

GUIDE TECHNIQUE

**Diagnostic de la tuberculose
par examen microscopique
direct des expectorations
dans les pays à faibles revenus**

**Cinquième édition
2000**

**Union Internationale Contre la Tuberculose
et les Maladies Respiratoires**
68 boulevard Saint Michel, 75006 Paris, France

COMITÉ DE RÉDACTION

Mohammed Akhtar
Gisela Bretzel
Fadila Boulahbal
David Dawson
Lanfranco Fattorini
Knut Feldmann
Thomas Frieden
Marta Havelková
Isabel N de Kantor
Sang Jae Kim
Robert Küchler
Frantz Lamothe
Adalbert Laszlo
Nuria Martin Casabona
A Colin McDougall
Håkan Miörner
Graziella Orefici
C N Paramasivan
S R Pattyn
Ana Reniero
Hans L Rieder
John Ridderhof
Sabine Rüsç-Gerdes
Salman H Siddiqi
Sergio Spinaci
Richard Urbanczik
Véronique Vincent
Karin Weyer

A partir d'un avant-projet préparé par Adalbert Laszlo, pour l'Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires.

Conception graphique : Edik Balaian

Traduction française : Jacques Prignot

Édition : Fadila Boulahbal, Arnaud Trébuçq

PRÉFACE

Un guide technique pour l'examen microscopique direct des frottis d'expectoration, inspiré par celui élaboré en 1969 par le Dr J. Holm, à l'époque Directeur de l'Union Internationale Contre la Tuberculose, a été publié pour la première fois en 1978 par l'UICM sous forme de *Guide Technique concernant le Diagnostic de la Tuberculose par Microscopie Directe*. Ce guide a été inséré dans les troisième et quatrième éditions du *Guide de la Tuberculose pour les Pays à Faibles Revenus* éditées par l'UICM. Il a été conçu comme un simple standard de référence concernant le recueil, la conservation et le transport des échantillons d'expectorations, ainsi que pour l'examen des frottis d'expectoration par l'examen microscopique. Il visait à répondre aux besoins des travailleurs de la santé dans les pays à faibles revenus et à haute prévalence où se trouvait la grande majorité des cas de tuberculose dans le monde.

Depuis sa première publication, il y a plus de vingt années, ce guide est resté inchangé. Aujourd'hui, la tuberculose est une des causes principales de décès dus à un agent infectieux unique parmi les adultes dans les pays à faibles revenus, où elle reste un problème majeur de santé publique. Malgré d'importants progrès dans les technologies modernes de diagnostic, l'instrument de base pour les services de diagnostic de la tuberculose – la microscopie des frottis d'expectoration – n'a pas connu de modifications techniques. Toutefois, le contexte dans lequel il est appliqué, c'est à dire le Programme National de Tuberculose, s'est affiné de façon considérable au cours des deux dernières décennies.

L'utilisation du guide sur le terrain a révélé au fil des années des omissions et des manques de précision auxquels il fallait répondre. De plus, les aspects de sécurité contre la contamination et de contrôle de qualité de l'examen microscopique n'avaient pas été couverts suffisamment dans l'édition antérieure. On a donc pensé que le Guide Technique de l'UICM devait être révisé pour mieux refléter son caractère de santé publique et pour le maintenir en adéquation avec les stratégies modernes de lutte antituberculeuse. Ce document a été revu avec soin par les membres de la *Section Bactériologie et Immunologie* de l'UICM, par les directeurs du *Réseau de Laboratoires de Référence Supranationaux de la Tuberculose* de l'OMS et de l'UICM ainsi que par d'autres professionnels éminents dans le domaine de la lutte antituberculeuse.

DR ADALBERT LASZLO
Ottawa 2000

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION	67
2. LE LABORATOIRE DE MICROSCOPIE DES EXPECTORATIONS	67
2.1 Rôle du laboratoire	67
2.2 Conformation physique du laboratoire	67
2.3 Matériel nécessaire	68
2.4 Préparation des colorants pour le Ziehl-Neelsen	69
• Carbol fuchsine de Ziehl.....	70
• Solution aqueuse de phénol	70
• Solutions d'agent décolorant.....	70
• Solution de contre-coloration au bleu de méthylène.....	70
3. RECUEIL ET TRANSPORT DES PRÉLÈVEMENTS	71
3.1 Les prélèvements	71
3.1.1 Prélèvements pour le diagnostic	71
3.1.2 Prélèvements pour le suivi du traitement	71
3.2 Mode de recueil des expectorations	72
3.3 Les crachoirs	73
3.4 Transport des échantillons d'expectoration	74
3.5 Enregistrement du patient	74
4. PRÉPARATION DES FROTTIS POUR L'EXAMEN MICROSCOPIQUE	74
4.1 Identification des lames	74
4.2 Confection de l'étalement	77
4.3 Fixation du frottis	78
4.4 Coloration du frottis	78
4.4.1 Méthode de coloration de Ziehl-Neelsen.....	78
• Coloration	78
• Décoloration.....	79
• Contre-coloration.....	79
4.4.2 Qualité de l'étalement et de la coloration.....	80
5. EXAMEN MICROSCOPIQUE DES FROTTIS D'EXPECTORATION	81
5.1 Le microscope	81
5.2 Utilisation du microscope	81
5.3 Examen microscopique des frottis	81

5.4 Echelle de positivité des résultats de l'examen au microscope des expectorations	83
5.5 Enregistrement et communication des résultats de l'examen microscopique	84
5.6 Conservation des frottis en vue de l'assurance qualité	84
6. ASSURANCE QUALITÉ DE L'EXAMEN MICROSCOPIQUE DES EXPECTORATIONS	85
6.1 Définitions	85
6.2 Procédures.....	85
7. BIOSÉCURITÉ AU LABORATOIRE DE MICROSCOPIE POUR LA TUBERCULOSE	86
7.1 Aspects généraux.....	86
7.2 Aspects spécifiques.....	86
8. GESTION DES PRODUITS.....	88
RÉFÉRENCES.....	92
LECTURES SUGGÉRÉES	92
Annexe 1	93
• Prévention des faux positifs en microscopie.....	93
• Conséquences des faux positifs en microscopie.....	93
• Prévention des faux négatifs en microscopie.....	93
• Conséquences des faux négatifs en microscopie.....	93
Annexe 2	94
• Entretien du microscope.....	94
Annexe 3	95
• Guide pour la solution des problèmes de microscopie.....	95

1. INTRODUCTION

Dans les pays à faibles revenus et à prévalence élevée de tuberculose, l'examen microscopique des frottis d'expectoration – ou bacilloscopie – est, et restera probablement dans un avenir prévisible le seul outil

Les objectifs des laboratoires de la tuberculose au sein d'un PNT sont :

- le diagnostic des cas contagieux responsables de la transmission du bacille de la tuberculose dans la communauté ;
- le suivi du traitement jusqu'à la guérison.

acceptable en terme de coût-efficacité pour diagnostiquer les patients atteints de tuberculose contagieuse et pour suivre leurs progrès sous traitement. L'examen microscopique des frottis d'expectoration est une technique simple, peu coûteuse et appropriée, relativement aisée à exécuter et à lire. On obtient des résultats appropriés avec une sensibilité très élevée pour la détection des sujets transmettant les bacilles tuberculeux ; elle fournit la plupart des indicateurs essentiels de laboratoire et d'épidémiologie nécessaires pour l'évaluation du Programme National de Tuberculose (PNT).

2. LE LABORATOIRE DE MICROSCOPIE DES EXPECTORATIONS

2.1 Rôle du laboratoire

Dans les pays en développement, le plus grand nombre des diagnostics bactériologiques de tuberculose est assuré dans les laboratoires périphériques dont la responsabilité principale est de fournir au PNT l'examen microscopique de diagnostic, en se basant sur une bacilloscopie des expectorations après coloration de Ziehl-Neelsen (ZN). Ces laboratoires, localisés dans les centres de santé, les postes de santé, les hôpitaux, etc., ont habituellement du personnel technique qualifié, apte à exécuter, parmi d'autres obligations, la bacilloscopie des frottis d'expectoration. Ils devraient être aptes à assurer les fonctions suivantes :

- pratiquer toute les bacilloscopies d'expectoration demandées dans leur zone de recrutement, habituellement un district (50 000-150 000 habitants) ;
- servir de centre de référence pour les unités de recueil d'échantillons ;
- coordonner avec les Laboratoires Régionaux (intermédiaires) le transfert d'échantillons pour lesquels les cultures ou les tests de sensibilité aux médicaments sont indiqués ;
- recueillir les échantillons pendant les heures d'ouverture du Centre de Santé ;

- envoyer les informations au Laboratoire Régional ;
- respecter les directives nationales d'assurance qualité ;
- commander, gérer et stocker les fournitures de laboratoire.

2.2 Conformation physique du laboratoire

L'aménagement détaillé du laboratoire de microscopie peut varier considérablement selon les situations locales. Il est difficile de fournir un schéma modèle applicable de manière générale car au fil du temps, dans beaucoup de pays, les services de diagnostic de la TB ont été intégrés dans les services de diagnostic d'un laboratoire général. Idéalement, le laboratoire de bacilloscopie pour la TB devrait comprendre diverses sections distinctes (Figure 1) (adapté de Collins et coll¹) :

- un espace pour une pailleasse ou pour une table (A) pour les échantillons entrants (Figures 1 et 2) ;
- une pailleasse de travail bien éclairée (B) pour la préparation des frottis (Figures 1 et 3) ;

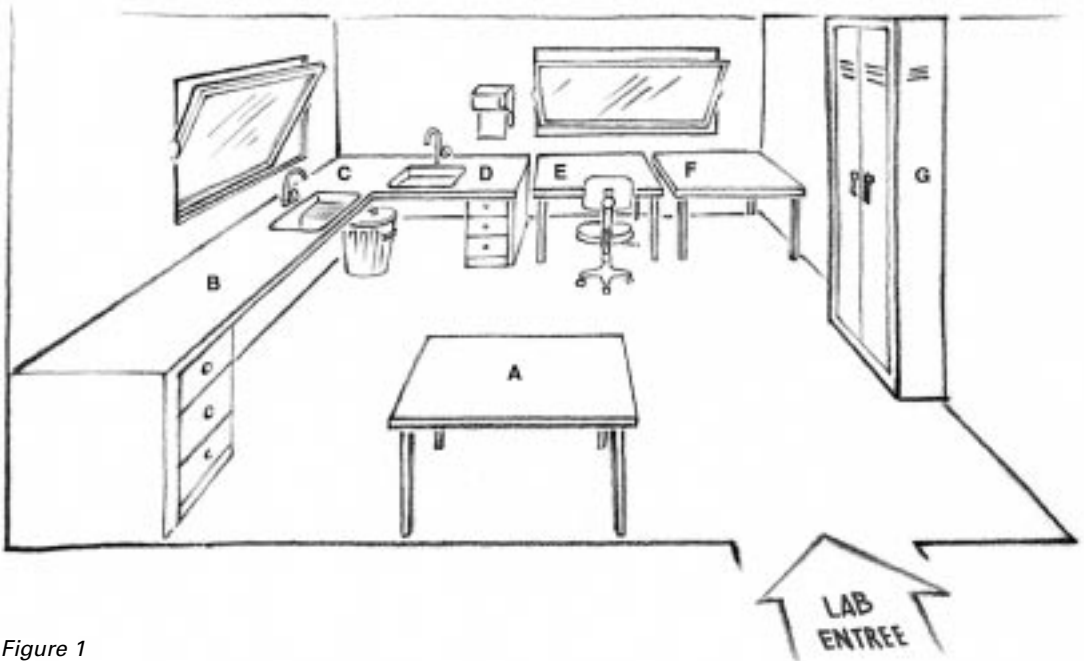


Figure 1

- un évier de coloration (C) muni d'eau courante (Figures 1 et 4) ;
- un évier (D) muni d'eau courante pour le lavage des mains ;
- une zone de paillasse (E) pour la lecture au microscope, juste devant une fenêtre (Figures 1 et 5) ;
- une zone de paillasse ou une table (F) pour les registres du laboratoire et la zone de conservation des lames (Figures 1 et 6) ;
- une armoire (G) pour les vêtements des techniciens (Figure 1).

Si la paillasse est en matériel poreux, une plaque plane non poreuse en formica, en marbre, en métal galvanisé ou en aluminium devrait recouvrir la paillasse. Ce plateau devrait avoir une largeur de 80 cm et des rebords hauts de 5 cm. Le rebord antérieur doit être rabattu à 90° pour épouser le bord de la table et faciliter ainsi les manipulations (Figure 3). Ces dernières doivent se faire strictement au dessus du plateau, qui devrait être décontaminé chaque jour après utilisation, en l'imbibant avec un germicide antituberculeux (par exemple du phénol à 5 % ou une solution à 0,1 % d'hypochlorite de soude* [NaClO], connue aussi comme blanc de ménage, Chlorox, Javel, etc.).

2.3 Matériel nécessaire

Les détails du matériel sont mentionnés à la Figure 3

1. Porte-lames pour la préparation des frottis
2. Séchoir pour les lames
3. Crachoir placé le plus près possible à droite du porte-lames
4. Applicateurs en bois
5. Lampe à alcool/Bec Bunsen

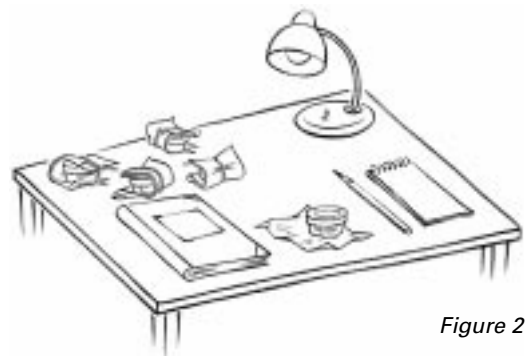


Figure 2

* Le blanc de ménage contient 5 % de NaClO (50 g/litre). On prépare une solution à 0,1 % contenant 1 g de NaClO/litre en diluant 20 ml de blanc de ménage dans 1 litre d'eau. Cette solution est utilisée comme un désinfectant à usage multiple dans les situations de « propreté relative ».

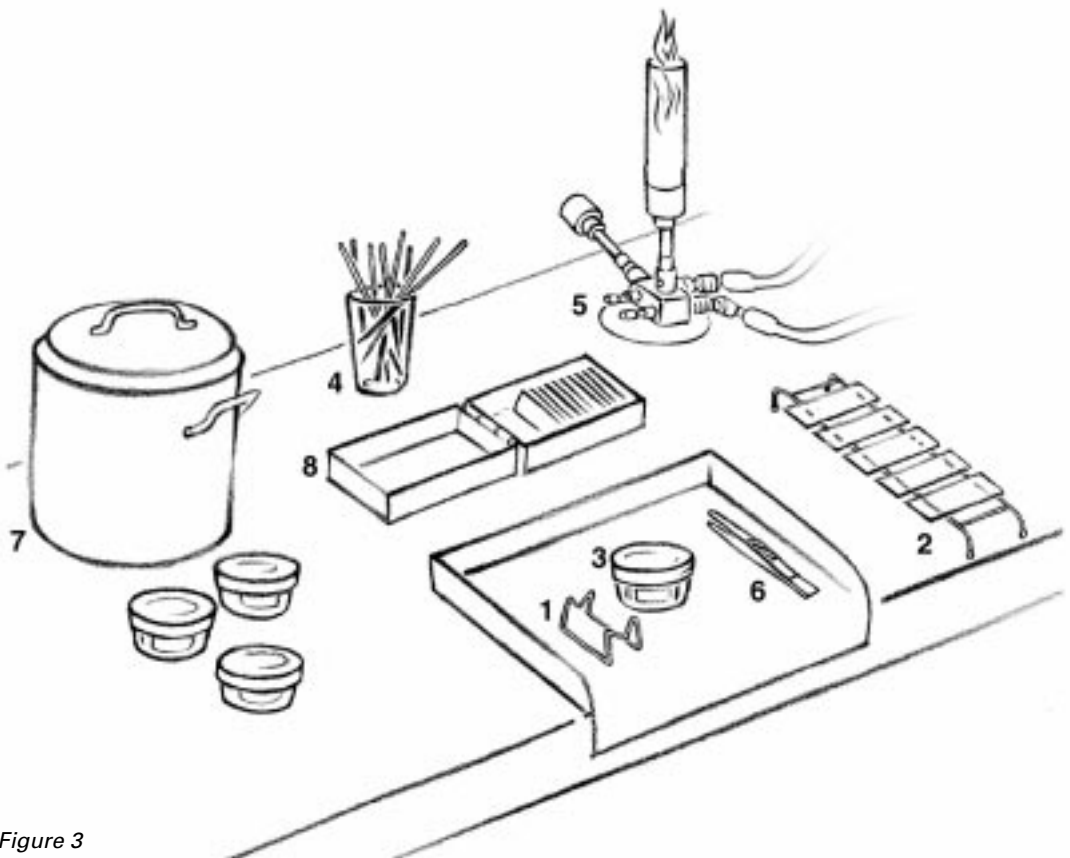


Figure 3

- | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Porte-lames pour la préparation des frottis 2. Séchoir pour les lames 3. Crachoir placé le plus près possible à droite du porte-lames 4. Applicateurs en bois | <ol style="list-style-type: none"> 5. Lampe à alcool / Bec Bunsen 6. Pince sans griffes 7. Poubelle métallique avec couvercle, destinée au recueil du matériel contaminé 8. Boîte de lames gravées pour les frottis |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

NOTE : Si le technicien est gaucher, il peut être plus pratique de disposer sur la table tous ou la plupart des éléments de la Figure 3 exactement en position inverse (c.-à-d. image en miroir).

2.4 Préparation des colorants pour le Ziehl-Neelsen

La méthode de choix pour la bacilloscopie des frottis d'expectoration est la coloration de Ziehl-Neelsen (ZN) car elle est la seule à fournir régulièrement de bons résultats

sans nécessiter un équipement spécial. Pour la préparation des réactifs nécessaires, il faut une balance, qui n'est pas toujours disponible dans un laboratoire périphérique : la préparation des réactifs au **Laboratoire National de Référence** ou dans le laboratoire intermédiaire le plus proche est dès lors l'option fréquemment choisie. Les avantages de cette option, c'est à dire une meilleure standardisation et une meilleure garantie de qualité, l'emportent sur les inconvénients d'une conservation prolongée. Les techniques de coloration à froid comme les méthodes de **Kinyoun** ou de **Tan Thiam Hok** ne sont pas recommandées : il est prouvé qu'elles ne permettent que difficilement la détection de bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) dans les échantillons paucibacillaires et que la coloration pâlit rapidement. La microscopie à

fluorescence, qui est recommandée lorsque la charge de travail quotidienne dépasse 50 échantillons, n'a pas sa place dans la plupart des laboratoires périphériques des pays à faibles revenus.

a) Carbol fuchsine de Ziehl

Solution stock de fuchsine alcoolique à 3 % (solution A)

Fuchsine basique* 3 g[†]
Alcool 95 %[‡] jusqu'à 100 ml

Placer la quantité requise de fuchsine dans un flacon (ou dans un cylindre) gradué et ajouter la quantité d'éthanol ou d'alcool méthyle nécessaire pour obtenir un volume total de 100 ml ; bien agiter jusqu'à dissolution complète. De petites quantités de cette solution doivent être filtrées préalablement à la coloration.

b) Solution aqueuse de phénol (solution B)

Cristaux de Phénol[§] 5 g
Eau distillée, si possible..... jusqu'à 90 ml

Avant d'ajouter l'eau, liquéfier les cristaux de phénol dans un flacon en les chauffant légèrement.

Pour préparer la solution de travail de fuchsine phéniquée de Ziehl, mélanger 10 ml de la **solution A** à 90 ml de la **Solution B**.

c) Solutions d'agent décolorant

– Solution alcool-acide

Alcool 95 % 970 ml
Acide chlorhydrique
concentré (35 %) ** 30 ml

Ou quand l'alcool n'est pas disponible :

– Solution aqueuse d'acide sulfurique à 25 %

Eau, distillée si possible..... 300 ml
Acide sulfurique
concentré^{††} 100 ml

Placer 300 ml d'eau dans un flacon d'un litre du type Erlenmeyer. Ajouter lentement 100 ml d'acide sulfurique concentré en le laissant couler le long de la paroi du flacon. Le mélange va chauffer. **Ne jamais mettre l'eau dans l'acide sulfurique concentré ; ceci peut provoquer des éclaboussures explosives.**

d) Solution de contre-coloration au bleu de méthylène

Chlorure de bleu
de méthylène^{††} 0,3 g
Eau, distillée si possible . . jusqu'à 100 ml



Figure 4

* Chlorure de pararosanine, contenu minimal en colorant 88 % (C₁₉H₁₈NCl) Sigma P 1528 ou équivalent.

† Les poudres de colorant sont rarement pures, en sorte que la pesée doit être corrigée pour assurer une coloration adéquate. Le pourcentage de colorant disponible dans le contenu est fréquemment indiqué sur l'étiquette du récipient original. Le poids corrigé est obtenu en divisant la quantité de colorant désirée par la fraction décimale du colorant disponible. Par exemple, si la quantité de colorant désirée est de 3 g et le pourcentage de colorant disponible de 75 %, la quantité effective de colorant à peser est de 3/0,75 = 4 g de colorant impur. Si le contenu en colorant est de 88 % ou davantage, la pesée ne doit pas être corrigée.

‡ Ethanol 95 % (C₂H₅OH) - Pharmacopée des Etats-Unis XVIII, 20, 1067 (1970). La qualité industrielle est autorisée.

§ Phénol approximativement à 99 % (C₆H₆O) – Sigma P 3653 ou son équivalent.

** Acide chlorhydrique concentré (HCl) – La qualité industrielle est autorisée.

†† Acide sulfurique concentré (H₂SO₄) – La qualité industrielle est autorisée.

‡‡ Chlorure de methylthionine, contenu minimal en colorant 82 % (C₁₆H₁₈ClN₃S) – Sigma M 9140 ou son équivalent.



Figure 5



Figure 6

3. RECUEIL ET TRANSPORT DES PRÉLÈVEMENTS

3.1 Les prélèvements

3.1.1 Prélèvements pour le diagnostic

Dans les conditions de travail du PNT, il est recommandé de recueillir trois échantillons d'expectoration : un échantillon « SUR PLACE », c'est-à-dire lorsque le malade se présente à la consultation – un échantillon le lendemain matin au réveil à la maison, dit échantillon du « MATIN » – un troisième échantillon sera prélevé « SUR PLACE », lorsque le malade se présente de nouveau au laboratoire muni du prélèvement fait à la maison.

Les prélèvements devront être collectés de préférence au cours d'une période de deux jours, chez toute personne qui se présente dans les structures de santé, parce qu'elle a des symptômes respiratoires depuis plus de 3 semaines. Ces échantillons doivent être examinés au microscope au laboratoire le plus proche.

Un cas de tuberculose à microscopie positive est défini comme étant un sujet se présentant avec des symptômes respiratoires et dont au moins deux frottis d'expectoration sont positifs à l'examen microscopique.

Cette approche, appelée également **dépistage passif**, détecte environ 80 % des sujets suspects de TB positifs à l'examen du

1^{er} frottis d'expectoration, 15 % de plus grâce au second et les 5 % restants par le troisième.

3.1.2 Prélèvements pour le suivi du traitement

Le traitement de la tuberculose comporte deux phases : la **phase intensive** qui dure habituellement 2 à 3 mois et la **phase de continuation**, durant de 4 à 10 mois selon le type de traitement. Quel que soit le régime de traitement, un échantillon d'expectoration du « **MATIN** » doit être prélevé à la fin de la phase intensive du traitement pour déterminer si le patient peut passer à la phase de continuation si l'examen microscopique est négatif ou au contraire doit continuer la phase intensive si la microscopie reste positive. Il y a lieu de prélever un autre échantillon d'expectoration au 5^e mois de la phase de continuation pour contrôler l'évolution du patient et détecter un éventuel échec du traitement ainsi qu'un troisième au moment de l'achèvement de la chimiothérapie (6 ou 8^e mois), pour contrôler la guérison. Les échantillons d'expectoration à la fin du traitement sont souvent difficiles à obtenir, beaucoup de patients n'expectorent plus à ce moment. Le schéma exact des examens d'expectoration pour le suivi varie selon le régime de traitement et devrait être précisé dans le **manuel du PNT**.

Il est fortement recommandé de faire :

- l'examen de trois échantillons d'expectoration – « **SUR PLACE** » + « **DU MATIN** » + « **SUR PLACE** » – pour le diagnostic des cas de tuberculose.
- l'examen d'un échantillon unique d'expectoration « **DU MATIN** » à trois reprises pour le suivi du traitement : 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**.

3.2 Mode de recueil des expectorations

C'est au moment où les sujets suspects de tuberculose toussent que le risque de contamination pour les professionnels de la santé est le plus élevé. Pour cette raison, les échantillons d'expectoration devraient être prélevés à l'air libre, à l'abri des regards et aussi loin que possible d'autres personnes. A défaut, l'on devrait utiliser un local séparé et bien ventilé.

L'agent de santé chargé du recueil de l'expectoration devrait rassurer les sujets suspects de tuberculose en leur expliquant les raisons de l'examen et leur donner des indications sur la manière de tousser qui permet de produire une expectoration provenant de la profondeur du thorax. Si le patient est

capable de lire, on peut lui fournir en complément des instructions écrites.

Avant de refermer le crachoir, l'agent de santé devrait s'assurer que le volume de l'échantillon est suffisant (3 ml au moins) et qu'il contient non seulement de la salive mais aussi des produits visqueux ou purulents dont la présence augmente la sensibilité de la détection des bacilles par la microscopie. Toutefois, même si le prélèvement paraît salivaire, ou, comme cela se produit fréquemment dans les échantillons « sur place », si les volumes sont inférieurs à 3 ml, il faut néanmoins examiner l'échantillon car il est parfois susceptible de donner des résultats positifs.

Un échantillon d'expectoration doit être classifié par examen macroscopique comme « **salivaire** » lorsqu'il est constitué principalement de salive, comme « **muqueux** » si le mucus est dominant, comme « **purulent** » lorsqu'il est jaune comme du pus, comme « **muco-purulent** » lorsque des particules jaunâtres sont visibles au sein du mucus et comme « **sanglant** » lorsqu'il contient du sang. La présence de sang devrait toujours être notée car elle peut indiquer une maladie plus sévère et pourrait interférer avec la lecture du frottis.

L'agent chargé du recueil du crachat fournira un crachoir marqué du code du centre de santé et où l'identification du patient sera inscrite sur le corps du crachoir, jamais sur le couvercle (Figure 7 C). Il demandera à la per-

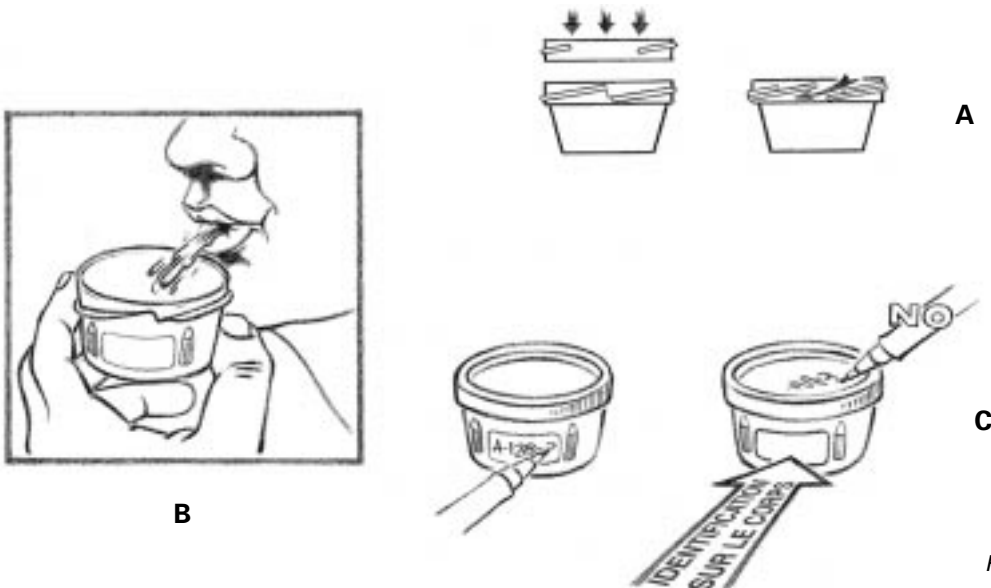


Figure 7

sonne subissant l'examen de tenir le crachoir près de la bouche et d'expectorer dans celui-ci (Figure 7 B). Cet échantillon est appelé un échantillon « **SUR PLACE** ». Si aucune expectoration n'est produite, le crachoir doit être considéré comme utilisé et être éliminé. Les crachoirs seront fermés hermétiquement et s'ils doivent être adressés à un laboratoire voisin, placés dans le coffret approprié destiné au transport. Après recueil, les échantillons seront enregistrés, conservés dans un endroit frais, transportés au laboratoire sans trop de délai, c'est à dire au moins deux fois par semaine et examinés au microscope dans les 24 heures.

Dans des situations très particulières où les structures de santé disposant de microscope sont éloignées des centres de santé, l'expectoration recueillie peut être étalée sur lame au centre de santé et ce sont les lames fixées qui sont alors adressées au laboratoire le plus proche. Toutefois, ce procédé est déconseillé si le personnel n'est pas sérieusement préparé à cette tâche, car les frottis fixés, ayant été préparés par un personnel non entraîné sont souvent d'une mauvaise qualité et les résultats obtenus ne sont pas fiables.

L'agent de santé fournira au malade un nouveau crachoir pré-étiqueté, lui expliquera comment il devra l'utiliser pour recueillir l'échantillon du « **MATIN** » et lui montrera la façon de fermer hermétiquement le crachoir avant de le rapporter au centre de santé.

3.3 Les crachoirs

Deux types de crachoirs peuvent être recommandés pour le recueil de l'expectoration dans le respect de la sécurité pour le malade et le personnel et celui de la qualité de l'expectoration recueillie. L'un que l'on trouve sur la liste des produits disponibles à l'UNICEF (Figure 7 A) est une boîte rigide à large ouverture et à couvercle fileté, en matière plastique transparente, incassable, facile à détruire par combustion. Il peut être utilisé pour un grand nombre de diagnostics de routine (expectoration, selles, par exemple). Son couvercle à pas de vis peut être fermé hermétiquement pour prévenir la dessiccation de l'échantillon et les fuites.

L'autre est un crachoir en verre épais, dont le couvercle métallique est lui aussi fileté, du type « Flaçon Universel » (Figure

8 A). Le « Flaçon Universel » peut être réutilisé après nettoyage soigneux et désinfection à l'autoclave pendant 30 minutes à 121 °C. Si un autoclave n'est pas disponible, on recommande l'emploi d'une casserole à pression du type ménager (cocotte-minute).

Quelque soit le type de crachoirs utilisé, s'ils doivent être transportés, il est recommandé d'utiliser des boîtes de transport adaptées au type de crachoir. On utilise des coffrets en métal, en bois ou en mousse de polystyrène, fabriqués sur commande. La boîte de transport en bois est un compromis raisonnable entre robustesse, poids et coût. Elle peut être fabriquée localement par le menuisier sur les recommandations fournies (Figure 8 B, C).

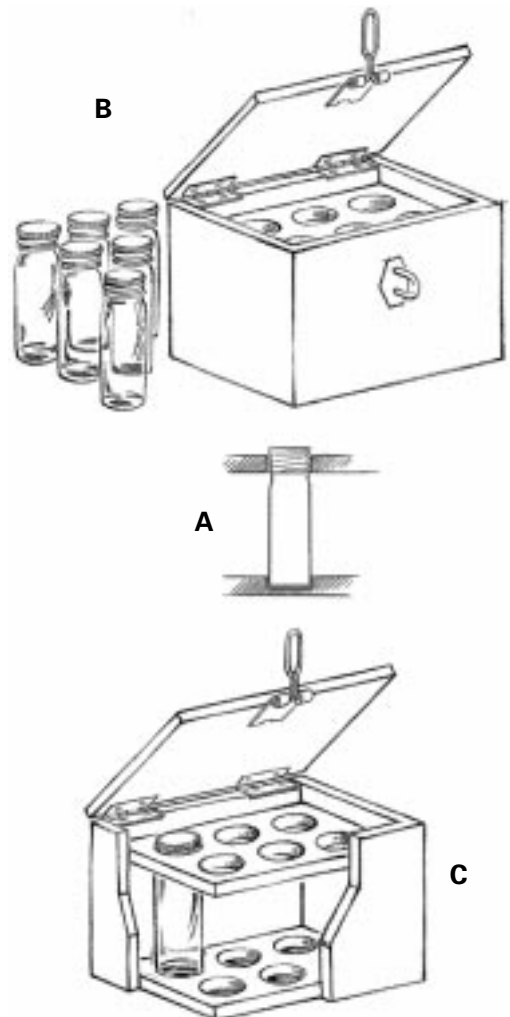


Figure 8

3.4 Transport des échantillons d'expectoration

Le transport des échantillons est nécessaire dans les pays où les équipements de laboratoire font défaut et où l'on fait appel à des unités de recueil des échantillons. De même, un transport est nécessaire lorsque des projets de recherche opérationnels intéressant le PNT sont entrepris, comme par exemple la surveillance de la résistance aux médicaments antituberculeux. Il y a lieu de sélectionner les moyens de transport les plus rapides et d'un rapport coût-efficacité optimal. La flore de contamination n'interfère pas sur l'acido-résistance des mycobactéries mais elle peut liquéfier l'expectoration, ce qui rend plus difficile l'étalement du frottis et rend la lecture moins fiable. Les échantillons devant être mis en culture, seront conservés au réfrigérateur en attendant leur envoi et devront arriver au laboratoire dans les 3 à 4 jours.

Les crachats seront accompagnés d'une liste identifiant les échantillons d'expectoration contenus dans le coffret de transport ainsi que le formulaire de *Demande d'examen d'expectoration* (Figure 9) pour chacun des échantillons. Avant l'envoi depuis la formation sanitaire, l'agent de santé vérifie pour chaque coffret :

- si le nombre total de crachats dans le coffret correspond à celui de la liste d'accompagnement et du nombre de formulaires de *Demande d'examen d'expectoration* ;
- si le numéro d'identification de chaque crachat correspond à celui inscrit sur la liste d'accompagnement et à celui inscrit sur le formulaire ;
- si les formulaires de *Demande d'examen d'expectoration* contiennent les informations

requis pour chacun des patients suspects de TB.

Après avoir achevé cette vérification, l'agent de la santé :

- note la date sur la liste d'accompagnement ;
- met cette liste ainsi que le formulaire de *Demande d'examen d'expectoration* dans une enveloppe qui sera fixée à l'extérieur du coffret de transport.

3.5 Enregistrement du patient

L'information provenant du formulaire de *Demande d'examen d'expectoration* sera entièrement transcrite aux endroits appropriés dans le *Registre de la Tuberculose au Laboratoire* (Figure 10). Toute l'information exigée dans le registre du laboratoire doit être reportée, c'est à dire qu'un espace blanc ne correspond pas à un **oubli d'enregistrement** mais à **l'absence d'information**.

Le registre du laboratoire de l'UICMTR a deux caractéristiques essentielles et utiles : il fait la distinction entre la bacilloscopie de l'expectoration pour diagnostic ou pour suivi et attribue une seule ligne à chaque patient suspect de tuberculose examiné et non à chaque échantillon d'expectoration examiné*.

Le numéro d'ordre du registre du laboratoire commence à 1 le 1^{er} janvier de chaque année et augmente de 1 à chaque patient jusqu'au 31 décembre de la même année.

* Ceci permet de chiffrer le taux de cas à bacilloscopie positive parmi les suspects, puis de planifier les commandes de fournitures de laboratoire à partir du nombre de cas à microscopie positive déclarés.

4. PRÉPARATION DES FROTTIS POUR L'EXAMEN MICROSCOPIQUE

4.1 Identification des lames

Le personnel de laboratoire inscrira pour chacun des échantillons le code du labora-

toire, le numéro d'ordre du registre du laboratoire ainsi qu'un identificateur de la séquence des échantillons, c'est-à-dire 1 pour le premier, 2 pour le deuxième et 3 pour le troisième prélèvement (Figure 11).

DEMANDE D'EXAMEN D'EXPECTORATION

Nom de l'Unité de Traitement _____ Date _____

Nom du malade _____

Age _____ Sexe (cocher la case) : M [] F []

Adresse précise _____

Raison de l'examen (cocher la case) : Diagnostic [] Examen de suivi []

Signature du responsable du recueil des crachats

=====

RÉSULTATS (à compléter au laboratoire)

N° d'ordre du laboratoire _____

Date	Echantillon	Aspect*	Résultats (cochez)				
			nég	1-9	+	++	+++
	1						
	2						
	3						

* caractéristiques de l'expectoration à l'œil nu (muco-purulent, traces de sang, salive)

Date _____ Examen effectué par (Signature) _____

=====

Le formulaire dûment rempli doit être rapidement transmis à l'Unité de Traitement

Figure 9. Formulaire de demande d'examen d'expectoration

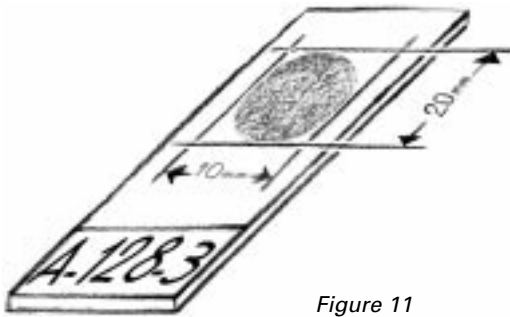


Figure 11

4.2 Confection de l'étalement

Les crachoirs seront disposés l'un derrière l'autre. Les numéros d'ordre du laboratoire doivent coïncider avec l'information correspondante sur le formulaire de *Demande d'examen d'expectoration* qui les accompagne. On recommande l'utilisation de lames neuves ; cependant, comme celles-ci sont souvent grasses, elles ont tendance à adhérer entre elles et ont besoin d'être nettoyées à l'alcool puis séchées soigneusement à l'air. Si l'on ne dispose pas d'alcool, les lames peuvent être placées sur une flamme pour éliminer les graisses. Dans les conditions atmosphériques prévalant dans la plupart des pays à faibles revenus, on recommande l'utilisation de lames tropicalisées (chaque lame est séparée de la suivante par une languette de papier imperméable). Le code du laboratoire, le numéro d'ordre et l'identification de la séquence peuvent être gravés au moyen d'un diamant-marqueur à une extrémité de la lame. Lorsqu'on ne dispose pas de diamant-marqueur, on peut utiliser une mèche dentaire déclassée, à pointe arrondie, ensermée dans l'extrémité conique d'un stylo en matière plastique³. Si l'on dispose de lames à extrémités dépolies, on peut employer un crayon ordinaire à mine de plomb.

- Vérifier qu'il y a concordance entre les numéros des lames et ceux des crachoirs.
- Prendre le crachoir correspondant au numéro de la lame.
- Ouvrir soigneusement le crachoir pour éviter la production d'aérosols.
- Briser un applicateur en bois ou en bambou (Figure 12), choisir des particules jaunes, purulentes dans l'expectoration avec l'extrémité déchiquetée de l'applicateur brisé. Utiliser l'extrémité brisée des deux morceaux

de l'applicateur pour dissocier les particules les plus grandes.

- Étaler l'expectoration régulièrement sur la zone centrale de la lame grâce à un mouvement continu de rotation (Figure 13) ; on recommande un étalement d'environ 20 mm sur 10 (Figure 11).
- Placer les lames sur le séchoir avec la surface d'étalement vers le haut et laisser sécher à l'air durant environ 30 minutes.
- Refermer le crachoir, qui ne devrait pas être éliminé avant que les résultats ne soient lus et enregistrés.

Les applicateurs ne peuvent être utilisés qu'une seule fois. Pour s'en débarrasser, les placer dans une poubelle contenant une solution aqueuse de phénol à 5 % ou une solution d'hypochlorite de soude à 0,5 %*, puis les passer à l'autoclave ou à l'incinérateur. **ATTENTION** : les vapeurs sont très toxiques

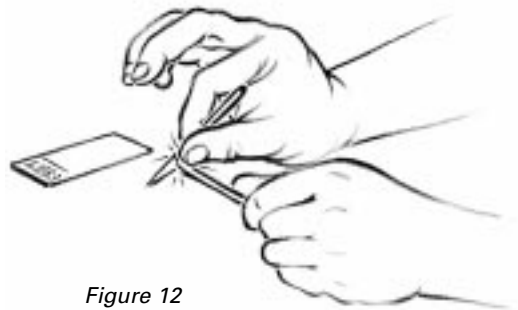


Figure 12

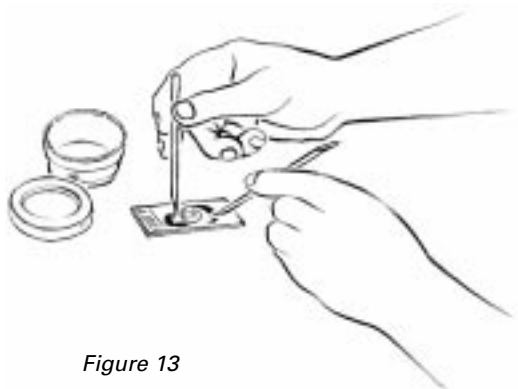


Figure 13

* L'hypochlorite de soude est un agent oxydant très puissant, corrosif pour le métal. On prépare une solution à 0,5 % contenant 5 g de NaClO/litre en diluant 100 ml de blanc de ménage dans 1 litre d'eau. Cette solution est utilisée en présence de « conditions de saleté ».

4.3 Fixation du frottis

Procéder à la fixation des lames séchées en les tenant avec une pince et en les passant sur la flamme 5 fois pendant environ 4 secondes, la face d'étalement tournée vers le haut (Figure 14). Ne pas fixer par la chaleur les lames humides et **éviter un échauffement excessif**.

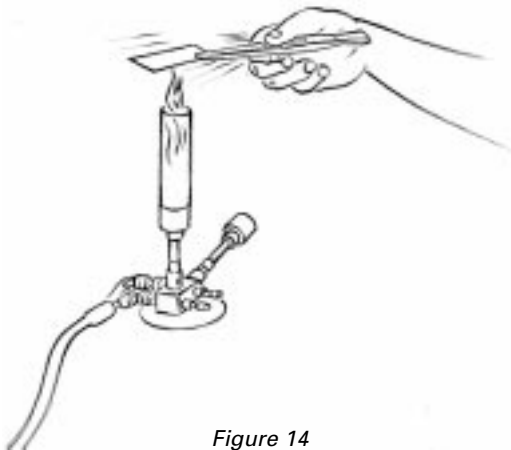


Figure 14

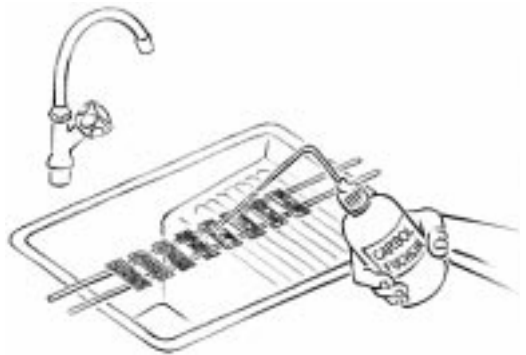


Figure 15

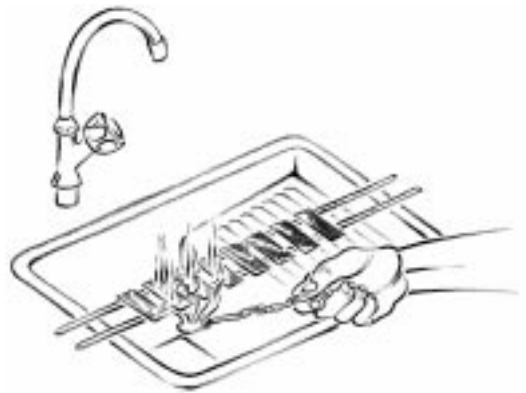


Figure 16

4.4 Coloration du frottis

4.4.1 Méthode de coloration de Ziehl-Neelsen

Coloration

- Placer les lames fixées sur le support de coloration selon leur numéro d'ordre, la face d'étalement vers le haut. Les lames devraient être séparées par un intervalle d'1 cm et ne jamais se toucher l'une l'autre.
- Recouvrir les lames l'une après l'autre au moyen de la solution de travail de **fuchsin phéniquée de Ziehl** à 0,3 % filtrée (Figure 15). En plaçant une bande de papier absorbant comme un papier filtre ou même du papier journal, on retiendra la solution de coloration et on évitera le dépôt de cristaux de fuchsin sur le frottis.
- Chauffer les lames par le dessous au moyen de la flamme d'un bec Bunsen, d'une lampe à alcool ou d'un tampon d'ouate imbibé d'alcool, jusqu'à émission de vapeur. Il ne faut jamais aller jusqu'à l'ébullition de la solution de colorant. **Ne pas laisser le colorant se dessécher** (Figure 16).

- Laisser les lames recouvertes d'une solution chaude et fumante de fuchsin phéniquée pendant 5 minutes en repassant la flamme si c'est nécessaire
- Rincer les lames délicatement à l'eau pour écarter l'excès de fuchsin phéniquée (Figure 17).

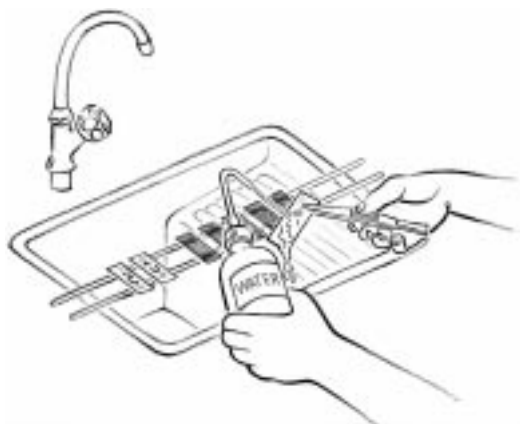


Figure 17

- Evacuer l'excès d'eau de rinçage des lames (Figure 18). Les frottis d'expectoration ont une couleur rouge.

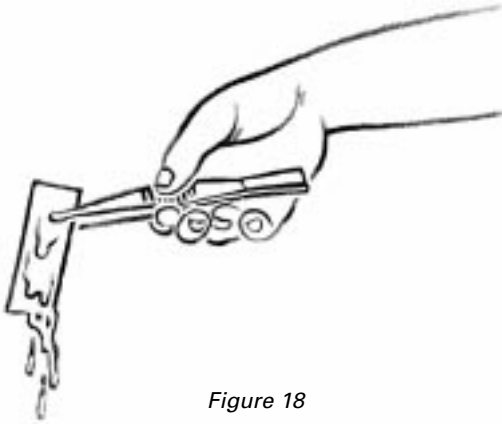


Figure 18

Décoloration

- Recouvrir les lames au moyen d'acide sulfurique à 25 % ou d'une solution d'alcool-acide et laisser agir pendant 3 minutes, après cela la coloration rouge devrait avoir presque disparu (Figure 19). En cas de nécessité, répéter cette séquence durant deux minutes supplémentaires.

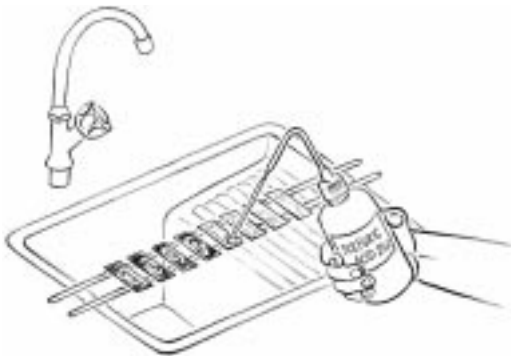


Figure 19

- Laver délicatement l'acide sulfurique ou l'alcool-acide et l'excès de colorant à l'eau (Figure 20). Evacuer des lames l'excès d'eau de rinçage (Figure 21).



Figure 20

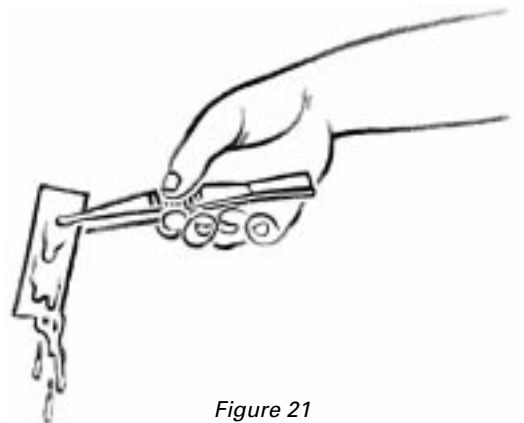


Figure 21

Contre-coloration

- Recouvrir les lames l'une après l'autre avec la solution de contre-coloration (bleu de méthylène à 0,3 %) et laisser agir pendant 1 minute (Figure 22).

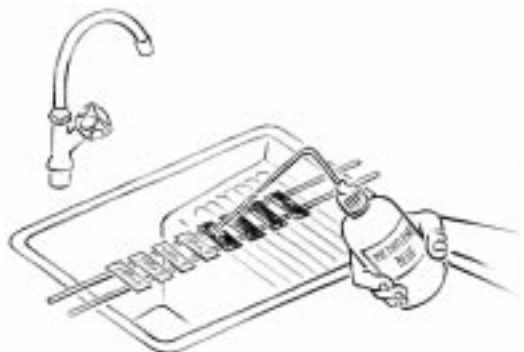


Figure 22

- Rincer les lames à l'eau individuellement (Figure 23).



Figure 23

- Evacuer l'eau des lames et les laisser sécher à l'air (Figure 24).

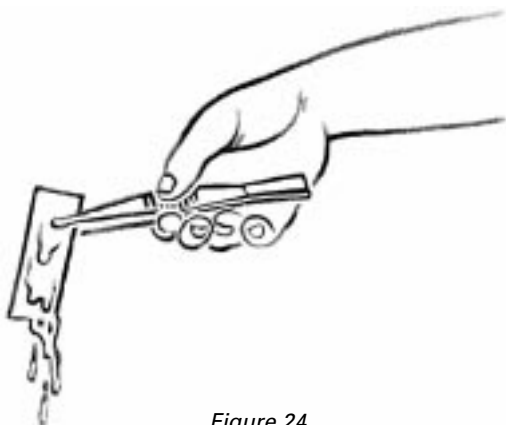


Figure 24

La technique de coloration de Ziehl-Neelsen demande :

- 5 minutes pour la coloration ;
- 3 minutes pour la décoloration ;
- 1 minute pour la contre-coloration.

4.4.2 Qualité de l'étalement et de la coloration

L'aspect d'un frottis coloré correctement est bleu clair sous l'effet du bleu de méthylène. Si la couleur est bleu foncé, le frottis est trop épais, dans ces conditions il n'est pas possible de lire un texte au travers de la lame :

- exemple d'un bon frottis (Figure 25).

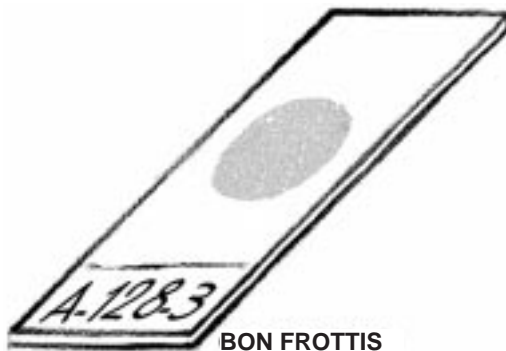


Figure 25

- exemples d'un mauvais frottis (Figure 26).

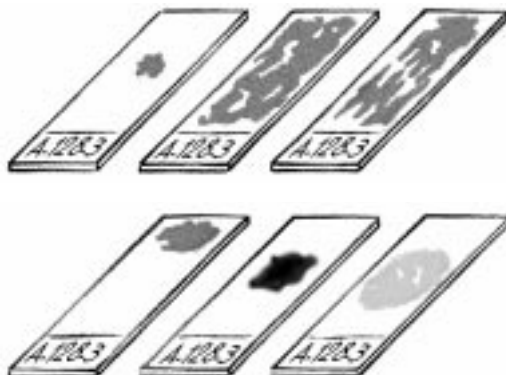


Figure 26

5. EXAMEN MICROSCOPIQUE DES FROTTIS D'EXPECTORATION

5.1 Le microscope

Pour l'examen des frottis, on doit disposer d'un microscope binoculaire à deux objectifs – un objectif standard d'agrandissement $40\times$ et un objectif à immersion d'agrandissement $100\times$ – ainsi que d'oculaires d'agrandissement moyen ($8\times$ ou $10\times$) (Figure 27).

On recommande vivement les microscopes munis d'une option de miroir focalisant la lumière, car ils sont utiles en cas de coupure d'électricité et nécessaires dans les laboratoires où celle-ci fait défaut. Le miroir a une surface plane pour la lumière artificielle et une surface concave pour la lumière naturelle. Une source de lumière est insérée dans la base du microscope ; une ampoule halogène assure un éclairage satisfaisant. Les lampes halogènes ont une luminosité plus élevée et une durée de vie plus longue que les ampoules au tungstène.

En dehors des périodes d'utilisation, les microscopes seront protégés de la poussière, de la chaleur et de l'humidité en les mettant dans leur coffret. Le système optique du microscope est constamment menacé par le développement de champignons. Cela peut être empêché en équipant le coffret d'une lampe de 20 watts que l'on tient allumée pendant l'entreposage du microscope. L'objectif, l'oculaire, le condenseur et la source lumineuse seront nettoyés chaque jour, en les essuyant au moyen d'un papier pour lentille.

5.2 Utilisation du microscope

Pour augmenter le pouvoir résolutif de l'objectif, il faut placer une goutte d'huile à immersion sur la lame colorée et sèche. L'applicateur d'huile à immersion ne doit pas toucher la lame afin d'éviter une contamination croisée par des **BAAR**. Le mieux est d'utiliser de l'huile à immersion synthétique. 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

comme huile à immersion car elle forme après séchage une pâte épaisse qui pourrait endommager les lentilles du microscope. Des moyens de fortune comme l'huile de lin, de palme ou d'olive ou la paraffine liquide donnent des résultats tout à fait insuffisants. Certaines huiles à immersion peuvent dissoudre la fuchsine⁴ : en conséquence, la coloration de ZN peut pâlir plus rapidement. Il y a lieu de recommander l'emploi d'hydrocarbures synthétiques et de polymères avancés à index de réfraction de 1,5, car ils ne sèchent pas, ne durcissent pas et n'ont pas de pouvoir dissolvant*.

La lame colorée est placée sur la platine, le condenseur étant relevé le plus possible. On ajuste la source lumineuse en vue d'un éclairage optimal en regardant dans l'oculaire avec l'objectif standard $40\times$.

On sélectionne une zone contenant plus de leucocytes (cellules de pus) que de cellules épithéliales (plus fréquentes dans la salive) avant d'y laisser tomber une goutte d'huile à immersion.

En abaissant lentement l'objectif à immersion, un fin film d'huile se forme entre la lame et l'objectif. On utilise alors la vis micrométrique pour la mise au point du champ. Il faut éviter que l'objectif touche la lame.

Des informations complémentaires sur l'utilisation et la manipulation du microscope se trouvent à la référence 5.

5.3 Examen microscopique des frottis

Les bacilles acido-résistants se présentent en rouge vif ou en rosé sur un fond contre-coloré en bleu. Leur forme est très variable (filaments courts ressemblant à des coques ou filaments allongés). Ils peuvent être colorés de façon uniforme ou inégale et peuvent

* Huile à immersion type A ou B (R.P. Cargille Labs, Inc. Cedar Grove, NJ. Catalogue N° 16484, ou huile à immersion de marque VWR, Resolve, Catalogue N° 48218, ou son équivalent).

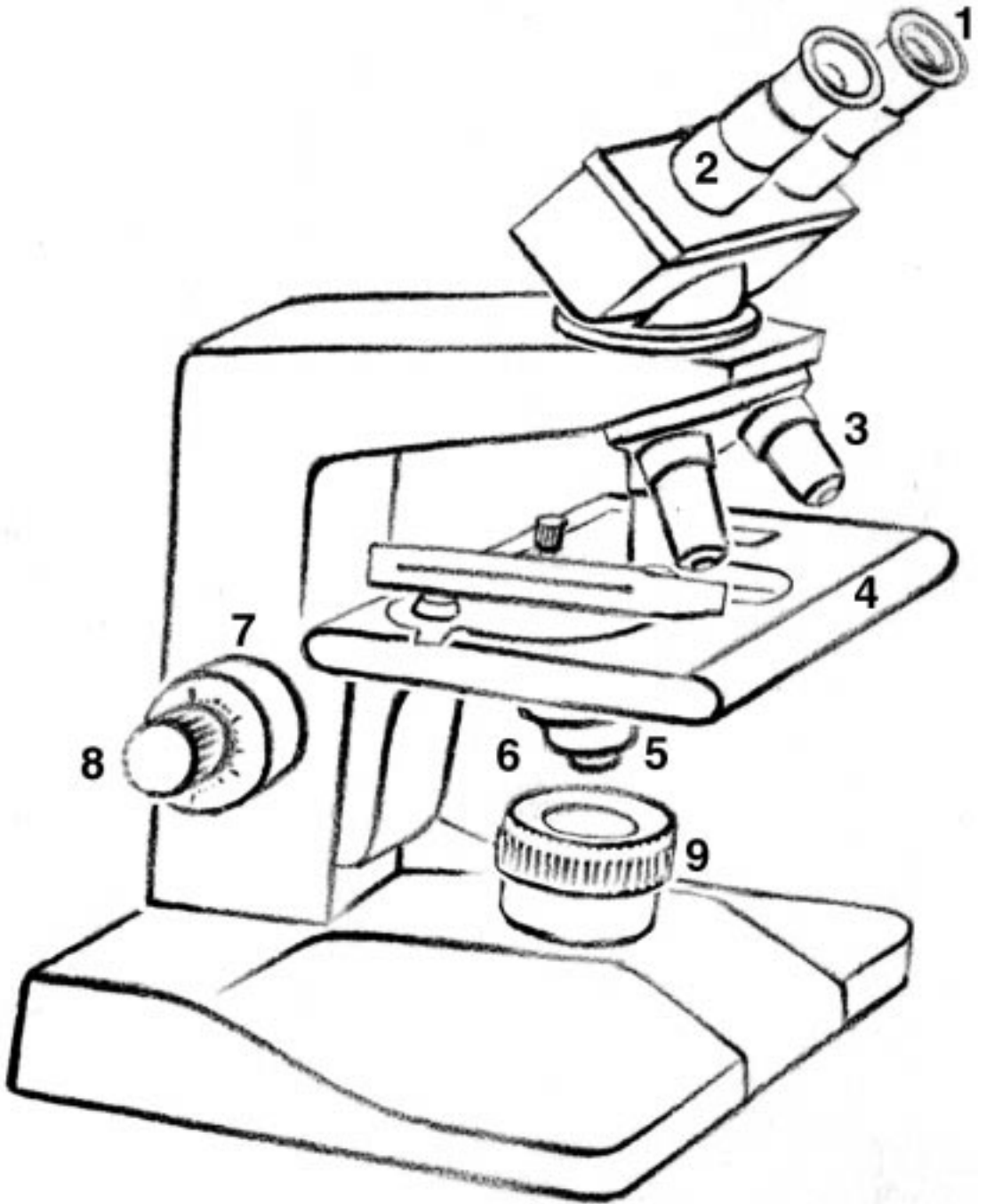


Figure 27

- 1) oculaire ; 2) cercle d'objectifs ; 3) objectif ; 4) platine ; 5) condenseur ;
6) levier de diaphragme ; 7) vis macrométrique pour mise au point grossière ;
8) vis micrométrique pour mise au point de lecture ; 9) source de lumière.

même paraître granuleux. Ils apparaissent isolément ou en amas de taille variable. Ils se présentent typiquement comme des bâtonnets incurvés, longs et effilés.

L'examen microscopique des frottis se fait selon une procédure systématique et standardisée qui débute à l'extrémité gauche du frottis, se poursuit sur une ligne du frottis en déplaçant la lame de gauche à droite, puis en la déplaçant d'arrière en avant on lit une deuxième ligne parallèle de droite à gauche, puis si nécessaire une autre ligne est examinée en allant de gauche à droite. Il y a environ 100 champs microscopique dans l'axe longitudinal d'un frottis de 2 cm. Trois lignes de frottis examinés correspondent à 300 champs microscopiques contrôlés. La lecture commence à la périphérie du champ et se termine au centre. (Figure 28).

Le microscopiste doit mettre environ 5 minutes pour lire 100 champs, et quand il travaille à temps plein, il ne faut pas s'attendre à ce qu'il prépare et lise par jour plus de 25 échantillons d'expectoration colorés au ZN. Il ne faut pas traiter en une fois plus de 10 à 12 échantillons. Toutefois, cette situation n'arrive que rarement, même dans les laboratoires périphériques de pays à haute incidence. Lorsque la microscopie des frottis d'expectoration pour TB est totalement intégrée dans les services généraux de soins de santé primaires, il est nécessaire d'assurer au microscopiste une charge de travail suffisante pour maintenir la compétence nécessaire à l'exécution du test.

5.4 Echelle de positivité des résultats de l'examen au microscope des expectorations

Les informations concernant le nombre de bacilles décelés sont très importantes car elles reflètent le degré de contagiosité du patient ainsi que la sévérité de la maladie. Pour cette raison, il faut formuler les résultats de la bacilloscopie des frottis d'expectoration de manière non seulement qualitative, mais aussi semi-quantitative. L'UICTMR recommande l'échelle suivante pour les résultats de bacilloscopie des frottis (Tableau 1).

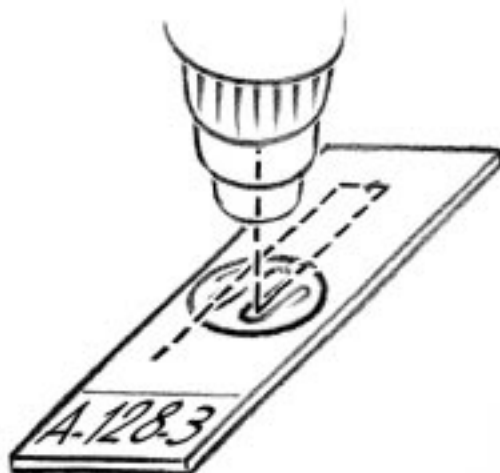


Figure 28

Tableau 1 Echelle de positivité des résultats de bacilloscopie des expectorations recommandée par l'UICTMR

Nombre de BAAR	Enregistrement / communication
Pas de BAAR sur au moins 100 champs	0 / négatif
1 to 9 BAAR sur 100 champs*	nombre réel de BAAR [†]
10 to 99 BAAR sur 100 champs [†]	+
1 to 10 BAAR par champ sur au moins 50 champs [†]	++
> 10 BAAR par champ sur au moins 20 champs [†]	+++

* La découverte de 1 à 3 bacilles sur 100 champs n'est pas en bonne corrélation avec la positivité de la culture. L'interprétation de la signification de ce résultat devrait être laissée au PNT et non au microscopiste. Il est recommandé de préparer un nouveau frottis provenant du même échantillon d'expectoration et de le réexaminer

[†] En pratique, la plupart des microscopistes lisent quelques champs et confirment leur observation par un balayage visuel rapide des champs restants.

[‡] On recommande de mentionner les décomptes réels de BAAR pour permettre à l'autorité compétente de déterminer si ce nombre coïncide avec la définition de cas du PNT.

Un bulletin indiquant un résultat positif pour un frottis d'expectoration est un document sur lequel repose le diagnostic de tuberculose pulmonaire. Lorsque c'est possible, les frottis positifs devraient être confirmés par un deuxième lecteur.

5.5 Enregistrement et communication des résultats de l'examen microscopique

Une fois que la lecture des frottis est terminée et les contrôles nécessaires éventuels assurés (frottis positif et frottis douteux), le microscopiste reporte les résultats définitifs sur le registre du laboratoire (les résultats positifs doivent être inscrits à l'encre rouge) et sur la fiche réponse (partie inférieure du formulaire de *Demande d'examen d'expectoration*), il inscrit la date de la lecture du frottis et présente le document à la signature du responsable du laboratoire.

Les formulaires de *Demande d'examen d'expectoration* seront renvoyés au centre de traitement ou au Médecin traitant dans les deux jours ouvrables. Si l'expectoration a été transférée à partir d'une autre unité de santé, le patient recevra une copie du formulaire rempli mais l'original sera adressé au centre de traitement. **Les résultats ne doivent jamais être remis seulement au patient.** Si le patient néglige de transmettre les résultats au centre de traitement, il se peut qu'il ne soit pas mis sous traitement.

Après avoir terminé l'examen de chaque lot de prélèvements, le technicien enregistre la date d'examen sur la liste d'envoi. Les coffrets de transport sont nettoyés au moyen d'un chiffon imbibé d'un germicide pour le bacille tuberculeux (phénol à 5 % ou hypochlorite de soude à 0,1 %). Le technicien assure le renvoi au centre de santé d'origine le plus tôt possible de la liste d'envoi correctement remplie et de la boîte de transport des

prélèvements. **Attention** : les deux solutions (phénol et hypochlorite de soude) sont extrêmement corrosives ; l'emploi de gants protecteurs est donc impératif.

5.6 Conservation des frottis en vue de l'assurance qualité

Les lames examinées seront conservées au laboratoire pendant la durée prescrite par le PNT pour permettre la supervision et la réalisation des tests de concordance (voir chapitre 6).

Les lames seront débarrassées de l'huile à immersion avant leur stockage dans des boîtes réservées à cet effet. On déconseille d'enlever l'huile à immersion de la lame en la prélevant par un papier pour lentille car le frottis pourrait être détaché de la lame et en outre, l'huile ne serait jamais complètement éliminée. On recommande d'enlever l'huile à immersion des lames en les trempant dans le xylène (xylol)* et en les séchant avant de les stocker dans des boîtes à lames jusqu'à la supervision suivante. Il y a lieu de conserver les lames positives et les lames négatives dans l'ordre numérique et dans des boîtes à lames séparées. Les boîtes de lames remplies doivent être fermées et gardées autant que possible à l'abri de la chaleur et de l'humidité jusqu'à ce qu'elles fassent l'objet d'un échantillonnage pour relecture. Les lames ne devraient être ni séchées ni emmagasinées sous une lumière à UV directe. L'échantillonnage et la relecture des lames seront pratiqués aussi vite que possible car la conservation prolongée des lames dans des conditions climatiques tropicales peut provoquer une atténuation de la coloration de ZN et entraîner des résultats de contrôle erronés.

* Xylène, Réactif ACS Sigma mélangé X 2377 ou son équivalent. Un substitut du xylène, plus sûr, moins toxique et moins inflammable est disponible⁶.

6. ASSURANCE QUALITÉ DE L'EXAMEN MICROSCOPIQUE DES EXPECTORATIONS

6.1 Définitions

L'assurance qualité de l'examen microscopique des expectorations est une composante obligatoire du programme de lutte contre la tuberculose. Elle concerne l'ensemble du processus, depuis le recueil des expectorations, la préparation du frottis, sa coloration, l'examen microscopique jusqu'à l'enregistrement et la communication du résultat.

Le but des programmes d'assurance qualité est d'améliorer l'efficacité et la fiabilité des services de microscopie des frottis. Les trois composantes principales d'un programme d'assurance qualité sont données ci-dessous.

- **Contrôle interne de qualité.** Le contrôle de qualité est un processus de suivi interne, effectif et systématique qui vise à détecter la fréquence des erreurs et à la comparer aux limites fixées pour une performance acceptable du test. Il s'agit d'un mécanisme à mettre en place dans tous les laboratoires pour qu'ils puissent au moins valider la compétence de leurs services de diagnostic.
- **Test de compétence.** Il est connu également comme Evaluation Externe de la Qualité. Il s'agit d'un programme visant à permettre aux laboratoires participants d'apprécier leurs capacités en comparant leurs résultats à ceux obtenus sur les mêmes échantillons dans d'autres laboratoires du réseau, par exemple les Laboratoires Régionaux ou Nationaux.
- **Amélioration de la qualité.** L'amélioration de la qualité est un processus par lequel les composantes des services de diagnostic par examen microscopique des frottis sont analysées afin d'examiner les moyens d'éliminer de façon permanente les obstacles qui s'opposent à leur succès. Le recueil des données, l'analyse des données, l'identification des problèmes et des solutions créatives pour ces problèmes sont les composantes-clé de ce processus. Il implique un suivi continu ainsi que l'identification des défaillances, suivis d'une action corrective pour prévenir la réapparition des erreurs.

6.2 Procédures

Le **contrôle de qualité interne** concerne plus particulièrement celui de la coloration. Les nouveaux lots de solutions de colorants doivent systématiquement être testés. Ceci implique habituellement la coloration de frottis non colorés, mais connus comme positifs et négatifs. De plus il est recommandé d'inclure dans chaque série de colorations quelques lames non colorées à résultat connu. En outre, la lecture des lames positives par un autre technicien est hautement souhaitée : en pratique toutefois, très peu de laboratoires périphériques disposent de deux microscopistes pour la tuberculose. Dans ce cas, le médecin responsable du centre doit être capable de relire les frottis positif ou douteux. Un contrôle du registre du laboratoire doit être effectué régulièrement par un autre responsable du centre ou par le médecin pour vérifier que toutes les rubriques prévues dans le registre sont correctement remplies, qu'il n'y a pas d'erreurs de report des informations et des résultats. Un aspect essentiel de l'assurance qualité réside dans l'observation directe des techniciens de laboratoire à tous les stades de leur travail de routine par un superviseur expérimenté.

Evaluation de la Compétence. Il y a quatre méthodes principales pour tester la compétence pour la **microscopie des crachats**.

- L'envoi de frottis fixés, non colorés à partir du Laboratoire de Référence vers le laboratoire périphérique permet de contrôler la coloration, la lecture et l'enregistrement.
- L'observation de la qualité de toutes les étapes de l'examen microscopique des frottis d'expectoration lors des visites de supervision sur le terrain.
- L'envoi de frottis colorés et lus au microscope depuis le laboratoire périphérique vers le Laboratoire de Référence pour relecture.
- Le prélèvement d'un échantillon de lames provenant de patients enregistrés en les sélectionnant dans le Registre de la Tuberculose du District.

Les quatre méthodes ont des avantages et des inconvénients distincts ; il est dès lors conseillé de les mettre en œuvre selon les besoins et les circonstances de chaque PNT.

Dans le contexte qui nous concerne, l'amélioration de la qualité consiste à corriger les déficiences dans la performance et la lecture des bacilloscopies de frottis en prenant des mesures appropriée pour y remédier. Le

recyclage des techniciens qui font preuve d'une performance inférieure à l'optimum est de la responsabilité des laboratoires d'un niveau supérieur dans le réseau, c'est à dire les Laboratoires de Référence Régionaux et Centraux. Une discussion plus détaillée des programmes d'assurance qualité en microbiologie de la tuberculose est fournie dans les références 7 et 8.

7. BIOSÉCURITÉ AU LABORATOIRE DE MICROSCOPIE POUR LA TUBERCULOSE

7.1 Aspects généraux

Les techniciens de laboratoire sont responsables de leur propre sécurité et de celle de leurs collaborateurs. La transmission de *Mycobacterium tuberculosis* résulte essentiellement de micro-aérosols, c'est à dire de bacilles tuberculeux contenus dans les « noyaux de gouttelettes » d'un diamètre de 1 à 5 microns, qui sont suffisamment petits pour atteindre les alvéoles pulmonaires, et suffisamment grands pour adhérer aux parois des alvéoles pulmonaires.

La lutte contre l'infection au laboratoire doit viser à réduire la production d'aérosols. Une bonne ventilation est nécessaire à la protection de l'équipe du laboratoire contre l'infection par les noyaux de gouttelettes véhiculés par l'air.. Pour assurer aisément la ventilation et un courant directionnel entraînant les particules véhiculées par l'air à distance du technicien de laboratoire, on doit situer judicieusement les portes et les fenêtres (voir Figure 4). Quand on dispose du courant électrique, on peut utiliser des extracteurs pour aspirer l'air du laboratoire.

Les techniciens doivent se laver les mains chaque fois qu'ils entrent au laboratoire ou qu'ils le quittent. Pendant ses prestations, le personnel portera des vêtements protecteurs, comme des blouses de laboratoire. Il les déposera dans les armoires avant de quitter le laboratoire. L'accès au laboratoire ne sera autorisé qu'à la seule équipe de laboratoire.

Pour l'étalement et la coloration, le port de gants à jeter est souhaitable. Toutefois, il représente une dépense importante pour les

laboratoires périphériques car ils sont supposés être jetés après chaque manipulation de laboratoire. Les gants jetables sont prévus pour une seule utilisation mais dans beaucoup de laboratoires, on a tendance à les réutiliser jusqu'à déchirure. Cette utilisation inadéquate donne une sensation de fausse sécurité et conduit à des négligences qui ont souvent un impact négatif sur les conditions de biosécurité du laboratoire : les gants contaminés sont utilisés pour prendre en main ou pour faire fonctionner un équipement de laboratoire qui dans d'autres conditions ne serait jamais contaminé. Vu que dans la plupart des circonstances où ce guide sera utilisé, l'emploi des gants n'est pas praticable, on recommande fortement le trempage des mains dans l'alcool à 70 %, suivi d'un lavage dans une solution détergente, d'un rinçage à l'eau et d'un séchage au papier.

Le port de masques chirurgicaux conventionnels ne réduit pas significativement le risque d'infection par inhalation d'aérosols. A nouveau, l'accent doit être porté sur la réduction de la production d'aérosols pendant les manipulations de laboratoire par l'adoption et l'application strictes des Bonnes Pratiques de Laboratoire⁸.

Il est interdit de manger, de boire et de fumer au laboratoire.

7.2 Aspects spécifiques

Le risque de créer des aérosols varie considérablement selon les procédés de laboratoire considérés :

◆ Recueil des échantillons

Les expectorations des patients suspects de tuberculose sont souvent recueillies au laboratoire lui-même. Cette pratique expose les techniciens de laboratoire à un risque élevé de contagion par aérosol et ne devrait dans aucun cas être autorisée. Comme mentionnées au Chapitre 1, des précautions pour diminuer ce risque peuvent être prises en demandant au suspect de tuberculose de couvrir sa bouche pendant la toux et en lui faisant produire ses échantillons à l'extérieur, où les aérosols seront dilués et même stérilisés par la lumière UV ou la lumière solaire directe.

◆ Préparation des frottis

Quoique l'ouverture des crachoirs et l'étalement des expectorations puissent produire des aérosols, ces manipulations comportent un risque de transmission moindre

que la toux non protégée d'un patient à bacilloscopie positive. Il y a peu d'arguments pour conclure que la préparation des frottis d'expectoration entraîne un accroissement du risque d'infection tuberculeuse. Toutefois, l'absence de preuve n'est pas une preuve d'absence du risque, et les travailleurs de laboratoire doivent être prudents et rester vigilants à tout moment.

Un équipement coûteux et sophistiqué n'est pas un substitut valable pour une « bonne pratique de laboratoire » en microbiologie. De plus, les **cabinets de biosécurité** existants sur le marché exigent un entretien annuel important par des experts, ce qui entraîne des dépenses rarement prises en compte au moment de l'achat de l'équipement. Les cabinets de biosécurité qui ne sont pas entretenus correctement donnent une fausse impression de sécurité ; il en est de même pour ceux qui sont préparés de façon artisanale. Le modèle proposé dans la première édition de ce guide s'est avéré impra-



Figure 29

ticable après vingt années d'expérience sur le terrain dans les pays à faibles revenus. Dans ces conditions, il s'avère que les cabinets de biosécurité ne sont pas d'une grande utilité dans les laboratoires périphériques qui se limitent à la seule bacilloscopie des frottis.

◆ Désinfection, stérilisation et évacuation des produits contaminés

Après l'examen des frottis, il faut enlever les couvercles de tous les crachoirs utilisés. Les crachoirs utilisés, leurs couvercles et les applicateurs sont placés dans une poubelle contenant une solution de phénol à 5 % ou d'hypochlorite de soude à 0,5 % où ils sont complètement immergés. Ultérieurement, ces produits peuvent être traités à l'autoclave. Si l'on ne dispose pas d'un autoclave, tous les produits doivent être brûlés dans un incinérateur, dans une fosse à l'air libre ou un fût de pétrole (Figure 29). **NB** : les fumées produites par la combustion d'une grande quantité de crachoirs en matière plastique sont toxiques.

Au cas où l'on utilise à la fois matériel à usage unique ainsi que des crachoirs en

verre, ces derniers doivent être placés dans un récipient séparé pour y être bouillis et lavés avant réutilisation. D'autres objets, comme les porte-lames, le séchoir et la surface de travail seront désinfectés avec une solution de phénol à 5 % ou d'hypochlorite de soude à 0,5 %.

Après avoir subi le contrôle de qualité, les lames positives seront cassées et traitées comme les autres objets tranchants. Les lames négatives peuvent soit être cassées et jetées, soit, si nécessaire, être nettoyées et réutilisées pour un travail autre que la tuberculose (par exemple la malaria ou l'hématologie).

Les lames dont les frottis sont négatifs doivent être bouillies pendant une demi-heure dans une solution de savon ou de détergent (produit pour la vaisselle), lavées à l'eau courante, essuyées avec un linge fin, séchées à l'air, examinées pour confirmer l'absence de griffes, nettoyées au moyen d'un tampon d'ouate trempé dans l'alcool et emmagasinées pour réutilisation.

Qu'elles soient négatives ou positives, les lames pour TB ne doivent **jamais être réutilisées pour le travail en TB**.

8. GESTION DES PRODUITS

Les programmes doivent budgétiser leurs commandes de manière rationnelle afin d'assurer un débit continu de fournitures de laboratoire. La seule base quantifiable pour cette planification est le nombre de patients enregistrés pour lesquels des examens microscopiques ont été effectués. Le nombre et le pourcentage de patients à bacilloscopie positive peut être déterminé en se basant sur le registre du laboratoire.

Si l'on suppose que le taux de positivité des frottis parmi les cas suspects est de 10 %, que chaque cas suspect de tuberculose exige trois examens d'expectoration et que chaque cas confirmé de tuberculose à bacilloscopie positive a trois examens de suivi, le nombre de lames pour microscopie et de crachoirs nécessaires pour chaque cas à bacilloscopie positive est de :

1 malade positif	3 lames
9 malades suspects non positifs	27 lames
pour le malade positif,	
3 examens de contrôle	3 lames
soit pour un cas positif, 33 lames	
et 33 crachoirs	[(1 + 9) × 3 + 3 = 33.]

Le calcul pour les commandes est effectué à l'aide de la *Fiche de commande pour le matériel de laboratoire* (Figures 30 et 30 bis) :

- le nombre total de patients à bacilloscopie positive (nouveaux cas ou cas de retraitement) enregistrés dans les deux derniers *Rapport trimestriel sur le dépistage des tuberculeux* est introduit dans la colonne intitulée « Nombre de malades » ;
- les réquisitions pour le semestre suivant (A) sont calculées en multipliant le nombre de patients par un facteur prédéterminé basé sur

la supposition que 10 suspects de TB doivent être examinés pour chaque cas à bacilloscopie positive ;

– les réquisitions pour le stock de réserve (B) correspondent à deux fois la quantité nécessaire pour 6 mois ($A \times 2$) ;

– la quantité de actuellement en stock (C) dans le magasin de district est inscrite (faire l'inventaire physique) ;

• la commande totale (D) représente la somme de la quantité nécessaire pour le semestre suivant (A) plus la quantité nécessaire pour le stock de réserve (B) moins le stock actuel (C) au moment où le formulaire de commande est complété.

Les commandes de réserve correspondent aux fournitures nécessaires pour fonctionner un an.

Les commandes en matériel de laboratoire sont relativement limitées et pour cette raison, elles peuvent être faites tous les 6 mois plutôt que tous les 3 mois.

Les quantités de fuchsine basique, de bleu de méthylène, d'éthanol et de phénol sont calculées pour la méthode de coloration de ZN recommandée par l'UICMR, en supposant que 5 ml de chacune des solutions sont nécessaires pour chaque lame. On suppose par ailleurs que deux gouttes ou 0,1 ml d'huile sont utilisés pour chaque lame.

PROGRAMME NATIONAL DE LUTTE CONTRE LA TUBERCULOSE

FICHE DE COMMANDE POUR LE MATÉRIEL DE LABORATOIRE

Inscrire le nombre de nouveaux cas TPM+ 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 A	Quantité pour 1 année de réserve $A \times 2 = B$	Actuellement en stock C	Commande totale $A + B - C = D$
Fuchsine	15 g		$\times 0.5 \text{ g} =$				
Bleu de méthylène	15 g		$\times 0.5 \text{ g} =$				
Huile à immersion	100 ml		$\times 3.3 \text{ ml} =$				
Acide sulfurique	1 250 ml		$\times 41 \text{ ml} =$				
Phénol	250 g		$\times 8.3 \text{ g} =$				
Méthanol	500 ml		$\times 17 \text{ ml} =$				
Lames	1 000		$\times 33 =$				
Crachoirs	1 000		$\times 33 =$				

Les calculs sont basés sur les assumptions 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 correspondant à un cas diagnostiqué.

¹ Le facteur est basé sur l'assomption que 10 suspects ont eu des examens pour chaque cas positif (3 lames chacun) et 3 examens de suivi pour le cas dépisté.

Figure 30.

PROGRAMME NATIONAL DE LUTTE CONTRE LA TUBERCULOSE

FICHE DE COMMANDE POUR LE MATÉRIEL DE LABORATOIRE AU NIVEAU PÉRIPHÉRIQUE

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

Item	Nombre de malades	Facteur ¹	Quantité requise pour 6 mois de fonctionnement A	Quantité requise pour 1 année de réserve A × 2 = B	Actuellement en stock C	Commande totale A + B - C = D
Solution colorante		x 165 ml =				
Solution de décoloration		x 165 ml =				
Solution de contre coloration		x 165 ml =				
Huile à immersion		x 3.3 ml =				
Lames		x 33 =				
Crachoirs		x 33 =				

Les calculs sont basés sur les assumptions qu'il faut 5 ml de chaque solution pour une lame.

¹ Le facteur est basé sur l'assumption que 10 suspects ont eu des examens pour chaque cas positif (3 lames chacun) et 3 examens de suivi pour le cas dépisté.

Figure 30 bis.

Références

1. Collins C H, Grange J M, Yates M D. Organization and practice in tuberculosis bacteriology. London : Butterworths, 1985.
2. Laboratory Biosafety Manual. 2nd ed. Geneva : WHO, 1993 : pp. 60-61.
3. McDougall A C. An inexpensive slide marker made from a dental bur and a plastic pen. *Lep Rev* 1992 ; 63 : 79-80.
4. Smithwick R C. Laboratory manual for acid-fast microscopy. 2nd ed. US Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service. Atlanta, GA : Centers for Disease Control, Bacteriology Division, 1976.
5. The Microscope. A Practical Guide. WHO Project : ICP TUB 001. New Delhi, India : WHO Regional Office for South-East Asia, 1999.
6. McDougall A C. The use of xylene (xylol) in medical laboratories. *Lep Rev.* 1989 ; 60 : 67.
7. Woods G L, Ridderhof J C. Quality assurance in the mycobacteriology laboratory. In : *Clinics in Laboratory Medicine*. Philadelphia, PA : W B Saunders, 1996 : Vol. 16, Number 3.
8. Kumari S, Bathia R, Heuck C C. Quality assurance in bacteriology and immunology. WHO Regional Publication, South-East Asia Series No 28. New Delhi, India : WHO Regional Office for South-East Asia, 1998.
3. De Kantor I N, Kim S J, Frieden T, Laszlo A, Luelmo F, Norval P Y, Rieder H L, Valenzuela P, Weyer K. Laboratory services in tuberculosis control. WHO Global Tuberculosis Programme. WHO/TB/98.258. Geneva : WHO, 1998.
4. Manual of norms and technical procedures for tuberculosis bacteriology. Part 1 Smear microscopy. Technical note 26. Washington, DC : Pan American Health Organization, 1984.
5. Manual for Laboratory Technicians. Revised National Tuberculosis Control Programme (RNTCP). Nirman Bhavan, New Delhi, India : Central TB Division, Directorate General of Health Services, Ministry of Health and Family Welfare, 1997.
6. Module for Laboratory Technicians. Nirman Bhavan, New Delhi, India : Central TB Division, Directorate General of Health Services, Ministry of Health and Family Welfare, 1997.
7. Rieder H L, Chonde T M, Myking H, Urbanczik R, Laszlo A, Kim S J, Van Deun A, Trébuçq A. The Public Health Service National Tuberculosis Reference Laboratory and the National Laboratory Network. Minimum requirements, role and operation in a low income country. Paris : IUATLD, 1998.
8. Fujiki A. TB microscopy. Tokyo, Japan : The Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Japan International Cooperation Agency, Hachioji International Training Centre, 1998.

Lectures suggérées

1. Bacteriology of tuberculosis. The specimen. Microscopy examination. Technical note n° 26. Washington, DC : Pan American Health Organization, 1984.
2. Minamikawa M. Laboratory Manual for the National Tuberculosis Programme of Nepal. National Tuberculosis Centre. JICA/HMG National TB Control Project (II). March 1998.
9. Tuberculosis control : a manual of methods and procedures for integrated programs. Scientific Publication N° 498. Washington, DC : Pan American Health Organization, 1986.
10. Enarson D A, Rieder H L, Arnadottir T, Trébuçq A. Management of tuberculosis : a guide for low income countries. 5th ed. Paris : IUATLD, 2000.

ANNEXE 1

PRÉVENTION 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 PNT

PRÉVENTION DES FAUX NÉGATIFS EN MICROSCOPIE

- S'assurer que l'échantillon contient des expectorations et pas seulement 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
- Colorer les frottis pendant 5 minutes
- Décolorer les frottis pendant 3 minutes
- Contre-colorer pendant 1 minute
- 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
- Collationner le 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

ANNEXE 2

ENTRETIEN DU MICROSCOPE

Le microscope est l'outil principal des services de diagnostic de la TB du PNT. 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 non utilisé doit être entreposé dans un environnement sec, libre de toute poussière ou vibration.
- Eviter d'exposer le microscope à la lumière solaire directe, aux moisissures et à l'humidité.
- Placer un gel de silice dans le coffret de conservation du microscope ; reconstituer le gel de silice par chauffage lorsqu'il devient rose.
- Nettoyer le microscope avant et après usage au moyen d'un papier pour lentille.
- Essuyer la surface de la lentille à immersion avec un morceau d'ouate propre avant et après usage. **Ne pas utiliser l'alcool pour nettoyer les lentilles.**
- La lentille à immersion dans l'huile ne devrait pas venir au contact du frottis
- N'utiliser que la vis micrométrique en cas d'emploi de lentille à immersion.

ANNEXE 3

GUIDE POUR LA SOLUTION DES PROBLÈMES DE MICROSCOPIE

PROBLÈME	CAUSES POSSIBLES	SOLUTION
Champ sombre	Condenseur trop bas Diaphragme fermé	Relever le condenseur Ouvrir le diaphragme
Dans le champ, ombres sombres se déplaçant avec l'oculaire quand on le fait tourner	Oculaire sale Oculaire ou objectif contaminé par des champignons Griffes sur la surface de l'oculaire	Nettoyer l'oculaire Le remplacement de l'oculaire peut être nécessaire Le remplacement de l'oculaire peut être nécessaire
Image trouble	Le côté « frottis » de la lame est en dessous Présence d'une bulle d'air dans l'huile Huile de mauvaise qualité Objectif sale	Retourner la lame Déplacer l'objectif à immersion d'un côté à l'autre Changer d'huile Nettoyer l'objectif
L'image à faible grossissement n'est pas claire	Huile sur l'objectif Poussière sur la surface supérieure de l'objectif Objectif endommagé	Nettoyer l'objectif Dévisser l'objectif et le nettoyer Remplacer l'objectif



COMPOGRAVURE
IMPRESSION, BROCHAGE
IMPRIMERIE CHIRAT
42540 ST-JUST-LA-PENDUE
OCTOBRE 2001
DÉPÔT LÉGAL 2001 N° 3145

IMPRIMÉ EN FRANCE

VI. ANNEXE 2

FORMULAIRES

DEMANDE D'EXAMEN D'EXPECTORATION

Nom de l'Unité de Traitement _____ Date _____

Nom du malade

Age _____ Sexe (cocher la case) : M [] F []

Adresse précise _____

Raison de l'examen (cocher la case) : Diagnostic [] Examen de suivi []

Signature du responsable du recueil des crachats

RÉSULTATS (à compléter au laboratoire)

N° d'ordre du laboratoire _____

Date	Echantillon	Aspect*	Résultats (cochez)				
			neg	1-9	+	++	+++
	1						
	2						
	3						

* caractéristiques de l'expectoration à l'œil nu (muco-purulent, traces de sang, salive)

Date _____ Examen effectué par (Signature) _____

Le formulaire dûment rempli doit être rapidement transmis à l'Unité de Traitement

RAPPORT TRIMESTRIEL SUR LE DÉPISTAGE DES TUBERCULEUX

Nom de l'unité de traitement _____ Patients enregistrés pendant le _____ trimestre de 20 _____	Nom de l'agent du Centre chargé du rapport _____ Signature _____ Date _____
---------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------

CAS ENREGISTRÉS DANS LE TRIMESTRE

FROTTIS-POSITIFS			FROTTIS-NÉGATIFS		EXTRA-PULMONAIRES	TOTAL
Nouveaux cas	Rechutes	Echecs	Reprises traitements	< 15 ans		

NOUVEAUX CAS À FROTTIS POSITIFS SEULEMENT

Classe d'âge (ans)										TOTAL			
0-14		15-24		25-34		35-44		45-54		55-64		65 +	
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	Masculin	Féminin

Explications pour remplir le formulaire :

Trimestres 1^{er} trimestre - 1^{er} janvier au 31 mars 3^e trimestre - 1^{er} juillet au 30 septembre
 2^e trimestre - 1^{er} avril au 31 juin 4^e trimestre - 1^{er} octobre au 31 décembre

Optionnel : NOMBRE DE PATIENTS MIS AU TRAITEMENT DURANT LE TRIMESTRE, EN FONCTION DU RÉGIME THÉRAPEUTIQUE

2RHZE/6TH	2STH/10TH	12TH
2SRHZE/1RHZE/5R ₃ H ₃ E ₃		

PROGRAMME NATIONAL DE LUTTE CONTRE LA TUBERCULOSE

**RAPPORT DES RÉSULTATS DE TRAITEMENT POUR LES CAS DE TUBERCULOSE PULMONAIRE
À FROTTIS POSITIFS ENREGISTRÉS 15 MOIS AUPARAVANT**

Nom de l'unité de traitement _____ Patients enregistrés pendant le _____ trimestre de 20 _____	Nom de l'agent du Centre chargé du rapport _____ Signature _____ Date _____
---------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------

Type de malade	Régime thérapeutique	Frottis négatifs (guéri)	Frottis non faits (traitement terminé)	Frottis positifs (échec)	Décédé	Perdu de vue	Transféré	Total
Nouveaux cas à frottis-positifs nombre* _____	2RHZE/6TH							
	2STH/10TH							
Cas à frottis positifs en retraitement nombre* _____	2SRHZE/1RHZE/5R ₃ H ₃ E ₃							

* selon le formulaire du Rapport trimestriel sur le dépistage des tuberculeux

PROGRAMME NATIONAL DE LUTTE CONTRE LA TUBERCULOSE

FICHE DE COMMANDE POUR LES MÉDICAMENTS ANTITUBERCULEUX

Inscrire le nombre de cas du dernier trimestre (selon le *Rapport trimestriel sur le dépistage des tuberculeux*)

Médicament	2RHZE/6TH			2(S)TH/10TH			2SRHZE/1RHZE/5R ₃ H ₃ E ₃			Total
	Cas	Facteur*	Total	Cas	Facteur*	Total	Cas	Facteur*	Total	
{RH} 150/75			A			B			C	A + B + C = D
Z 400		x 210 =			x 0 =	0		x 540 =		
S 1 g		x 210 =	0		x 0 =	0		x 320 =		
{TH} 150/300		x 0 =			(x 60) =			x 60 =		
H 100		x 180 =			x 360 =			x 0 =	0	
E 400		x 0 =	0		x 0 =	0		x 100 =		
		x 150 =			x 0 =	0		x 450 =		

Item	Quantité requise	Réserve nécessaire	Actuellement en stock	Commande totale
	E (= D)	F (= E)	G	
{RH} 150/75				
Z 400				
S 1 g				
{TH} 150/300				
H 100				
E 400				
			{TH} 50/100	
			{EH} 400/150**	
			Seringues/Aiguilles	
			Eau pour injection (5 ml)	

Date :

Nom et signature :

*Facteur : nombre de comprimés pris en moyenne par un malade.

** Pour chaque patient chez qui {TH} doit être remplacé par {EH} à cause des effets secondaires, 360 comprimés de {EH} doivent être commandés.

PROGRAMME NATIONAL DE LUTTE CONTRE LA TUBERCULOSE

FICHE DE COMMANDE POUR LE MATÉRIEL DE LABORATOIRE

Inscrire le nombre de nouveaux cas TPM+ 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 A	Quantité pour 1 année de réserve $A \times 2 = B$	Actuellement en stock C	Commande totale $A + B - C = D$
Fuchsine	15 g		$\times 0.5 \text{ g} =$				
Bleu de méthylène	15 g		$\times 0.5 \text{ g} =$				
Huile à immersion	100 ml		$\times 3.3 \text{ ml} =$				
Acide sulfurique	1 250 ml		$\times 41 \text{ ml} =$				
Phénol	250 g		$\times 8.3 \text{ g} =$				
Méthanol	500 ml		$\times 17 \text{ ml} =$				
Lames	1 000		$\times 33 =$				
Crachoirs	1 000		$\times 33 =$				

Les calculs sont basés sur les assumptions 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 correspondant à un cas diagnostiqué.

¹ Le facteur est basé sur l'assumption que 10 suspects ont eu des examens pour chaque cas positif (3 lames chacun) et 3 examens de suivi pour le cas dépisté.

PROGRAMME NATIONAL DE LUTTE CONTRE LA TUBERCULOSE

FICHE DE COMMANDE POUR LE MATÉRIEL DE LABORATOIRE AU NIVEAU PÉRIPHÉRIQUE

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

Item	Nombre de malades	Facteur ¹	Quantité requise pour 6 mois de fonctionnement A	Quantité requise pour 1 année de réserve A x 2 = B	Actuellement en stock C	Commande totale A + B - C = D
Solution colorante		x 165 ml =				
Solution de décoloration		x 165 ml =				
Solution de contre coloration		x 165 ml =				
Huile à immersion		x 3.3 ml =				
Lames		x 33 =				
Crachoirs		x 33 =				

Les calculs sont basés sur les assumptions qu'il faut 5 ml de chaque solution pour une lame.

¹ Le facteur est basé sur l'assumption que 10 suspects ont eu des examens pour chaque cas positif (3 lames chacun) et 3 examens de suivi pour le cas dépisté.

