

Lames de contrôle négatives :

Procéder de la même façon avec des crachats négatifs,

- Contrôler l'absence de BAAR sur les frottis préparés.
- Numéroter les lames et les mettre dans un boîte
- Etiqueter la boîte : « Lames de contrôle négatives »

Contrôle des réactifs

Tous les réactifs de la microscopie doivent être contrôlés dès leurs préparations selon la procédure suivante:

- Prendre 2 lames positives les colorer avec les nouvelles solutions

Les bacilles doivent être bien visibles sur le frottis positifs. Contrôler le nombre et l'intensité de la coloration ; contrôler l'absence de dépôts de colorant et l'absence d'artéfact

- Prendre 2 lames négatives les colorer; répéter l'opération à 3 reprises (2 lames à chaque fois) Ceci permettra de confirmer l'absence de mycobactéries de l'environnement qui peuvent contaminer les préparations
- Les frottis négatifs ne doivent pas montrer de BAAR.

Si les tests sont concluants les solutions sont gardées et utilisées

En cas de non conformité, refaire le test en contrôlant les techniques de coloration si le problème persiste, les réactifs sont éliminés et d'autres solutions sont préparés.

Enregistrer les dates et les résultats des contrôles

Indicateurs de qualité ou indicateurs clés de performance (KPIs) Key performance indicators

Ces indicateurs peuvent être utilisés pour le contrôle interne et externe de qualité de la microscopie

Ils sont calculés à partir des registres du laboratoire de façon mensuelle ou trimestrielle

Les données sont enregistrées en tableau

Frottis de cas	négative	Quantifiable 1-9 BAAR	1+	2+	3+	total positif	total frottis
Suspect	a	b	c	d	e	f=b+c+d+e	g=a+f
Suivi de traitement	h	i	j	k	l	m=i+j+k+l	n=h+m

Calculer :

- Charge de travail : g+n
- % de positivité chez les cas suspects : f/g
- % de positivité chez les les contrôle de traitement : m/n
- % de lames faiblement positives chez les suspects : b+c/f

Chaque laboratoire calcule ses propres indicateurs, trace un graphique de suivi, établit des valeurs moyennes, chaque écart important doit alerter le staff du laboratoire qui doit vérifier s'il y a un problème et l'origine de l'écart

Le taux de de frottis + quantifiables (1-9 BAAR): est un bon reflet des performances diagnostiques du laboratoire

(Nbre de frottis + quantifiables (1-9 BAAR) / Nbre total des frottis +) x 100.

3. CONTROLE DE QUALITE EXTERNE

Trois méthodes peuvent être combinées pour évaluer les performances du laboratoire :

- Evaluation sur site
- Jeu de lame de contrôle (panel de lame)
- Relecture en aveugle des lames au laboratoire central

Pour ce contrôle chaque laboratoire est tenu de garder toutes les lames après leur lecture dans une boîte de conservation

Les lames doivent être clairement identifiées par le numéro de laboratoire et rangées par ordre successif. Elles sont au préalable nettoyées de toute trace d'huile (si la coloration utilisée est le Ziehl Neelsen).

Après relecture sur place lors de la supervision ou relecture en aveugle d'une sélection de lame envoyée au laboratoire central; les lames peuvent être éliminées.

Le contrôle externe par jeu de lame consiste à recevoir périodiquement (une à deux fois par an) des lames préparées par le niveau central, à les examiner et à renvoyer le résultat dans les délais fixés par le LNRM.

4. LE REGISTRE DE LABORATOIRE DE BACILLOSCOPIE

La tenue du registre de bacilloscopie a une importance primordiale pour la détection des nouveaux cas à bacilloscopie positive.

Son exploration doit être aisée, il est à la base de toutes les statistiques biologiques relatives à la situation de la tuberculose dans une région donnée. Il permet le suivi et le contrôle des malades en cours de traitement. Ce registre doit être tenu avec rigueur et fidélité.

La bonne tenue de ce registre est de rigueur.

ANNEXES

- **LISTE DE MATERIEL NECESSAIRE à la MICROSCOPIE**
- **PREPARATION DES REACTIFS**
 - **COLORATION DE ZIEHL-NEELSEN**
 - **COLORATION FLUORESCENTE A L'AURAMINE**
- **ENTRETIEN des MICROSCOPES**
- **REGISTRE DE LABORATOIRE -EXAMEN MICROSCOPIQUE ET XPERTMTB/RIF-**
- **REGISTRE DE LABORATOIRE POUR LA CULTURE ET LES TESTS DE SENSIBILITÉ**
- **BON DE DEMANDE D'EXAMEN BACTÉRIOLOGIQUE:EXAMEN MICROSCOPIQUE/ CULTURE / TEST DE HAIN / GENEXPERT/TEST DE SENSIBILITÉ ET LPA**
- **RAPPORT D'ACTIVITÉ DE BACILLOSCOPIE DANS LES STRUCTURES SANITAIRES**
- **TRANSPORT DES PRÉLÈVEMENTS :LISTE DES PRÉLÈVEMENTS ENVOYÉS AU LABORATOIRE DE DIAGNOSTIC**
- **GRILLE DE SUPERVISION DE L'UNITE BACILLOSCOPIE**
- **CONTROLE DE QUALITE DE LA BACILLOSCOPIE –Jeu De Lames**

LISTE DE MATERIEL NECESSAIRE A la MICROSCOPIE

EQUIPEMENT :

- **Microscope Binoculaire Optique ou à immunofluorescence LED**
- **Autoclave**
- **Réfrigérateur**

ACCESSOIRE

- **Crachoirs**
- **Lames porte objet**
- **Anse de platine**
- **Ballon sable + alcool**
- **Pinces**
- **Bec bunsen**
- **Porte lame coloration**
- **Papier filtre**
- **Entonnoir**
- **Coton cardé**
- **Pissette**
- **Papier absorbant**
- **Minuterie**
- **Marqueur à pointe diamant**
- **Stylo Marqueur**
- **Masques**
- **Gants**
- **Matériel de transport : triple emballage**
- **Boites de rangement de lames**
- **Huile à immersion**
- **Sceau Poubelle fermé + sachets**
- **Placard**
- **Tabouret**
- **Table + chaise de bureau**
- **Unité d'informatique**
- **Signalisation danger...**
- **Solution de lavage des mains**
- **Solution hydro-alcoolique**

Guide de laboratoire

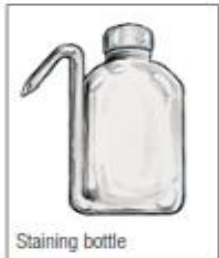
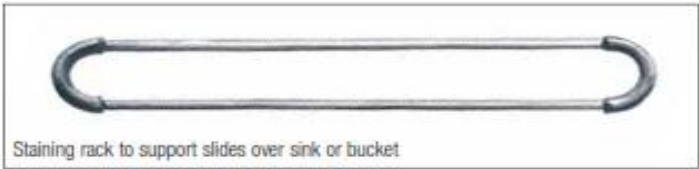
Registre de laboratoire

Demandes d'examen

Fiches de rapport

Bon de commande

Fiches de gestion de stock



PREPARATION DES REACTIFS

COLORATION DE ZIEHL-NEELSEN

1- Fuchsine phéniquée de ZIEHL 1%

-Réactifs

- Fuchsine basique:..... 10g
- Ethanol..... 100ml
- Phénol cristallisé..... 50g
- Eau distillée.....900ml

-Préparation

- Mettre 100 ml d'éthanol dans un flacon de 1 litre
- Ajouter 50g de phénol en cristaux et dissoudre
- Ajouter 10 g de Fuchsine basique
- Bien mélanger jusqu'à dissolution
- Ajouter l'eau distillée QSP 1 l
- Laisser 24H - Filtrer
- Etiqueter : « Fuchsine phéniquée de Ziehl 1% » date de préparation et initiale du préparateur
- Conserver dans des flacons brun à température ambiante pendant 1 an

Remarque : les vapeurs de phénol et le phénol cristallisé sont toxiques et peuvent causer des brûlures. Manipuler prudemment et dans un local bien aéré.

2- Solution de décoloration (acide- alcool) :

-Réactifs :

- Acide Chlorhydrique fumant.....30ml
- Ethanol 95%.....970ml

-Préparation :

- Ajouter lentement l'acide dans l'alcool
- Etiqueter : « **Acide- alcool à 3%** » - date de préparation et initiales du préparateur
- Conserver cette solution dans un flacon brun à l'obscurité et à température ambiante, pendant 1 an

3- Contre coloration: Bleu de méthylène à 0,1%

-Réactifs :

- Bleu de méthylène1g
- Eau distillée.....1000 ml

-Préparation :

Ajouter le bleu de méthylène dans l'eau distillée

Etiqueter « **Bleu de méthylène à 0,1%** » date et initiales du préparateur

Conserver à température ambiante ; Délai d'expiration: 1an

COLORATION FLUORESCENTE A L'AURAMINE

1- Auramine 0.1% :

Réactifs :

- Auramine
- Ethanol
- Phénol cristal
- Eau distillée

Préparation

Solution A :

- Auramine 10 g
- Ethanol ou méthanol..... 1000 ml

Verser l'auramine en pluie dans l'alcool en agitant jusqu'à dissolution totale

Etiqueter : « **Solution alcoolique auramine à 1%** » et date de préparation et initiales du préparateur

Conserver cette solution à 1% dans un flacon brun à l'obscurité et à température ambiante ;

Délai d'expiration: 1an

Solution B :

- Phénol Cristal.....30g
- Eau distillée.....900 ml

Dissoudre en agitant

Etiqueter : « **Phénol aqueux à 3% pour auramine** » et date de préparation et initiales du préparateur

Conserver cette solution dans un flacon brun à l'obscurité et à température ambiante

Délai d'expiration: 1an

Solution de travail : auramine à 1%

Verser lentement 500 ml de la solution A dans un flacon brun

Ajouter 500 ml de la solution B en agitant.

Etiqueter : « Auramine à 0,1% » date et initiales du préparateur

Conserver dans un flacon teinté à température ambiante

Délai d'expiration: 2 mois.

Filtrer avant de colorer les lames.

Remarques :

- l'auramine est un produit cancérigène, manipuler avec des gants,

- les vapeurs de phénol et le phénol cristallisé sont toxiques et peuvent causer des brûlures.

Manipuler prudemment et dans un local bien aéré.

Se laver les mains après chaque manipulation

1- Solution de décoloration (acide- alcool) :

Réactifs :

- Acide Chlorhydrique fumant.....5ml
- Ethanol ou méthanol.....1000ml

Préparation :

Ajouter lentement l'acide dans l'alcool

Etiqueter : « **acide- alcool à 0,5%** » et date de préparation et initiales du préparateur

Conserver cette solution dans un flacon brun à l'obscurité et à température ambiante ; Délai d'expiration: 1an

2- Contre coloration:

- **Bleu de méthylène à 0,3%**

Réactifs :

- Bleu de méthylène3g
- Eau distillée.....1000 ml

Préparation :

Ajouter le bleu de méthylène dans l'eau distillée

Etiqueter « Bleu de méthylène à 0,3% » date et initiales du préparateur

Conserver à température ambiante ; Délai d'expiration: 1an

- **Permanganate de potassium à 0,5%**

Réactifs :

- Permanganate de potassium.....5g
- Eau distillée.....1000 ml

Préparation :

Ajouter le Permanganate de potassium dans l'eau distillée

Etiqueter « Permanganate de potassium à 0,5% » date et initiales du préparateur

Conserver cette solution dans un flacon brun à l'obscurité et à température ambiante ; Délai d'expiration: 1an

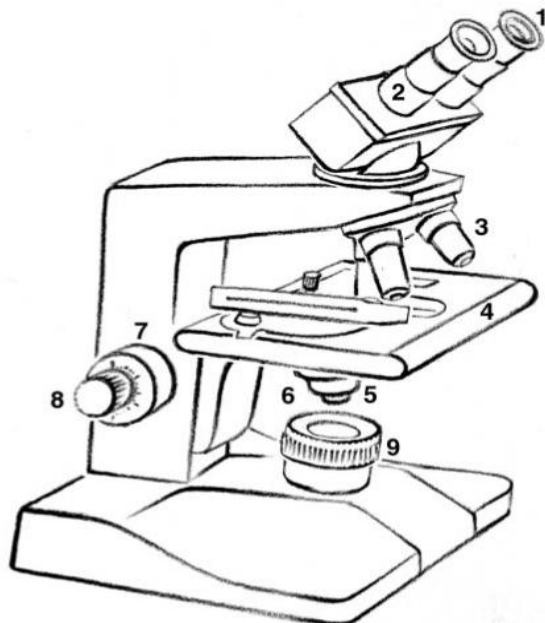
Remarque : le Permanganate de potassium est un agent oxydant, il peut causer des brûlures :. Le manipuler avec précaution

Si la solution de Permanganate de potassium vire du pourpre au rouge, elle s'est oxydée il faut la remplacer par une nouvelle préparation.

ENTRETIEN DES MICROSCOPES

Le microscope est l'outil principal des services de diagnostic de la tuberculose du PNLT. Une manipulation correcte et l'entretien du microscope par l'équipe du laboratoire sont essentiels pour prolonger sa durée d'utilisation. Il y a lieu de respecter les données suivantes :

- Le microscope doit être placé dans un environnement sec, sur un support stable, à l'abri de la poussière ou des vibrations (loin des centrifugeuses et réfrigérateurs).
- Eviter d'exposer le microscope à la lumière solaire directe, aux moisissures et à l'humidité
- Utiliser de l'huile à immersion synthétique de moyenne viscosité (index de réfraction >1,5),. Elle est bon marché et facile à éliminer des lames et du système optique du microscope. Par contre, Il ne faut jamais utiliser d'huile de cèdre
- Nettoyer le microscope avant et après usage au moyen d'un papier pour lentille.
- Ne jamais nettoyer aucune partie du microscope au xylène.
- Enlever la poussière avant d'utiliser un nettoyant liquide. Il existe des nettoyants optiques spéciaux mais il est possible d'utiliser de l'alcool à 90° ou un mélange 1/3 alcool et 2/3 éther selon les cas.
- Utiliser peu de liquide ne pas tremper les objectifs
- Utiliser du papier optique fin pour ne pas rayer les objectifs et les oculaires sinon du papier toilette fin
- Ne pas utiliser du papier ordinaire ou du coton ou de la gaze pour nettoyer objectifs
- Couvrir le microscope après usage



- 1: Oculaire,
2: Cercles d'objectifs,
3: Objectif,
4: Platine,
5: Condensateur,
6: levier du diaphragme,
7: Vis macrométrique pour mise au point grossière,
8: vis micrométrique pour mise au point de lecture,
9: source de lumière

Nettoyage des objectifs

En premier lieu, il ne faut pas démonter les objectifs mais les nettoyer en étant attachés au microscope.

- Imbiber le papier avec le nettoyant et faire les mêmes mouvements intérieurs vers l'extérieur pour essuyer.
- Pour les objectifs à immersion (x100), ne jamais oublier d'essuyer l'huile après chaque utilisation. Après cela, nettoyer avec un papier imbibé de nettoyant.
- Pour les objectifs à sec, nettoyer seulement avec un chiffon imbibé d'alcool ou d'alcool/éther. Eviter le contact de l'huile à immersion sur ces objectifs. Si cela arrive accidentellement baisser la platine, tourner le porte objet, essuyer l'objectif qui a été souillé et nettoyer avec le nettoyant optique.
- Vérifier avec une loupe les éventuels défauts sur les lentilles

Nettoyage des oculaires

- Chassez les poussières en soufflant avec le souffleur ou la poire soufflante.
- Nettoyer avec un coton-tige imbibé de solution de nettoyage pour lentilles. Pour cela, faire des mouvements circulaires de l'intérieur vers l'extérieur, c'est-à-dire du centre vers le bord.
- Essuyer les lentilles avec du papier optiques qui ne raye pas.

Nettoyage du plateau

- Essuyer avec une solution nettoyante et un chiffon doux ou un coton-tige selon les recoins. Laisser le plateau sécher et répéter les étapes selon le besoin.
- Pour les condensateurs et les lentilles auxiliaires, il suffit aussi de nettoyer avec une lingette trempé dans du nettoyant. Toujours en partant du centre, faire le nettoyage et essuyer ensuite avec un coton-tige ou du papier optique.

Le nettoyage du tube optique ne se fait pas systématiquement mais si besoin, utiliser une bombe à gaz neutre (on en trouve dans les matériels informatiques) pour pouvoir chasser les poussières.

En cas de problème avec la lumière ou l'éclairage; Verifier:

la position du porte objectif,

- l'état de l'ampoule ou du câble d'alimentation. Dans le cas où les lampes ou le fusible sont cassés, ils ne peuvent être réparés. Par contre ces pièces peuvent être remplacées en prenant compte les références du microscope.
- Pour remplacer l'ampoule, il faut éviter de la toucher avec les doigts, utiliser un tissu.

Ne jamais désassembler un microscope

Faire appel à un spécialiste en cas de besoin.

Registre de laboratoire pour la culture et les tests de sensibilité

(Page 1)

N° Laboratoire	Date de réception	Nom et Prénom du Malade	Sexe	Age	Adresse complète et téléphone	Structure sanitaire d'origine	Date de collecte de l'échantillon	Date d'inoculation de l'échantillon	Motif de l'examen	
									Diagnostic	Contrôle

(Page 2)

Résultats PCR : identification	Résultats PCR : Sensibilité				Résultats de la culture		Résultat des DST							Nom et Prénom du technicien	Signature	Date de rendu du résultat	Commentaires	
	R	H	E	S	Richesse colonie	<i>Mycobact</i> identifié	R	H	E	S	Injectable	FQ	Autre					
<i>Mycobact.</i> identifié																		

Mycobact. Identifié : écrire le nom de l'espèce de mycobactérie identifiée

-Richesse colonie : écrire «NEG » si o colonie observée ; «nb exact de colonies comptées » si 1 – 100 colonies ; « ++ » si 100 – 200 colonies ; «+++ » si plus de 200 colonies

-Résultat DST : écrire « R » si résistant ; « S » si sensible

طلب الفحص البكتريولوجي و الزرع و الحساسية
Examen microscopique/ culture / test de Hain / GeneXpert/Test de sensibilité et LPA

CDT المركز.....
الاسم الكامل للمريض

Nom et prénom du malade :

38 تاريخ الميلاد سنينه الجنس
Age (ans): Date de naissance Sexe: M F

العنوان الكامل الهاتف
Adresse complète..... Téléphone :

إصابة رئوية : مكان الإصابة :
Localisation : Pulmonaire Extrapulmonaire (préciser):

التشخيص : سبب الفحص :
Motif de l'examen : Diagnostic Isthbaah
presomption de TB/ RR ou TB/MR Oui Non

متابعة شهر العلاج :
 Suivi Mois de traitement :

الإصابة بالسيدا : نعم لا غير محدد
Infection VIH Oui Non Indéterminée

عولج سابقا من السل : نعم لا غير محدد
Déjà traité pour TB Oui Non Indéterminé

العينة : القشع عينة أخرى
Spécimen Crachat Autre

الإختبار المطلوب : المجهرى :
Tests demandés : Microscopie GeneXpert
 Culture ATB Hain
المزرعة

اسم و توقيع طالب الفحص
Non et signature du demandeur de l'examen
تاريخ طلب الفحص
Date de la demande de l'examen :

Résultats de l'examen microscopique (A compléter par le laboratoire)

Date de collecte du prélèvement	Type de prélèvement	N° de laboratoire	Crachats hémoptoïques, purulents ou salivaires	Résultats				
				Négatif 0 BAR/ 100 champs	1-9 BAR/ 100 champs	+ 10-99BAAR/ 100 champs	++ 1- 10BAAR/c hamp	+++ >10 BAAR/cha mp

Examiner par (Nom et signature) :

Date des résultats :

Résultats de Xpert MTB/RIF (A compléter par le laboratoire)

Date de collecte du prélèvement :

M. Tuberculosis DéTECTÉ Non détecté invalide, pas de résultat, erreur

Résistance à la Rifampicine DéTECTÉE Non détectée Résultats Indéterminé

Examiner par (Nom et signature) :

Date des résultats :

Résultats de la culture (A compléter par le laboratoire)

Date de collecte du prélèvement	Milieu utilisé (liquide ou solide)	N° de laboratoire	Résultats						
			Négative 0 colonies	1-9 < 10 colonies	+10-100 colonies	++ > 100 colonies	+++ Incomptables, confluentes	MNT	contaminée

MNT: M. non- tuberculosis

Examiner par (Nom et signature) : _____

Date des résultats : _____

Résultats du test de sensibilité aux antibiotiques
(A compléter par le laboratoire)

Date de collecte du prélèvement	Méthode ²	N° de laboratoire	Résultats ³												
			H	R	E	S	Amk	Kan	Cm	FQ	autre	autre	autre	autre	

² Spécifier : milieu solide ou liquide, LPA directe ou LPA indirecte

³ Résultat : S (sensible), R(résistant), C (contaminé), N.F (non fait)

Résultats du test LPA 2^{ème} ligne (Line Probe Assay)

(A compléter par le laboratoire)

.....

Examiné par (Nom et signature) :

Date des résultats :

تقرير عن نشاط الفحوص المخبرية للقشع علي مستوى المركز الصحي
RAPPORT D'ACTIVITE DE BACILLOSCOPIE DANS LES STRUCTURES SANITAIRES

Trimestre :Année : 20.....

إن التموين بالمستهلكات المخبرية مرهون بإرسال هذا التقرير الفصلي

L'approvisionnement en colorants par le LNRM est conditionné par la transmission de ce rapport.

RUBRIQUE	 TRIMESTRE			OBSERVATIONS ملاحظات
		1 ^{er} mois	2 ^{ème} mois	3 ^{ème} mois	
Nombre d'examen des crachats de dépistage effectué	BK positif				
	BK négatif				
Nombre d'examen effectué 3 fois					
Nombre d'examen effectué 2 fois					
Nombre d'examen effectué 1 fois					
Nombre de contrôle	BK positif				
	BK négatif				
Nombre d'examen de dépistage du VIH effectué	Positif				
	Négatif				
Quantité de lames utilisées					
Quantité de colorants utilisés (en ml) :					
- Fuchsine phéniquée :					
- Bleu de méthylène :					
- Acide Alcool :					
Qté huile d'immersion utilisée (en ml)					

المشاكل التي تعرقل إجراء فحوص المشاكل التي تعرقل إجراء فحوص
القشع.....

المشاكل الفنية التي تصادفكم : المشاكل الفنية التي تصادفكم :

الأدوات و المعدات التي تنقصكم : الأدوات و المعدات التي تنقصكم :

الملاحظات:.....الملاحظات:

Le responsable du laboratoire

Laboratoire National de Référence des Mycobactéries (LNRM)

Transport des prélèvements

Liste des prélèvements envoyés au laboratoire de diagnostic

Nom du laboratoire			
Adresse :			
Wilaya :الولاية			
CDT :المركز الصح			
PS :النقطة الصحية			
Liste des prélèvements			
Nom Prénom des patients	Prélèvement 1	Prélèvement 2	Prélèvement 3
Emballé par			
Nom		Signature	
Date d'expédition		Heure	

GRILLE DE SUPERVISION DE L'UNITE BASCILLOSCOPIE

DATE : ___ / ___ /

DRAS DE : _____

DISTRICT DE : _____

LABORATOIRE DE : _____

SUPERVISEURS: _____ / _____ / _____ /

PERSONNE(S) SUPERVISEE(S) : _____ / _____ /

I. RESSOURCES HUMAINES

- EFFECTIF DU LABORATOIRE: /___/
- QUALIFICATION DU RESPONSABLE DE LABORATOIRE : _____
- NOMBRE DE TECHNICIENS SUPERIEURS EN BIOLOGIE: /___/
- NOMBRE DE TECHNICIENS DE LABORATOIRE : /___/
- NOMBRE DE TECHNICIENS FORMES SUR LA MICROSCOPIE : /___/
- DATE DE LA DERNIERE FORMATION PAR LE PNLTL : /___/___/___/
- Y-A-T-IL UN TECHNICIEN DE SURFACE ? OUI /___/ NON /___/

II. AMENAGEMENT / PROPRETE / EQUIPEMENT DU LABORATOIRE

- NOMBRE DE PIÈCES : _____/
- DIMENSIONS (EN M2) : _____/
- LE LABORATOIRE EST-IL ALIMENTE EN EAU COURANTE DE FAÇON PERMANENTE ? OUI /___/ NON /___/
- LE LABORATOIRE EST-IL ALIMENTE EN ELECTRICITE DE FAÇON PERMANENTE ? OUI /___/ NON /___/
- L'ÉCLAIRAGE PAR LES RAYONS SOLAIRES EST-IL SUFFISANT ? OUI /___/ NON /___/
- LE LOCAL EST-IL PROPRE ET BIEN RANGE? (OBSERVATION) OUI /___/ NON /___/
- COMBIEN DE MICROSCOPES FONCTIONNELS Y A-T-IL SUR PLACE? _____/
- ORDINAIRE /___/ MIF /___/
- NOTER LA (LES) MARQUE(S): _____
- EXISTE-T- IL DES FICHES DE VIE POUR CHAQUE APPAREIL ? OUI /___/ NON /___/
- LA VENTILATION AU NIVEAU DU LABORATOIRE EST-ELLE APPROPRIEE ? (SIMULATION SUR DIRECTION DU COURANT D'AIR AU MOMENT DE L'ÉTALEMENT, VOIR LA POSITION DU SPLIT PAR RAPPORT AU MANIPULATEUR), VENTILATION MECANIQUE :

OUI /___/ NON /___/

SI NON POURQUOI ?-----

- Y A-T-IL UN BEC BUNSEN FONCTIONNEL? OUI /___/ NON /___/
- LE MANUEL DES PROCEDURES POUR LA MICROSCOPIE EST-IL DISPONIBLE? OUI /___/ NON /___/
SI OUI (OBSERVATION)
- SI NON POURQUOI ?-----
- LA TECHNIQUE DE COLORATION EST-ELLE AFFICHEE ? OUI /___/ NON /___/
- SI NON POURQUOI ?-----
- DISPONIBILITÉ DU MATÉRIEL SUIVANT:
- COCOTTE-MINUTE/AUTOCLAVE PISSETTES ENTONNOIRS
- PAPIER FILTRE : MINUTERIE ANSES DE PLATINE
- BOITES A LAMES : LENS TISSUE GLACIERES +ICE-PACK:

III. EVALUATION DE LA QUALITE DE LA TECHNIQUE

- NOMBRE D'ÉCHANTILLONS PAR PRESUME : /___/
- COMMENT SONT-ILS RECUEILLIS ? 1 SUR PLACE-1 LE MATIN AU 2EME JOUR-
- SI AUTRE TECHNIQUE, DÉCRIRE :
- _____
- OU SONT RECUEILLIS LES CRACHATS ?

- QUELLE EST LA PROPORTION DE CRACHATS SALIVAIRES : (DURANT LE TRIMESTRE PRECEDENT) : /___/
- QUELLE EST LA TECHNIQUE DE COLORATION UTILISEE PAR LE TECHNICIEN?

ZIEHL-NEELSEN A CHAUD: **FLUORESCENCE:**

- NOMBRE DE LAMES LUES PAR JOUR (MOYENNE) : /___/
- LE DELAI DE RENDU DES RESULTATS APRES LA RECEPTION DU DERNIER ECHANTILLON : _____
- LE TECHNICIEN COMMUNIQUE LES RESULTATS :

AU MALADE : AU MEDECIN : INFIRMIER DU TRI : RESPONSABLE DU CDT

- LES HEURES DE RECEPTION DES PRELEVEMENTS : _____
- A QUELLE PERIODICITE LE TECHNICIEN FAIT-IL UN CONTROLE DE QUALITE DES SOLUTIONS DE COLORATION ?

TOUS LES JOURS **CHAQUE SEMAINE** **A LA RECEPTION DE NOUVEAU LOT** **NON FAIT**
SI NON FAIT, POURQUOI ?

- DATE DE PEREMPTION DES SOLUTIONS DE COLORATION _____

FUCHSINE /___/

ACIDE-ALCOOL /___/

AURAMINE /___/

BLEU DE METHYLENE /___/

V. EVALUATION DE LA QUALITE DE L'ENREGISTREMENT

- LE REGISTRE STANDARD DE BACILLOSCOPIE DU PNLTL EST-IL UTILISE? OUI /___/ NON /___/
- EST-IL A JOUR? OUI /___/ NON /___/
- SI NON, POURQUOI? _____
- NOMBRE DE MALADES ENREGISTRES DURANT LE DERNIER TRIMESTRE : _____
- PROPORTION DE NOUVEAUX CAS POSITIFS/ TOTAL DES NOUVEAUX CAS AU COURS DU DERNIER TRIMESTRE : _____

- PROPORTION DE SUIVIS POSITIFS AU 2IEME MOIS / TOTAL DES SUIVIS AU 2IEME MOIS AU COURS DU DERNIER TRIMESTRE: _____
- NOMBRE DE FROTTIS NEGATIFS / IF _____

VI. CONTROLE DE QUALITE DE LA MICROSCOPIE

- LES LAMES SONT-ELLES CONSERVEES PAR LE TECHNICIEN? OUI /___/ NON /___/
 - o SI NON POURQUOI _____
- LES LAMES SONT-ELLES CONSERVEES SUIVANT LES RECOMMANDATIONS DU PNLTL?
 - o OUI /___/ NON /___/
 - o SI NON POURQUOI? _____
- QUI SELECTIONNE LES LAMES ? SUPERVISEUR /___/ POINT FOCAL TB /___/
 TECHNICIEN DE LABO /___/ MICROSCOPISTE /___/ BIOLOGISTE REGIONAL /___/

- LE CONTROLE DE QUALITE EXTERNE DE LA MICROSCOPIE EST-IL FAIT REGULIEREMENT ?
 OUI /___/ NON /___/

- LA RETRO-INFORMATION PARVIENT-ELLE AU LABO? OUI /___/ NON /___/
 SI OUI, COMMENT ? _____
 SI NON, POURQUOI ? _____

VII. BIOSECURITE

- A QUELLE CONCENTRATION LE DESINFECTANT EST- IL UTILISE ? _____
- A QUELLE FREQUENCE EST-IL RENOUVELE ? QUOTIDIENNEMENT : PAR SEMAINE :
 AU BESOIN :
- A QUELLE FREQUENCE SE FAIT LE NETTOYAGE DU LIEU DE TRAVAIL?

- UTILISATION APPROPRIEE DES BLOUSES DE LABORATOIRE :
 - o NOMBRE DE BLOUSES PAR TECHNICIEN : _____
 - o LA BLOUSE EST-ELLE A MANCHES COURTES : OUI /___/ NON /___/
 - o LA BLOUSE EST-ELLE A MANCHES LONGUES : OUI /___/ NON /___/
 - o LE TECHNICIEN FERME-T-IL LES BOUTONS ? OUI /___/ NON /___/
 - o LA BLOUSE EST-ELLE PORTEE HORS DU LABORATOIRE ? OUI /___/ NON /___/
- L'UTILISATION DES GANTS EST-ELLE APPROPRIEE : OUI /___/ NON /___/
 QUANTITE PAR MOIS : _____
- FORMATION SUR LES MESURES DE SECURITE AU LABORATOIRE PAR LE PNLTL? OUI /___/ NON /___/
- COMMENT SONT ELIMINES LES CRACHOIRS CONTAMINES?
 INCINERATION DIRECTE :
 INCINERATION APRES DECONTAMINATION :
 JETES DIRECTEMENT A LA POUBELLE :
- Y A- T-IL UN INCINERATEUR / BRULEUR FONCTIONNEL DANS LE CS / HOPITAL? OUI /___/NON /___/

VII. APPROVISIONNEMENT EN COLORANTS ET AUTRES MATERIEL DE LABORATOIRE

- Y A-T `IL EU DES RUPTURES AU COURS TRIMESTRE ECOULE ? OUI /___/ NON /___/
- SI OUI DUREE DE LA RUPTURE : _____
- QUELS SONT LES PRODUITS CONCERNES ? _____
- EXISTE-T-IL DES FICHES DE STOCKS ? OUI /___/ NON /___/
- SONT-ELLES BIEN TENUES ? OUI /___/ NON /___/
- SONT-ELLES BIEN A JOUR ? OUI /___/ NON /___/

- LES FICHES DE COMMANDES SONT-ELLES DISPONIBLES ? OUI /___/ NON /___/
- LES COMMANDES SONT-ELLES TRIMESTRIELLES ? OUI /___/ NON /___/

POINTS FORTS :

POINTS A AMÉLIORER :

RECOMMANDATIONS :

Laboratoire National de Référence des Mycobactéries

CONTROLE DE QUALITE DE LA BACILLOSCOPIE

Référence Contrôle de qualité :...../...../200..CQT/MAU

Lames préparées et envoyées par le LNRM- Nouakchott

Nom de HR/CDT

Date d'envoi des lames :

-Réponses attendue avant le :

Numéro ou code des lames	Résultats du laboratoire de bacilloscopie de la structure sanitaire impliquée	Résultats du LNRM	Observations

Il faut mentionner:

La technique de coloration utilisée : à chaud à froid

Les colorants utilisés : 1 2.

Date d'envoi des résultats du laboratoire de bacilloscopie

Nom du responsable de la bacilloscopie et signature :.....

En vous remerciant de votre participation, veuillez agréer, cher participant, l'expression de nos remerciements

A remplir par le LNRM

Date de réception des résultats au LNRM.....

Date d'expédition des résultats corrigés au laboratoire de bacilloscopie..... (Avec copie DRAS)

XII. REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Laboratory diagnosis of tuberculosis by sputum microscopy – The hand book. GLI- Stop TB Partnership
- 2- GLI Practical Guide to TB Laboratory Strengthening. 2017
- 3- GUIDE TECHNIQUE Diagnostic de la tuberculose par examen microscopique direct des expectorations dans les pays à faibles revenus - Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires 2000
- 4- Priorités pour les services de bactériologie de la tuberculose dans les pays à faibles revenus Deuxième édition 2007 - Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires
- 5- Diagnostic de la tuberculose Guide de laboratoire. PNLT - Tunisie 2011
- 6- Prise en charge de la tuberculose : Guide des éléments essentiels pour une bonne pratique- 6^{ème} édition 2010- Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires
- 7- Contrôle externe de la qualité de la microscopie directe d'expectoration pour la recherche de bacilles acido-alcool résistants. APHL, CDC, IUATLD, KNCV, RIT, OMS ? Octobre 2004.

PROGRAMME NATIONAL DE LUTTE CONTRE LA TUBERCULOSE

FICHE DE COMMANDE POUR LE MATÉRIEL DE LABORATOIRE

Inscrire le nombre de nouveaux cas TP15 du dernier semestre (selon le « Rapport trimestriel sur le dépistage des tuberculeux »)

Item	Quantité requise pour 1 000 lames	Nombre de malades	Facteur ¹	Quantité requise pour 6 mois de fonctionnement	Quantité pour 1 année de réserve	Actuellement en stock	Commande totale A + B - C = D
				A	A x 2 = B		
Fuchsine	15 g		x 0,5 g =				
Bleu de méthylène	15 g		x 0,5 g =				
Huile à immersion	100 ml		x 3,3 ml =				
Acide sulfurique	1 250 ml		x 41 ml =				
Phénol	250 g		x 6,3 g =				
Méthanol	500 ml		x 17 ml =				
Lames	1 000		x 30 =				
Crachoirs	1 000		x 30 =				

Les calculs sont basés sur les consommations des besoins suivants pour une lame : 5 ml de fuchsine, 5 ml d'acide sulfurique à 25% et 5 ml de bleu de méthylène. Les quantités de réactifs nécessaires pour 1 000 lames sont indiquées dans la 2^e colonne. Ces quantités ont servi de base pour calculer les besoins correspondants à un cas diagnostiqué.

¹Le facteur est basé sur l'assomption que 10 suspects ont eu des examens par disque des positifs à lames dracour et 3 examens de suivi par le cas dépisté.