

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**

Priorités pour les services de bactériologie de la tuberculose dans les pays à faibles revenus

**Deuxième édition
2007**

Hans L. Rieder
Armand Van Deun
Kai Man Kam
Sang Jae Kim
T. Martin Chonde
Arnaud Trébucq
Richard Urbanczik

**Union Internationale Contre la Tuberculose
et les Maladies Respiratoires**

68 boulevard Saint Michel, 75006 Paris, France

Cette publication a été rendue possible grâce au soutien
du Ministère des Affaires Etrangères de France et
de l'Agence Française de Développement

Editeur :

Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoire (L'Union)
68 boulevard Saint-Michel, 75006 Paris, France

Titre original :

« Priorities for Tuberculosis Bacteriology Services in Low-Income Countries »

Auteurs :

Hans L. Rieder, Armand Van Deun, Kai Man Kam,
Sang Jae Kim, T. Martin Chonde, Arnaud Trébucq, Richard Urbanczik

© Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires (L'Union)

Version originale : février 2007

Traduction française : J. Prignot et F. Pouthier, juin 2008

Impression : septembre 2008

Tous droits réservés.

Aucun élément de cette publication ne peut être reproduit sans la permission des auteurs et des éditeurs.

ISBN : 978-2-914365-32-1

Préface à la première édition

Au moment d'écrire ce livre, la tuberculose continue à poser un énorme problème de santé dans beaucoup de régions du monde, particulièrement dans les pays à faibles revenus. La mise en œuvre de stratégies efficaces de lutte antituberculeuse a progressé ; dans beaucoup de pays toutefois, on ne reconnaît pas suffisamment l'importance et la priorité à accorder à une lutte contre la tuberculose de qualité. L'examen bactériologique en vue de la détection des sources de contagion, le diagnostic des cas cliniquement suspects, le suivi de l'effet du traitement et de ses résultats sont les composantes essentielles de la lutte contre la tuberculose. Un réseau de laboratoires bien organisé assurant l'examen bactériologique de la tuberculose est indispensable pour assurer ces tâches. Le réseau de laboratoires peut fournir des informations opérationnelles utiles pour mesurer la performance et l'impact du programme, pour identifier les secteurs potentiels d'amélioration et pour établir une politique de traitement. Pour ces raisons, il est essentiel de s'assurer qu'un laboratoire de référence crédible et performant soit en place pour organiser non seulement la supervision du réseau de laboratoires, mais aussi la création de standards et de politiques de laboratoire.

Ce laboratoire national de référence, qu'il soit une partie du laboratoire central de santé publique ou un laboratoire promu à ce titre au sein de la principale institution de lutte contre la tuberculose du pays, devrait être à la tête du réseau de laboratoires de la tuberculose afin de jouer son rôle de référence pour le programme. Ce laboratoire a un rôle essentiel dans l'organisation et l'entretien du réseau, dans la mise au point des directives, dans l'assurance de la qualité et de la standardisation de l'examen microscopique des frottis, dans la surveillance de la formation du staff de laboratoire, dans la direction du processus de surveillance de la résistance aux médicaments, dans la participation à la recherche épidémiologique et opérationnelle, dans l'approvisionnement en matériel et consommables, dans la production de rapports de qualité. Pour cela, il devrait offrir une gamme complète de services avec culture et tests de sensibilité aux médicaments.

Ce livre fournit des orientations utiles aux responsables nationaux du laboratoire de référence en ce qui concerne son rôle, ses responsabilités principales, les aspects techniques et organisationnels de l'examen des frottis ainsi que la surveillance de la résistance aux médicaments antituberculeux. Il est important de noter ici que l'assurance et le contrôle de qualité, la formation et le suivi sont toutes des fonctions générales du laboratoire et quoique ce livre concerne la tuberculose, les mêmes principes sont applicables à d'autres maladies ou fonctions. En conséquence, ce livre constituera un complément bien venu aux documents de référence pour les professionnels tant du laboratoire national que des programmes nationaux de lutte contre la tuberculose. Je félicite les auteurs pour cet effort qui répond à un besoin réel dans un secteur essentiel de la lutte contre la tuberculose.

Dr Arata Kochi

Directeur, Programme Mondial Tuberculeuse
Organisation Mondiale de la Santé – juillet 1998

Remerciements

La première édition de cette monographie avait largement bénéficié de l'apport fourni par Thuridur Arnadottir, Chris Collins, Etienne Declercq, Donald Enarson, Isabel de Kantor, Nico Nagelkerke et Beat Neuenschwander. Edik Balaian avait préparé les dessins à la main et Hanne Hemsén avait aidé à l'édition des dessins de plans architecturaux préparés par Helge Myking. Fadila Boulahbal et Jacques Grosset avaient contribué largement à la conception et au bon fonctionnement du laboratoire national de référence de la tuberculose à Dakar, Sénégal, qui a eu une influence importante sur cette monographie.

Les auteurs sont reconnaissants à Adalbert Laszlo qui a contribué significativement à la première édition, dont la plus grande partie a été incluse dans cette seconde édition.

Donald Enarson a revu méticuleusement la deuxième édition de notre manuscrit, a fait des commentaires critiques et posé des questions pertinentes qui ont aidé à améliorer nettement le contenu ainsi que la fluidité de l'argumentation. En outre, nous avons bénéficié de son expertise pour l'édition finale.

Les auteurs ont une dette de reconnaissance à l'égard d'Ivan Bastian et de Richard Lumb qui ont revu le manuscrit de façon approfondie et critique, à Thuridur Arnadottir qui a suggéré des améliorations conceptuelles et à Abigail Wright pour ses commentaires critiques.

Préface à la deuxième édition

La première édition de cette monographie était intitulée « Le Laboratoire National de Référence de la Tuberculose du Service de Santé Publique et le Réseau National de Laboratoire - Exigences Minimales et Modes d'action dans un Pays à Faibles Revenus ». Les auteurs espèrent que le titre plus concis « Priorités pour les services de bactériologie de la tuberculose dans les pays à faibles revenus » reflète les révisions apparues dans cette deuxième édition de ce que nous appelons plus simplement « Le Livre Rouge ».

Helge Myking, co-auteur de notre première édition est décédé avant de pouvoir lire la version imprimée de ce livre. Helge avait mis ses compétences d'architecte à la disposition du programme national contre la tuberculose du Sénégal en construisant le laboratoire national de référence de la tuberculose. Il a partagé ses expériences concernant ce projet dans ce livre. Le chapitre et les plans architecturaux écrits par Helge sont restés pratiquement inchangés car ils conservent la pertinence et l'innovation qui les caractérisaient au moment où ils avaient été écrits. Nous dédions la deuxième édition de ce livre à Helge Myking.

Cette monographie trouve son origine dans la prise en compte des besoins de nos collaborateurs dans de nombreux pays. Notre gratitude va d'abord et surtout aux techniciens des laboratoires de microscopie de la périphérie, principalement dans les pays à faibles revenus, qui ont partagé avec nous leurs problèmes et leurs solutions innovantes et qui ont exprimé à plusieurs reprises la nécessité d'un soutien technique et moral provenant des laboratoires de niveau intermédiaire et du laboratoire national de référence de la tuberculose. Cette monographie constitue donc une description des responsabilités du réseau de laboratoires et de celles du laboratoire national de référence de la tuberculose qui est à la tête de ce réseau dans le cadre des priorités de santé publique d'un programme national de lutte contre la tuberculose. Il est dédié aux techniciens qui travaillent souvent dans des circonstances difficiles, dans des zones rurales reculées de pays à faibles revenus et qui contribuent grâce à leur travail quotidien au succès de la lutte antituberculeuse.

Il existe un grand nombre de superbes ouvrages de mycobactériologie. L'objectif de cette monographie n'est pas simplement d'en ajouter un autre mais de compléter ceux déjà disponibles. Elle ne cherche pas à couvrir le champ entier de la mycobactériologie ; elle se focalise plutôt sur l'ensemble spécifique des tâches minimales requises à chaque niveau du réseau national de laboratoire en insistant sur la responsabilité du laboratoire national de référence de la tuberculose. Par exemple, la technique de la culture n'est discutée que comme une nécessité préalable aux tests de sensibilité en vue d'une surveillance de la résistance aux médicaments. On aborde ses potentialités pour l'accroissement de la sensibilité du diagnostic chez les patients individuels, mais les obstacles pratiques sont tels

qu'on ne l'utilise que très rarement ou jamais à des visées diagnostiques dans les pays à faibles revenus au sein du contexte du programme national de lutte contre la tuberculose. De la même manière, l'identification des mycobactéries n'est discutée que pour différencier avec une certitude raisonnable les espèces pathogènes du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (dorénavant dénommé aussi bacille tuberculeux) par opposition aux mycobactéries environnementales, sans tenter de donner des conseils sur la façon d'identifier les espèces au sein de ces dernières.

Dans l'élaboration de ce livre, les auteurs ont porté une attention particulière aux autres publications de l'Organisation Mondiale de la Santé et de l'Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires. Nous avons fait de grands efforts pour rester en concordance avec les recommandations officielles de ces organisations. Toutefois, la science progresse et au fur et à mesure de l'accumulation de nouvelles connaissances, il n'est que naturel que certains concepts soient remis en question. C'était déjà le cas dans la première édition publiée en 1998 et nous avons poursuivi explicitement dans la même ligne. Toutefois, lorsque nous introduisons de nouveaux concepts, nous le disons clairement et nous le faisons de manière scientifique, à partir de données fiables.

Alors que la plus grande partie du matériel présenté dans ce manuel a été testée en profondeur sur le terrain et s'est avérée appropriée et robuste, certaines idées nécessitent encore des études dans le cadre d'un programme national. Les auteurs recevront avec reconnaissance les commentaires provenant du terrain, susceptibles d'aider à l'amélioration de ce document dans toute édition future.

Paris, Anvers, Hong Kong, Seoul, Dar es Salaam et Schömberg
Décembre 2006

Table des matières

I Tâches et personnel d'un réseau national de laboratoires de la tuberculose

- A. Tâches et besoins en personnel au niveau périphérique 1
- B. Tâches et besoins en personnel au niveau intermédiaire 2
- C. Tâches du laboratoire national de référence de la tuberculose 3
- D. Besoins en personnel et en journées de travail
au laboratoire national de référence de la tuberculose 10

II Examen microscopique des frottis de crachats

- A. Recueil des échantillons 14
- B. Demande d'un examen de frottis de crachats 17
- C. Préparation et coloration des frottis de crachats 18
- D. Examen des frottis de crachats 31
- E. Enregistrement et transmission des résultats des examens
de frottis de crachats 33

III Formation et assurance de qualité dans l'examen microscopique des frottis de crachats

- A. Formation des techniciens à l'examen microscopique
des frottis de crachats 35
- B. Assurance de qualité de l'examen microscopique des frottis de crachats 36

IV Surveillance de la résistance aux médicaments antituberculeux

- A. Objectif du système de surveillance et rôle de la culture 72
- B. Considérations générales sur les problèmes spécifiques au laboratoire 76
- C. Procédés techniques spécifiques à la surveillance de la résistance
aux médicaments 78
- D. Considérations éthiques sur la surveillance de la résistance
aux médicaments 107

V Moyens, fournitures, équipement et environnement physique du réseau national de laboratoires de la tuberculose

- A. Plans du laboratoire périphérique de microscopie 109
- B. Plans du laboratoire national de référence de la tuberculose 111
- C. Construction du laboratoire national de référence de la tuberculose.. 117
- D. Gestion des fournitures pour l'examen microscopique
des frottis de crachats en périphérie 122
- E. Approvisionnement du laboratoire national de référence
de la tuberculose 124
- F. Considérations spéciales de biosécurité au laboratoire 133
- G. Exigences internationales pour l'envoi sécurisé de cultures
du complexe *M. tuberculosis* 135

VI Annexes

- Annexe 1 Formulaire de demande et de transmission des résultats des examens de frottis de crachats
- Annexe 2 Registre de laboratoire pour l'examen microscopique des frottis de crachats
- Annexe 3 Formulaire de rapport sur les performances du laboratoire périphérique pour les frottis de crachats et sur l'état des stocks
- Annexe 4 Formulaire pour les tests en série d'examen microscopique des frottis de crachats au moyen de lames envoyées par le laboratoire de référence vers la périphérie
- Annexe 5 Formulaire pour le contrôle des lames envoyées de la périphérie vers le laboratoire de référence
- Annexe 6 Formulaire de rapport sur les résultats régionaux résumés des évaluations de qualité par contrôle
- Annexe 7 Registre de laboratoire pour les cultures primaires
- Annexe 8 Registre de laboratoire pour l'identification des bactéries et pour les tests de sensibilité
- Annexe 9 Formulaire de demande et de transmission des résultats des cultures de crachats
- Annexe 10 Schéma pour la transmission du résumé des résultats des tests de sensibilité aux médicaments
- Annexe 11 Configuration du laboratoire périphérique de microscopie
- Annexe 12 Configuration et plan des laboratoires nationaux de référence de la tuberculose
- Figure 1 : Plan A Emplacement et plan de disposition
- Figure 2: Plan B Coupes nord, ouest, sud et est du laboratoire de référence de la tuberculose
- Figure 3 : Plan C Détails du laboratoire de référence de la tuberculose
- Figure 4 : Croquis d'un laboratoire à écoulement contrôlé de l'air
- Annexe 13 Formulaire de demande d'approvisionnement pour le laboratoire régional des frottis de crachats

CHAPITRE I

Tâches et personnel d'un réseau national de laboratoires de la tuberculose

La structure du système des soins de santé, et au sein de celui-ci, la structure des services de laboratoire varie considérablement d'un pays à l'autre. Néanmoins, un réseau de laboratoires est presque toujours une composante des services généraux de santé, intervenant aux niveaux périphérique, intermédiaire et national. Au niveau national, il existe habituellement une certaine spécialisation au sein de ces services de laboratoire dont ceux de la tuberculose peuvent être une composante. Les réseaux de laboratoires nationaux comportent fréquemment un système par lequel ils assurent la formation et la compétence des techniciens de laboratoire, qu'il soit général ou spécifique comme c'est le cas pour la tuberculose. Le programme national contre la tuberculose doit veiller à collaborer avec le réseau de laboratoires, contribuer par ses ressources au maintien des compétences et à l'amélioration de la qualité de l'examen microscopique des frottis de crachats, à tous les niveaux du réseau de laboratoires comme discuté dans ce chapitre.

A. Tâches et besoins en personnel au niveau périphérique

L'unité de base pour la mise en œuvre du Programme national de lutte contre la tuberculose (PNT) est le **Centre de diagnostic et de traitement (CDT)**. Le CDT fournit des services en étant intégré dans les services généraux de santé ; il enregistre et compile des informations essentielles nécessaires à l'évaluation des performances du programme, à la surveillance et à la planification des approvisionnements. Un CDT dessert typiquement une population de 50.000 à 150.000 habitants ; cela est adapté en fonction de l'incidence de la tuberculose, de la densité de la population, de l'accessibilité des services et d'autres facteurs liés à des contextes particuliers.

Le diagnostic exige que les agents de santé identifient les suspects de tuberculose parmi l'ensemble des patients recourant aux services de santé (c'est-à-dire dans tous les lieux où ces services sont fournis) et que des laboratoires soient compétents pour la recherche de bacilles alcool-acido-résistants (BAAR) par examen microscopique dans des échantillons de crachats. Une trop grande décentralisation des services de microscopie peut réduire la compétence et exiger un effort disproportionné pour

l'assurance de qualité, l'équipement et l'approvisionnement. Une centralisation trop grande réduit l'accessibilité des services et peut entraîner une perte de la qualité des examens microscopiques en raison d'une surcharge du personnel du laboratoire. La planification concernant la localisation et la répartition de ces services doit prendre en considération à la fois les exigences en ressources humaines (particulièrement la supervision) et l'accessibilité pour la population.

La tâche principale du laboratoire de microscopie du CDT consiste à examiner les échantillons de crachats à la recherche de BAAR grâce à la méthode de Ziehl-Neelsen. Cela comprend un contrôle de qualité interne, renforcé par une assistance du niveau intermédiaire sous forme de visites de supervision régulières et d'une évaluation externe de qualité. L'agent du laboratoire est également responsable du maintien en bon état de fonctionnement de son microscope, afin de prolonger sa durée d'utilisation.

Les résultats des examens des frottis de crachats à la recherche de BAAR doivent être transmis rapidement à l'agent de santé qui a demandé l'examen et être enregistrés méticuleusement dans un registre de laboratoire standardisé par le niveau national. Le registre de laboratoire de la tuberculose est la source-clé d'informations ; il est conçu pour permettre une revue des activités et pour servir de base à la mesure des différents indicateurs permettant l'évaluation des performances. Il sert également pour la sélection au hasard des lames dans le cadre de l'évaluation externe de qualité.

Habituellement, le personnel d'un laboratoire périphérique compte seulement un, parfois deux agents. Dans ces laboratoires, le technicien peut avoir d'autres tâches que l'examen microscopique des frottis de crachats. En conséquence, il faut prendre bien garde de ne pas surcharger ce personnel, pour éviter des examens microscopiques de mauvaise qualité. Une charge de travail de 20 à 25 échantillons par jour est le maximum qu'on puisse attendre raisonnablement d'une seule personne. Le dépassement régulier de cette charge exigera presque certainement un accroissement du personnel.

B. Tâches et besoins en personnel au niveau intermédiaire

Le laboratoire de niveau intermédiaire est par définition le lien critique entre le laboratoire périphérique et le laboratoire national de référence. Ce laboratoire se situe souvent dans un grand hôpital, régional ou provincial ; il dispose habituellement de plusieurs techniciens ayant des fonctions multiples.

A côté des services de routine fournis à ce grand hôpital, sa tâche principale est de soutenir les centres périphériques de microscopie. Ce soutien inclut la préparation et la distribution des solutions de réactifs, l'approvisionnement régulier en lames, crachoirs et autres fournitures essentielles sollicitées par le laboratoire périphérique pour l'exécution ininterrompue de ses tâches.

Il est essentiel que le soutien aux CDT périphériques comprenne des visites régulières pour superviser leurs activités, résoudre les problèmes rencontrés et donner la rétro-information du contrôle de qualité externe. Dans les services périphériques, cela augmentera certainement la motivation des agents de laboratoire qui sont isolés et ont peu l'occasion de discuter avec leurs pairs de problèmes techniques ou autres.

Le laboratoire de niveau intermédiaire, à son tour, est soutenu par le laboratoire national de référence avec lequel il coordonne toutes les activités du réseau national de laboratoires de la tuberculose, activités nécessaires à assurer la régularité de son fonctionnement. Le laboratoire intermédiaire est un partenaire critique pour la mise en œuvre de la politique et des directives nationales. Il s'assure que les procédures sont appliquées régulièrement dans l'ensemble de sa région.

Le laboratoire intermédiaire a la responsabilité d'assurer une assurance de qualité externe pour les laboratoires périphériques, de leur fournir la rétro-information concernant les résultats de ce contrôle de qualité et de communiquer au niveau national les informations concernant les performances observées.

C. Tâches du laboratoire national de référence de la tuberculose

Les activités principales d'un PNT dans un pays à faibles revenus comportent le dépistage des tuberculeux par l'examen microscopique des frottis de crachats et la fourniture d'une chimiothérapie efficace aux patients. Le laboratoire national de référence de la tuberculose donnera priorité aux activités qui soutiennent ces objectifs dans le cadre du réseau national de laboratoires. Dès lors les tâches principales du laboratoire national de référence de la tuberculose consistent à :

- maintenir un niveau élevé de compétences en matière d'examens microscopiques de routine des frottis exécutés dans les services de santé périphériques ;
- standardiser les techniques utilisées dans le réseau ;

- organiser et coordonner la formation du personnel du réseau ;
- organiser les tests d'assurance de qualité de l'examen microscopique des frottis dans le réseau national de laboratoires ;
- mettre en œuvre la surveillance de la résistance aux médicaments antituberculeux ;
- élaborer et exécuter des recherches opérationnelles.

Il est clair que le laboratoire national de référence de la tuberculose est rarement en état d'exécuter toutes les tâches concernant la formation, la supervision et les tests de contrôle de qualité des examens microscopiques des frottis de crachats sur l'ensemble du pays ; cela d'ailleurs ne constituerait pas une utilisation efficiente de ses ressources. Néanmoins, il porte globalement la responsabilité d'élaborer des standards nationaux et de superviser l'application des stratégies. La décentralisation de certaines activités est hautement souhaitable et le laboratoire national de référence de la tuberculose devrait être un moteur pour encourager les laboratoires de niveau intermédiaire (régionaux ou provinciaux) à prendre part à l'exécution des tâches essentielles dans le réseau national de laboratoires. A long terme, il est bon de mettre en œuvre une décentralisation efficace pour rendre le soutien du PNT de plus en plus efficient.

1. Maintien de la compétence pour l'examen microscopique des frottis en routine

Les services de microscopie des frottis de crachats doivent être disponibles dans l'ensemble du pays puisqu'ils reposent essentiellement sur un microscope à usage multiple, intégré dans les services généraux de santé.

La Figure I.1. schématise la sensibilité potentielle des divers outils disponibles pour l'identification de la tuberculose pulmonaire. Les fréquences relatives sont des estimations et dépendent de la population concernée. Dans les pays industrialisés, ou dans un contexte de dépistage actif des cas, il y a relativement plus de cas « précoces » (moins avancés) et les frottis positifs concerneront une bien plus faible proportion de cas. Parmi l'ensemble des outils de diagnostic de la tuberculose pulmonaire, la suspicion clinique et le cliché thoracique sont les outils les plus sensibles, mais aux dépens de la spécificité.

Dans des laboratoires sophistiqués et expérimentés, les techniques de culture peuvent détecter des bacilles jusqu'à une concentration aussi faible que 10 bacilles par millilitre de crachat. Dans beaucoup de contextes, la culture ne sera pas aussi sensible car ses résultats peuvent être compromis

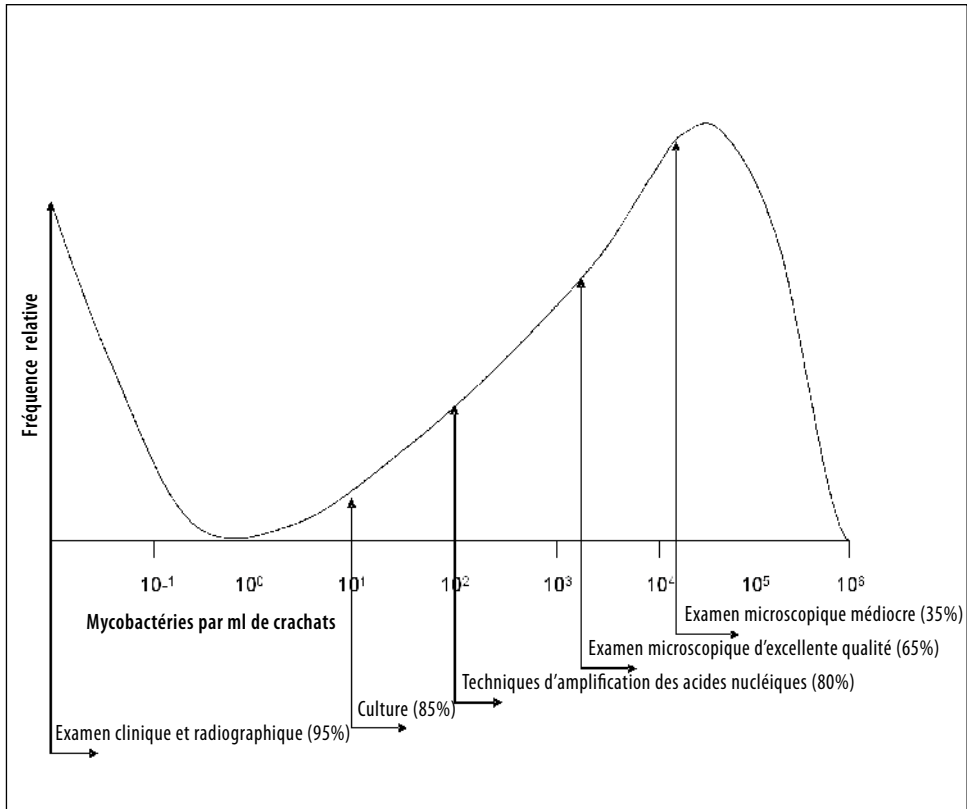


Figure 1.1 Présentation schématique du rendement potentiel des différentes techniques de diagnostic de la tuberculose pulmonaire, en fonction du nombre de bacilles dans les crachats.

par la longue durée de transport des échantillons, par les protocoles de décontamination, par la centrifugation et d'autres procédures indispensables. Des pertes de viabilité des bacilles tuberculeux sont inévitables.

Les techniques d'amplification des acides nucléiques peuvent détecter des bacilles à une concentration aussi faible que 100 bacilles par millilitre de crachats. Un avantage de ces techniques est qu'elles n'exigent pas de bacilles vivants car les morts contiennent toujours leur cible d'acide nucléique. Pour exécuter de tels tests avec succès et de manière fiable, il faut disposer d'une infrastructure et d'un équipement spécialisés, d'un personnel très bien formé qui apporte une attention méticuleuse aux détails ; ces tests exigent aussi substantiellement plus de ressources financières que l'examen microscopique et la culture. Un résultat positif d'une technique d'amplification nucléaire ne fournit pas une culture qui permettrait d'identifier les germes jusqu'au niveau de l'espèce et d'initier les tests de sensibilité aux médicaments.

La limitation technique de l'examen microscopique des frottis de crachats (si l'on examine comme recommandé jusqu'à 100 champs) est qu'elle exige la présence de plus de 1.000 bacilles par millilitre de crachats pour avoir 60% de chance d'identifier les bacilles et 10.000 ou davantage pour que cette chance soit de 95%. Même lorsque l'examen microscopique est médiocre, on ne ratera pas les bacilles lorsque l'échantillon comporte 30.000 à 60.000 bacilles par millilitre de crachats. Comparé à la culture, l'examen microscopique des frottis de crachats est peu sensible pour le diagnostic de la tuberculose pulmonaire, alors qu'il est très sensible pour l'identification des sources les plus importantes de transmission des bacilles tuberculeux, comme l'a montré l'examen des contacts (Figure I.2). L'objectif de santé publique de l'examen microscopique des frottis de crachats est d'identifier la plus grande proportion possible des sources de transmission dans la collectivité et de veiller à ce que le laboratoire exécute ce test au plus haut niveau de compétence possible.

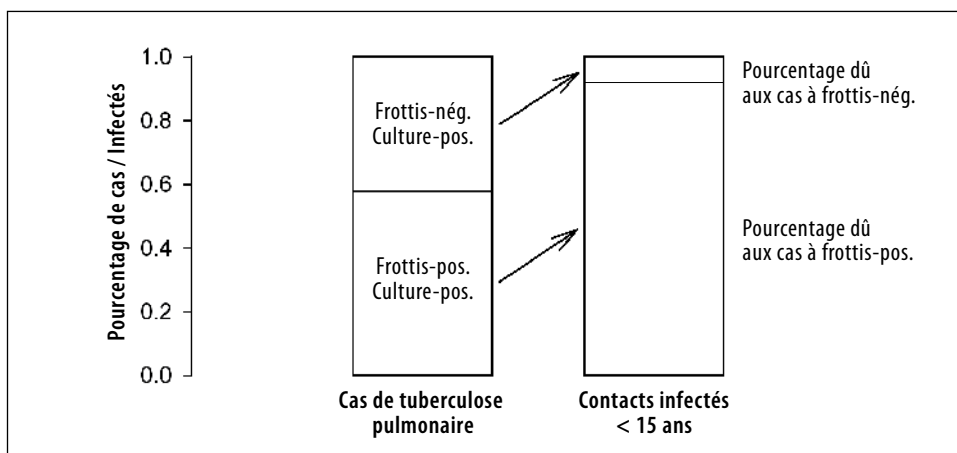


Figure I.2 Sensibilité de l'examen microscopique des frottis de crachats pour l'identification des cas de tuberculose confirmés par la culture et celle des sujets transmettant le bacilles tuberculeux dans la collectivité (calculé d'après les données de Grzybowski S. et al. Bull Int Union Tuberc 1975 ; 50 : 90-106).

La tâche principale du laboratoire national de référence de la tuberculose est d'assurer la qualité du travail du réseau national de laboratoires. Pour rester compétent et crédible, le laboratoire national se doit d'être efficace dans le même travail de routine que celui exécuté quotidiennement par les laboratoires périphériques. En conséquence, le laboratoire national de référence assurera les services de routine d'examen microscopique à partir de crachats provenant de certains centres sélectionnés qui lui réfèreront des cas suspects de tuberculose.

Pour maintenir la compétence en mycobactériologie dans le pays, il faut obtenir un nombre minimum de résultats positifs. L'expérience dans les programmes de collaboration de l'Union indique qu'en moyenne 15% de tous les nouveaux suspects examinés ont une tuberculose à microscopie positive des crachats, mais l'éventail de la prévalence des cas parmi les suspects est large, s'étendant de 5% à 30%. S'il est recommandé que chaque nouveau cas suspect bénéficie de trois examens d'échantillon et que chaque nouveau cas de tuberculose ait trois examens de suivi, le nombre de lames à examiner par cas de tuberculose à bacilloscopie positive est de $(3/0,15) + 3$, c'est-à-dire 23 lames. Pour chaque cas (par définition), deux frottis devraient être positifs pour porter le diagnostic. Lors du suivi, après 2 mois de traitement, les frottis devraient encore être positifs dans un cas sur dix. Ceci équivaudrait à 2,1 frottis positifs vus par cas. Si l'on considère que la capacité de travail est de 20 à 25 lames par jour (voir section A plus haut), un travail à temps plein correspondrait à environ 6.000 examens par an, dont plus de 500 frottis positifs. La compétence peut être maintenue, même si seulement un ou deux frottis positifs sont identifiés par semaine de travail. Toutefois, la valeur limite critique du nombre minimum d'examens de frottis nécessaires au maintien d'une bonne compétence n'est pas définie.

Le laboratoire national de référence de la tuberculose peut courir le risque d'être surchargé par le travail de routine et dès lors ne plus assurer complètement ses responsabilités majeures d'assurance de qualité, de formation et de supervision. Lorsque le nombre d'examens de routine des frottis dépasse 30 lames par jour, on recommande l'examen microscopique par fluorescence. Alors qu'il est tentant de n'utiliser que cette méthode, cela n'est pas conseillé car il faut maintenir une compétence pour la méthode de Ziehl-Neelsen. Quelle que soit l'approche choisie, la technique de Ziehl-Neelsen sera utilisée en routine, même si le nombre d'échantillons par jour est très élevé (dans ce cas, elle sera utilisée pour une fraction des échantillons). Les services du laboratoire de référence se doivent d'être cohérents avec ceux fournis par les services de santé généraux car la formation des techniciens de laboratoire travaillant dans les services de santé périphériques a besoin d'être assurée de manière continue. Ces techniciens doivent bénéficier d'une formation reflétant la situation effectivement rencontrée dans leur travail quotidien.

Le laboratoire national de référence maintient sa compétence pour la technique de Ziehl-Neelsen en participant activement au contrôle des lames dans le système national d'assurance de qualité externe, c'est-à-dire en assurant la seconde relecture des frottis discordants. Si la surcharge de travail constitue un problème, les examens de routine au Ziehl-Neelsen

peuvent alors être transférés aux centres de santé et hôpitaux de la région, afin que le laboratoire de référence puisse se concentrer sur ses tâches prioritaires.

2. Formation et assurance qualité de l'examen microscopique des frottis de crachats dans les laboratoires périphériques

L'assurance qualité est un système visant à améliorer de manière continue la fiabilité et l'efficacité des services de laboratoire. Il comporte trois composantes :

- *Le contrôle de qualité* (également appelé assurance de qualité interne) : tous les moyens par lesquels le laboratoire de microscopie des frottis pour tuberculose contrôle les opérations, notamment le contrôle du matériel et le contrôle des nouveaux lots de solutions de colorants.
- *L'évaluation externe de qualité* : processus qui permet aux laboratoires participants d'évaluer leurs capacités en comparant leurs propres résultats avec ceux d'autres laboratoires du réseau (laboratoire intermédiaire et central) grâce à des tests en série et à une relecture aveugle. L'évaluation externe de qualité comporte également une évaluation in situ du laboratoire pour vérifier la qualité des performances et devrait inclure une relecture des lames in situ.
- *L'amélioration de la qualité* : processus par lequel les composantes des services de diagnostic de microscopie des frottis sont analysées en visant à rechercher les moyens d'éliminer en permanence les obstacles s'opposant au succès. La collecte des données, l'analyse des données et des solutions créatives aux problèmes sont les composantes-clés du processus. Elles comportent un suivi permanent, l'identification des erreurs suivie d'une action de correction comportant, si nécessaire, une nouvelle formation afin de prévenir la récurrence des problèmes. L'amélioration de la qualité repose souvent sur des évaluations précises sur place.

La formation des techniciens à l'examen microscopique des frottis de crachats doit être adaptée au travail quotidien. L'objectif premier est de renforcer la compétence des techniciens dans la technique qu'ils utilisent en routine et pour cette raison, la théorie ne représente qu'un minimum : environ deux tiers de la durée de formation (typiquement un cours de formation dure cinq jours) devraient être réservés à un travail pratique au microscope.

C'est la responsabilité du laboratoire national de référence de la tuberculose de veiller à ce que les services de routine de l'examen microscopique des frottis de crachats dans les services de santé périphériques soient fournis de manière standardisée et avec un niveau élevé de compétence. Ceci signifie que le chef du laboratoire de référence élaborera un plan annuel de visite vers les régions et vers certains laboratoires périphériques dans les régions. Ces visites seront coordonnées de préférence par l'équipe centrale du PNT et menées conjointement avec lui. Durant une journée entière, ces visites permettent la supervision du travail quotidien. Alors que la supervision directe des laboratoires périphériques est de la plus grande importance pour l'assurance qualité, des systèmes plus officiels utilisant l'évaluation externe de qualité de l'examen microscopique des frottis de crachats seront organisés. L'objectif principal de ces exercices est de maintenir et d'améliorer de manière continue la qualité des services de microscopie dans le pays.

Afin d'assurer la couverture de l'ensemble du pays, la participation active du niveau intermédiaire dans l'évaluation externe de qualité est un élément critique car il n'est pas possible, ni désirable, que le laboratoire national de référence soit le lien direct avec l'ensemble des laboratoires périphériques.

Un schéma d'évaluation externe de qualité dans un pays ne peut fonctionner correctement que si les tâches sont partagées entre le réseau de laboratoires et le PNT. L'évaluation externe de qualité exige que les laboratoires périphériques soient visités fréquemment afin de sélectionner et de contrôler des lames et de donner une rétro-information sur leurs performances. Sans implication du PNT, un programme d'évaluation externe de qualité ne peut pas être mis en œuvre sur l'ensemble du pays. Pour cette raison, le personnel de supervision du PNT doit être activement engagé dans la collecte d'échantillons de lames et dans la rétro-information si l'on veut que ce programme d'évaluation externe de la qualité soit un succès.

3. Surveillance de la résistance aux médicaments

La surveillance de la résistance aux médicaments fait partie des tâches-clés du laboratoire national de référence de la tuberculose. La surveillance de la résistance aux médicaments est une entreprise complexe, quel que soit le contexte. Elle exige :

- la compréhension de la nature d'un échantillonnage représentatif et de la raison pour laquelle celui-ci est un élément critique pour la validation des résultats ;

- une infrastructure du programme permettant une étroite coordination entre les activités du programme et le réseau de laboratoires ;
- la garantie que les échantillons collectés soient de bonne qualité et transportés dans de bonnes conditions ;
- une compétence technique pour l'exécution de l'homogénéisation des échantillons, leur décontamination, l'inoculation, la lecture des cultures et leur identification ;
- une compétence pour les tests de sensibilité aux médicaments ;
- un système d'assurance interne de qualité et d'évaluation externe de qualité.

Cette monographie vise à promouvoir la collaboration entre les dirigeants du programme de la tuberculose et les spécialistes de laboratoire en vue d'obtenir une évaluation valable de la résistance à l'égard des médicaments antituberculeux dans leur pays.

D. Besoins en personnel et en journées de travail au laboratoire national de référence de la tuberculose

Afin de s'assurer qu'il fonctionne correctement, le laboratoire national de référence de la tuberculose doit bénéficier d'un personnel adéquat.

Pour un petit pays, le nombre minimum exigé d'employés comportera :

- 1 chef de laboratoire
- 1 chef adjoint, professionnel junior du laboratoire
- 2 techniciens de laboratoire pour l'examen microscopique
- 2 personnes (en rotation) responsables des services de culture (préparation des milieux, inoculation, test de sensibilité aux médicaments, lecture)
- 1 personne pour le nettoyage et l'entretien (notamment pour l'autoclave, le nettoyage de la verrerie et l'élimination des déchets).

Si la charge de travail augmente, un accroissement du personnel peut être nécessaire.

Le chef du laboratoire est responsable du fonctionnement global du laboratoire de référence et du maintien d'une étroite coordination avec le PNT afin d'exécuter les tâches essentielles pour la lutte antituberculeuse dans le pays. En particulier, il y a lieu de classer clairement les tâches du

laboratoire de référence par ordre de priorité. La qualification du chef de laboratoire répond idéalement à un grade de doctorat en microbiologie, médecine ou secteur apparenté. Le chef du laboratoire doit être capable d'organiser, de coordonner et de mener toutes les tâches à un niveau très élevé de compétence.

Le chef-adjoint doit être suffisamment qualifié et compétent pour entreprendre les tâches du chef dans toutes les activités liées au laboratoire et jouer un rôle actif en l'absence du chef du laboratoire. Les qualifications requises sont similaires à celles du chef du laboratoire, mais l'ancienneté dans la profession peut être moins importante.

Des techniciens de laboratoire bien entraînés, compétents à la fois pour la microscopie à champ clair et en fluorescence sont nécessaires pour le fonctionnement du laboratoire de référence. Ils sont essentiels pour garantir une qualité élevée des services de routine, pour former les stagiaires et participer aux activités d'évaluation externe de qualité des frottis de crachats.

Si l'on veut assurer et maintenir un niveau élevé de compétence pour les techniques standardisées de culture et de test de sensibilité aux médicaments, il faut deux techniciens pour assurer ces charges.

Un assistant de laboratoire à temps plein est nécessaire pour garantir la stérilisation du matériel contaminé, le nettoyage de la verrerie ainsi que le nettoyage général quotidien du laboratoire.

La rotation du personnel du laboratoire national de référence de la tuberculose pour un travail dans d'autres laboratoires nationaux de référence est rarement efficace et devrait être évitée.

Bibliographie

1. Aziz M A, Ba F, Becx-Bleumink M, Bretzel G, Humes R, Iademarco M F, et al. External quality assessment for AFB smear microscopy. In: Ridderhof J, Humes R, Boulahbal F, eds. Washington, DC, USA: Association of Public Health Laboratories, 2002.
2. Collins C H, Grange J M, Yates M D. Tuberculosis bacteriology. Organization and practice. Second edition. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1997.
3. Enarson D A, Rieder H L, Arnadottir T, Trébucq A. Management of tuberculosis. A guide for low income countries. Fifth edition. Paris, France: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2000.
4. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Technical guide. Sputum examination for tuberculosis by direct microscopy in low income countries. Paris, France: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2000.
5. World Health Organization. Treatment of tuberculosis: guidelines for national programmes. Third edition. WHO/CDS/TB/2003.313:1-108. Geneva, Switzerland: WHO, 2003.

6. World Health Organization. The WHO/IUATLD Global Project on Antituberculosis Drug Resistance Surveillance. Antituberculosis drug resistance in the world. Report No. 3. Geneva, Switzerland: WHO, 2004. WHO/CDS/TB/2004.343:1-129.
7. World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control. Part I: Organization and management. Geneva, Switzerland: WHO, 1998.
8. World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control. Part II: Microscopy. Geneva, Switzerland: WHO, 1998.
9. World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control. Part III: Culture. Geneva, Switzerland: WHO, 1998.

CHAPITRE II

Examen microscopique des frottis de crachats

Lorsque Robert Koch a publié son article princeps de 1882 sur l'identification de l'agent causal de la tuberculose, il a présenté des méthodes à la fois pour la coloration et pour la culture. Sa méthode de coloration utilisait un colorant primaire ainsi qu'un agent caustique (pour faciliter la diffusion du colorant à l'intérieur de la cellule à travers la paroi cellulaire riche en lipides), un agent décolorant et un contre-colorant. Ceux-ci étaient nécessaires en raison du caractère hydrophobe de la paroi cellulaire dû à sa constitution lipidique et de la difficulté de pénétration du colorant. Koch a utilisé le bleu de méthylène comme colorant primaire et une solution alcaline d'hydrate de potassium comme agent caustique. Il a sauté l'étape de l'agent décolorant et utilisé le vesuvium à la fois comme agent décolorant et contre-colorant. Ehrlich a proposé (parmi d'autres alternatives) l'utilisation de la fuchsine comme colorant primaire et celle d'une solution alcaline d'aniline comme agent caustique. Il a introduit l'acide nitrique comme agent décolorant et proposé une contre-coloration bleue lorsque la coloration primaire était rouge (comme dans le cas de la fuchsine). Ziehl a remis en cause l'agent caustique et a proposé le phénol. Neelsen a combiné les meilleurs éléments de cet ensemble en proposant l'utilisation de l'approche d'Ehrlich pour le colorant primaire mais celle de Neelsen pour l'agent caustique (phénol) et en remplaçant comme agent décolorant l'acide nitrique par l'acide sulfurique ; c'est la base de la technique actuelle de la coloration de Ziehl-Neelsen, technique mise au point dès 1882.

Les patients à microscopie positive des frottis de crachats sont la source la plus importante de transmission de *Mycobacterium tuberculosis* dans la collectivité. La sensibilité (pourcentage des cas réels identifiés) de l'examen microscopique des frottis de crachats dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire est loin d'être parfaite. Bien appliquée, cette technique permet d'identifier plus des deux tiers des adultes atteints d'une tuberculose pulmonaire confirmée par la culture dans les services de routine des pays à haute prévalence ; mais cette proportion peut être plus faible chez les patients co-infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et elle est toujours nettement plus faible chez les jeunes enfants. Sa sensibilité pour l'identification des personnes transmettant les bacilles tuberculeux dépasse 80% quel que soit le contexte car les patients

à bacilloscopie positive des crachats sont beaucoup plus susceptibles de transmettre *M. tuberculosis* que ceux dont l'examen microscopique des frottis de crachats est négatif. Dès lors, dans un programme national de lutte contre la tuberculose, l'examen microscopique des frottis de crachats est un des outils les plus efficaces et les plus efficaces pour le dépistage. Il identifie les cas qui méritent la plus haute priorité dans la lutte antituberculeuse. De plus, l'examen microscopique des frottis de crachats est très spécifique pour l'identification de BAAR car, dans les pays à haute prévalence, ils correspondent presque toujours à un diagnostic de tuberculose. En outre, le diagnostic est très rapide. Il est exécuté par du personnel paramédical utilisant un équipement à usage multiple dans virtuellement tous les niveaux des services de santé des pays à haute prévalence. Pour toutes ces raisons, il constitue l'outil de diagnostic de base pour la lutte antituberculeuse.

A. Recueil des échantillons

Le recueil des échantillons de crachats pour l'examen des frottis devrait être aussi efficace et aussi commode que possible à la fois pour les patients et les techniciens de laboratoire. De nombreux travaux indiquent que le rendement supplémentaire dans la détection des cas diminue pour chacun des échantillons successifs collectés. La plupart des pays ont adopté la stratégie de recueil de trois échantillons comme moyen optimal d'identification des cas contagieux de tuberculose, suivant ainsi les recommandations de l'OMS et de L'Union. Parmi les patients qui finalement s'avèrent positifs à l'examen des frottis de crachats, on a signalé qu'environ 80% le sont au premier échantillon, 15% de plus au deuxième et 5% de plus au troisième. Toutefois, plusieurs études récentes ont suggéré que le rendement du troisième échantillon pouvait être seulement de l'ordre de 1% à 3%, constituant ainsi une importante charge de travail pour l'identification de cas supplémentaires. Le nombre de lames exigé pour identifier un cas supplémentaire dépend du produit de la prévalence des cas parmi les suspects par le rendement supplémentaire. Par exemple, si la prévalence des cas à bacilloscopie positive est de 10% parmi les suspects et si le rendement supplémentaire du troisième échantillon est de 5%, alors le nombre de lames devant être examiné pour trouver un cas supplémentaire lors d'un troisième examen consécutif faisant suite aux deux frottis négatifs précédents est de $1/(0,10 \times 0,05)$ soit 200 lames, c'est-à-dire approximativement de 8 à 10 journées entières de travail pour un technicien ; lorsque le rendement du troisième échantillon est plus faible, la charge de travail est encore plus lourde. Comme le travail pour la microscopie dans les laboratoires a aug-

menté dans les pays où la prévalence du VIH est élevée, l'adoption d'une stratégie à deux échantillons pour le diagnostic est considérée comme appropriée dans ces environnements.

La faible sensibilité de l'examen microscopique des frottis de crachats est de plus en plus critiquée et une large diffusion de méthodes plus sensibles (mais aussi plus complexes et exigeant plus de travail) est souvent proposée. Les pays doivent déterminer la meilleure stratégie en fonction de leur contexte et en prenant en compte les résultats d'une analyse du rendement supplémentaire :

- lorsqu'un personnel suffisant ou l'examen par fluorescence permettent un examen microscopique précis d'un grand nombre d'échantillons, trois échantillons (voire plus) devraient être examinés pour augmenter la sensibilité. Lorsque les patients consultent précocement, cela peut être particulièrement rentable car, dans ces conditions, la richesse des échantillons en bacilles est moins uniforme.
- là où le rendement du troisième frottis est faible, l'examen de séries de deux échantillons de crachats à des intervalles d'une ou deux semaines sera plus efficace (en cas de persistance des symptômes et après utilisation d'agents antimicrobiens non spécifiques). Cette stratégie pourrait aussi être plus sensible, en particulier lorsqu'une charge de travail importante entraîne une faible qualité des résultats.

La collecte recommandée de trois échantillons de crachats (un au moment de la première consultation, le deuxième produit au petit matin et le troisième au moment où le patient apporte le deuxième [système « recueil sur place-matin-sur place »]) est un compromis entre le rendement optimal fourni par l'échantillon du matin et les convenances du patient pour la collecte des échantillons sur place. Le rendement plus élevé attendu de trois échantillons du petit matin pourrait ne pas être obtenu car une telle stratégie exige de multiples visites (parfois jusqu'à quatre) du patient. Si l'on collecte seulement les échantillons du matin, le rendement du premier frottis peut atteindre jusqu'à 95%; ce rendement plus élevé s'explique par le fait que les échantillons produits sur place sont fréquemment de mauvaise qualité. De plus, une charge de travail excessive, ce qui peut se voir en cas de forte prévalence du VIH, comporte le risque que seul le premier échantillon soit examiné avec un soin suffisant. Les crachats provenant de patients externes gravement malades devraient toujours être recueillis sur place et examinés immédiatement ; chez les patients hospitalisés suspects de tuberculose, les crachats devraient être recueillis trois matins consécutifs plutôt que par la méthode moins sensible « recueil sur place-matin-sur place ».

Les recommandations actuelles définissent un cas de tuberculose pulmonaire à bacilloscopie positive comme un sujet suspect de tuberculose chez qui deux échantillons de crachats sont positifs. L'argument principal pour exiger un deuxième échantillon positif de confirmation est d'exclure des résultats faussement positifs provenant d'erreurs de laboratoire liées aux interventions d'échantillons. On sait peu de choses au sujet de la fréquence de telles erreurs dans les laboratoires périphériques. Toutefois, les rares études publiées montrent que la fréquence des résultats faussement positifs, y compris les erreurs techniques et les erreurs d'identification, sont de l'ordre d'environ 1% à 2%. Un contrôle d'évaluation externe de qualité avec échantillonnage des frottis positifs à la fréquence à laquelle ils surviennent, identifiera de tels problèmes ; ceux-ci doivent être résolus au plus vite, quelles que soient les considérations statistiques.

La spécificité très élevée des BAAR pour le complexe de *M. tuberculosis* dans les pays à haute prévalence par comparaison avec d'autres méthodes standard de diagnostic tels que l'examen radiographique et même la culture (où les contaminations croisées sont fréquentes) est à peine diminuée par des erreurs administratives épisodiques. Demander la confirmation d'un résultat positif par un second résultat positif peut être plus exigeant que nécessaire pour autant qu'une exécution technique correcte soit garantie (cf. Chapitre III). De toute manière, la mise en route du traitement après un examen positif ne devrait pas être retardée par l'attente d'une confirmation puisque l'objectif de ce deuxième examen n'est pas de décider du traitement mais de déterminer si un cas sera déclaré « à microscopie positive » ou « à microscopie négative ».

La qualité de l'échantillon de crachat soumis à l'examen est importante. Il faut encourager les patients à prendre tout leur temps pour produire un échantillon qui provienne de la profondeur de leurs poumons. Malgré tout, certaines études montrent qu'on peut trouver des bacilles même dans des échantillons à prédominance salivaire, quoiqu'à une fréquence moindre. Pour cette raison, tous les échantillons devraient être acceptés pour examen, même s'ils ont une allure salivaire lorsque les patients ne peuvent rien produire de mieux, et en particulier en cours de traitement. Arriver à une définition d'échantillon à prédominance salivaire qui soit à la fois précise et praticable sur le terrain est un vrai défi. Pour déterminer et enregistrer la qualité des échantillons de routine au laboratoire, une classification macroscopique (à l'œil nu) est fréquemment utilisée. Elle n'est peut-être pas très précise mais est acceptable sur le plan opérationnel. Elle classe les échantillons de crachats comme « salivaires », « muqueux », « purulents » et « muco-purulents ». Dans

cette classification, un échantillon principalement salivaire est caractérisé par une consistance aqueuse sans aucune particule de matériel muqueux ou purulent. Une technique plus précise (appliquée à l'examen cytologique des crachats mais qui peut également s'appliquer à la technique de Ziehl-Neelsen) consiste à compter le nombre de leucocytes et de cellules épithéliales par champ à faible grossissement (grossissement d'environ 100x). La probabilité qu'un échantillon soit principalement salivaire augmente si le ratio des leucocytes sur les cellules épithéliales descend en dessous de 1. Toutefois, tant qu'il y a des leucocytes, les chances d'obtenir un résultat positif du frottis ou de la culture restent élevées.

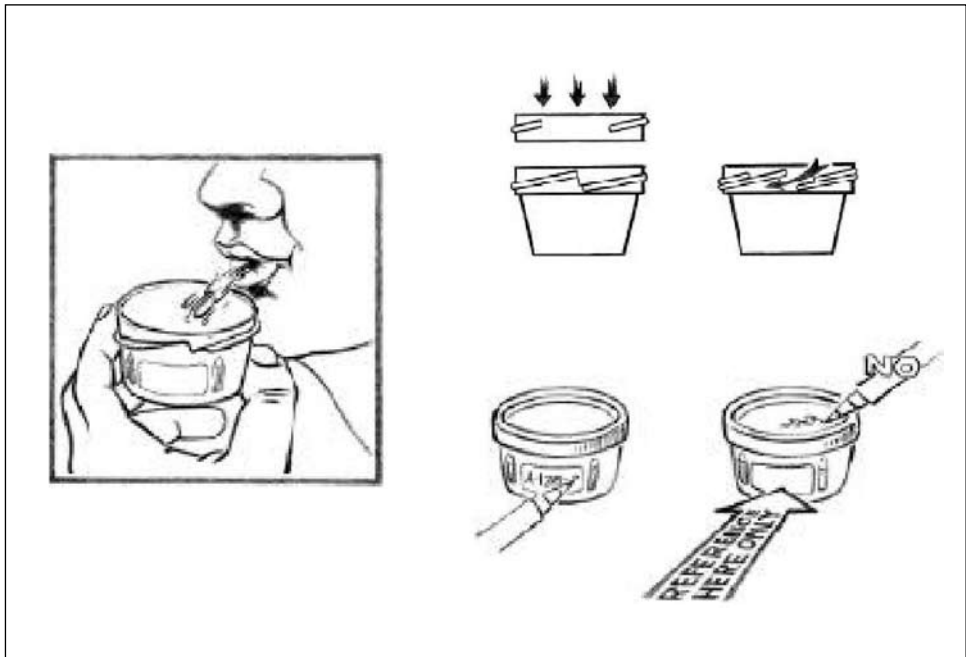


Figure II.1. Récipient en plastique, à large ouverture et à couvercle à vis pour le recueil des expectorations dans les laboratoires périphériques.

B. Demande d'un examen de frottis de crachats

Pour les échantillons de crachats destinés à l'examen microscopique, le laps de temps entre le recueil et la coloration a peu d'importance. En conséquence, les échantillons de frottis peuvent être envoyés sans perte de précision, du lieu de prélèvement vers un laboratoire éloigné pour examen. Toutefois, la plupart des pays ont adopté comme politique d'adresser le patient vers le centre de microscopie le plus proche ; la politique d'envoi des échantillons ou des frottis, quoique théoriquement plus commode pour le patient, est en

effet difficile à appliquer efficacement. Le transport des frottis fixés plutôt que celui des crachats peut être une alternative plus aisée mais il exige un investissement complémentaire en équipement ainsi qu'en formation du personnel des postes de santé à l'exécution des frottis. La logistique du transport reste un problème significatif et est vraiment très difficile à organiser de manière fiable dans la plupart des pays à faibles revenus.

Le type de récipient utilisé est très important et contribue à la qualité du crachat recueilli ; il devrait être en matière plastique, transparent et résistant à l'écrasement, avoir une large ouverture et un capuchon à vis (le fil de la vis correspondant à une fois et demi la circonférence du flacon) afin d'éviter les fuites, la dessiccation et la formation d'aérosols (Figure II.1). Le crachoir devrait avoir une capacité d'au moins 20 ml.

Il est important que les laboratoires aient les informations essentielles sur la personne dont ils examineront le crachat. Cela se fait au mieux en utilisant un formulaire de demande d'examen des frottis de crachats (Annexe 1) qui devrait être largement disponible et faciliter ainsi le travail tant de l'agent de santé soumettant la demande que celui du technicien de laboratoire exécutant l'examen. Les agents de santé indiqueront clairement sur la demande s'il s'agit d'un examen pour diagnostic ou pour suivi bactériologique du traitement. Cette information est enregistrée dans le registre de laboratoire à la fois pour des raisons de gestion (afin de permettre le calcul des besoins en fournitures pour le laboratoire) et pour une évaluation épidémiologique. Pour les examens de suivi, le numéro d'enregistrement du patient tuberculeux et le mois du traitement en cours seront indiqués.

C. Préparation et coloration des frottis de crachats

Pour l'examen direct, le frottis sera confectionné à partir de la meilleure partie du crachat ; il sera séché, fixé et coloré par la technique de coloration de Ziehl-Neelsen pour l'examen microscopique en lumière blanche. Avant son étalement, le crachat peut être concentré par liquéfaction/décontamination avec des produits chimiques tels que la soude caustique ou l'hypochlorite de soude (eau de Javel), centrifugation, sédimentation, flottage ou même filtration.

Dans la technique originale de coloration, on a utilisé de la fuchsine saturée (Ehrlich) ou une solution de carbol-fuchsine contenant 0.75% de fuchsine basique (Neelsen). Peu de temps après sa mise en œuvre, Johnne a rapporté une communication orale de Neelsen décrivant ce qui est devenu

la méthode définitive : une solution comportant 1% de fuchsine chauffée jusqu'au point d'évaporation, décoloration au moyen d'acide sulfurique à 25% et contre-coloration au bleu de méthylène. Toutefois, au fil du temps de nombreuses variantes de cette technique de base sont apparues et la pratique actuelle utilise la carbol-fuchsine à 0.3%. On a essayé d'autres colorants que la fuchsine basique pour la microscopie à fond clair mais ils ne sont jamais devenus populaires ; par contre, des variantes de la technique à la fuchsine sont utilisées. Des méthodes de coloration à froid utilisant comme colorant la fuchsine saturée à 3% sont souvent dénommées coloration de Kinyoun, bien que la description originale de cet auteur ait inclus une étape de digestion /flottage à l'hypochlorite de soude. La modification de Gabett a combiné les solutions de décoloration et de contre-coloration, réduisant le processus à deux étapes et donc la charge de travail, ce qui a rendu la méthode populaire particulièrement dans les pays où le coût du travail est élevé. La technique de coloration de Tan Thiam Hok combine le colorant primaire saturé à froid avec la modification de Gabett, et a été elle aussi largement adoptée. Dans une étude comparative très complète s'intéressant à de nombreuses techniques de coloration avec différentes concentrations de carbol-fuchsine, les résultats les plus concordants et la plus haute sensibilité sont obtenus par la coloration à chaud pendant 15 minutes avec la fuchsine à 1%. La décoloration à l'alcool-acide plutôt qu'à l'acide sulfurique ou à d'autres acides dilués dans l'eau est actuellement la règle dans les pays qui peuvent se le procurer car cette technique permet d'obtenir plus facilement un frottis propre. Au lieu du bleu de méthylène, on utilise parfois le vert de malachite en routine. Le désavantage de cette dernière contre-coloration est la fréquence des troubles de discrimination des couleurs chez le personnel du laboratoire (peut-être jusqu'à 10% des hommes ont des difficultés à distinguer le rouge et le vert). Des études comparatives ont trouvé que l'acide picrique était le meilleur contre-colorant, mais il est trop difficile à employer en routine.

L'examen microscopique sur fond clair a été largement remplacé par la microscopie à fluorescence dans les pays à faible prévalence, où le coût d'un technicien de laboratoire est largement plus élevé que celui de l'appareillage et où la supériorité de la technique pour les échantillons faiblement positifs est importante. Cette technique exige différentes solutions de coloration. L'auramine O est pratiquement toujours utilisée comme colorant primaire, seule ou en combinaison avec la rhodamine pour une meilleure différenciation. En microscopie à fluorescence, différentes variantes sont employées pour l'arrière-fond du frottis. On utilise habituellement le permanganate de potassium pour éteindre la fluorescence non spécifique mais des méthodes sans aucun contre-colorant ou l'utilisation de

l'acridine orange, du rouge de thiazine ou du bleu de méthylène sont des pratiques standard dans certains pays. Cependant, ces contre-colorants peuvent trop réduire le contraste lumière-obscurité. Récemment, l'encre bleue diluée a été considérée comme supérieure sur le terrain car elle maintient un bon contraste sans rendre l'arrière-fond sombre au point de rendre difficile le maintien de la mise au point (ce qui est parfois le cas avec le permanganate). L'addition d'un peu de phénol diminue de manière satisfaisante les artéfacts de fluorescence (données obtenues chez K. Feldmann, Kuratorium Tuberkulose in der Welt, Gauting, Germany, 2 juillet 2004).

1. Confection du frottis pour l'examen direct

Lorsqu'il prépare un frottis à partir d'un échantillon de crachat, le technicien choisira la partie de l'échantillon qu'il va utiliser. Les échantillons de crachats sont habituellement non-homogènes sauf si on les laisse en place pendant la nuit (par exemple, le premier échantillon recueilli sur place), ce qui peut entraîner une autolyse partielle. Si l'échantillon contient des particules nettement purulentes, il faut sélectionner celles-ci. Des bâtonnets applicateurs à usage unique (constitués de bambou ou de matériel similaire) sont préférables aux anses métalliques car ils sont plus efficaces pour le prélèvement des particules souhaitées et fournissent un outil plus consistant pour l'étalement. De plus, ces bâtonnets sont toujours détruits après utilisation alors que les anses métalliques doivent être nettoyées et désinfectées avant leur réutilisation : il faut enlever les particules adhérentes de crachats en plongeant les anses dans un flacon de sable alcoolisé (rarement disponible dans les laboratoires des services de santé périphériques) et les passer à la flamme. L'utilisation des bâtonnets est nettement moins dangereuse et prend moins de temps. L'extrémité d'un bâtonnet de bambou brisé est une brosse fibreuse de consistance adéquate. Si on le tient perpendiculairement à la lame, il facilite même une dispersion régulière de l'échantillon sur la lame. Les bâtonnets constitués de feuilles de palme de noix de coco (bâtonnets-brosse) sont moins fibreux et les bâtonnets en bois tendent à avoir une extrémité pointue et sont pour cette raison moins satisfaisants.

Faire un bon étalement n'est pas aussi aisé qu'il paraît et exige de la pratique et de la patience. Un bon frottis n'est ni trop épais ni trop mince et est régulièrement étalé, ce qui peut exiger de frotter de manière prolongée en mouvements circulaires. Il faut éviter de faire l'étalement au dessus de la flamme d'une lampe à alcool, car cela peut rendre les frottis très inégaux. Des frottis ou des zones de frottis trop épais empêchent une lecture adéquate après coloration. Les frottis très épais ont également tendance à

glisser de la lame au cours de la coloration car ils sont difficiles à sécher et à fixer correctement. En règle générale, l'épaisseur d'un frottis devrait permettre de lire, à travers le frottis non coloré, un journal posé sous la lame. Le frottis sera réparti de manière égale sur la lame. Un frottis bien coloré a une couleur bleu clair provenant du contre-colorant (bleu de méthylène). Si le frottis est bleu foncé, il est trop épais. La dimension recommandée pour l'étalement est de 20 mm sur 10 mm car une longueur de 20 mm correspond à environ 100 champs à l'huile d'immersion. Comme le technicien examinant le frottis devrait pouvoir se concentrer sur la lecture plutôt que sur le décompte des champs, on recommande de préparer des frottis de cette dimension.

Avant la fixation par la chaleur, le frottis sera laissé à l'air pour sécher, sans toutefois être exposé à la lumière directe du soleil. Il est déconseillé de chauffer à la flamme un frottis humide car cela peut altérer les BAAR et entraîner des fissures dans la lame. Dans les climats très humides, un chauffage prudent sur une plaque de verre montée au dessus d'une ampoule allumée peut être utilisé pour accélérer le processus.

Différents instruments tel que des statifs pour lames ou des cuvettes métalliques ont été recommandés pour améliorer la sécurité au cours de l'étalement. Ils ne sont pas indispensables ; des éléments accessibles comme un journal ou une serviette en papier (changés quotidiennement) pour couvrir la zone d'étalement pourront tout aussi bien remplir cette fonction.

2. Concentration du crachat

La concentration du crachat est une étape standard préparatoire à la culture de *M. tuberculosis* et le sédiment après centrifugation fait alors habituellement l'objet d'un examen microscopique ; cette procédure assure une augmentation de la sensibilité. Toutefois, pour être efficace, il faut que la centrifugeuse soit puissante car les BAAR ont une forte tendance à flotter. Dans les unités de microscopie des pays à faibles revenus, on dispose rarement de ce type de centrifugeuse.

D'autres techniques de concentration basées sur la floculation suivie d'une centrifugation modérée ou d'une flottaison ont été utilisées dans le passé et connaissent depuis peu un regain d'attention. La concentration du crachat par l'hypochlorite de soude (habituellement l'eau de Javel) a été largement expérimentée et ses résultats ont été le plus souvent encourageants. Pour cette technique, le crachat est mélangé à volume égal à de l'eau de Javel commerciale à 5% afin de le liquéfier pendant environ 30 minutes ; suivent habituellement une dilution à l'eau et une étape de concentration, quoiqu'une étude récente ait trouvé des cas positifs sup-

plémentaires dans le sédiment après 30 minutes sans concentration. La concentration est facile après digestion du crachat à l'eau de Javel car dans ces conditions, une faible force de centrifugation est suffisante. La sédimentation pendant une nuit entraîne un rendement plus modeste. Cela pourrait rendre la technique applicable même dans les laboratoires peu équipés. La technique à l'eau de Javel tue les bacilles tuberculeux, ce qui rend le crachat inoffensif mais le rend inutilisable pour la culture. D'autres techniques de concentration ont été utilisées après digestion à l'eau de Javel, comme la flottaison où les bacilles tuberculeux remontent au dessus du liquide après agitation dans des solvants organiques (pétrole ou chloroforme) ou encore la filtration après traitement à l'alcool.

Malheureusement, la concentration à l'eau de Javel n'entraîne pas une amélioration substantielle régulière de la sensibilité. En termes de spécificité, elle comporte un risque de résultats faussement positifs à cause du transfert possible des bacilles tuberculeux dans des tubes à centrifugation réutilisés ou de la contamination par les mycobactéries environnementales de l'eau utilisée pour la dilution. Quelques auteurs ont signalé une faible supériorité ou même un rendement réduit des frottis concentrés à l'eau de Javel ; d'autre part, la technique peut être inefficace pour l'examen des crachats de suivi ou pour les échantillons aqueux peu visqueux. Il est vraisemblable que la sensibilité après concentration à l'eau de Javel augmente principalement lorsque la qualité de l'examen microscopique direct est médiocre. Avec des échantillons plus fortement positifs ou avec une excellente technique de l'examen direct au Ziehl-Neelsen, l'avantage peut être faible et il devient difficile de justifier la charge de travail supplémentaire ou le risque accru de résultats faussement positifs.

L'eau de Javel peut améliorer les résultats de l'examen microscopique à la recherche des BAAR par plusieurs mécanismes. Comme le suggère l'augmentation signalée de positifs après simple sédimentation pendant 30 minutes, l'effet de la concentration peut ne pas être la composante la plus importante. La liquéfaction du crachat entraîne une homogénéisation de l'échantillon, en sorte que le choix des particules correctes dans l'échantillon est moins crucial. Le frottis est facile à étaler et à lire vu son épaisseur régulière et le fait que l'arrière-plan ne peut pas cacher les BAAR. Comme un prétraitement avec de puissants oxydants rend plus facile la coloration des bacilles tuberculeux, l'eau de Javel peut également compenser l'effet négatif d'une coloration réalisée avec une carbol-fuchsine de faible qualité ou celui d'une technique médiocre de coloration. Il est évident qu'une technique correcte d'étalement et de coloration, suivie d'une lecture soigneuse a le même effet. Dans une telle situation, la concentration à l'eau de Javel

ne pourrait augmenter la rentabilité que dans les échantillons faiblement positifs, par exemple dans les contextes où il existe une forte proportion de coinfections par le VIH chez les patients tuberculeux. Jusqu'à présent, une seule étude a démontré une augmentation du rendement des échantillons traités à l'eau de Javel chez les suspects séropositifs par comparaison aux séronégatifs pour le VIH. La technique devrait être évaluée à l'avenir dans des contextes à haute prévalence de VIH. L'indication d'emploi de techniques de concentration dans les laboratoires périphériques reste encore peu claire.

3. Coloration des BAAR

De nombreuses méthodes ont été élaborées pour la coloration en vue de l'examen microscopique des BAAR et toutes ne sont pas utilisables dans un réseau national de laboratoires. La standardisation grâce à l'utilisation d'une seule méthode dans l'ensemble du pays est un élément crucial. Le programme doit insister sur une méthode unique et sur une formulation appropriée des colorants pour cette méthode. La décision-clé d'un programme en ce qui concerne la technique d'examen des frottis de crachats est de sélectionner la seule méthode à fond clair et la seule méthode de microscopie par fluorescence qui seront standardisées dans l'ensemble du système. L'assurance de qualité n'est plus réalisable si chaque laboratoire utilise une technique différente. La commande de colorants devient franchement impossible car les diverses méthodes exigent différentes quantités et différents types de réactifs. De plus, les erreurs sont plus fréquentes, par exemple par suite de l'utilisation de colorants inadéquats prévus en fait pour une autre technique. A long terme, la formation du nouveau personnel de laboratoire à une seule technique est un bon investissement, de même que le fait de convaincre ceux déjà formés de passer à la seule technique recommandée. Les méthodes de coloration à froid, même celles utilisant des colorants fortement concentrés comme la technique de Kinyoun sont moins fiables dans les conditions de terrain. Elles tendent à détecter un plus petit nombre de positifs malgré une prolongation considérable de la durée de coloration. En pratique, la prolongation de la coloration est souvent négligée avec comme conséquence des résultats faussement négatifs. Les programmes nationaux de tuberculose devraient dès lors choisir la méthode de coloration à chaud.

En plus de la durée de la coloration et du chauffage, la concentration de fuchsine (et de phénol) du colorant est un facteur-clé déterminant pour que les BAAR prennent une forte coloration rouge, ce qui augmente les chances de détection. Pour obtenir une concentration suffisamment élevée de fuchsine, il faut disposer d'une poudre de fuchsine de haute qualité correctement dissoute. De plus, il est essentiel de s'assurer que le colorant n'est pas trop ancien. Ces exigences sont fréquemment méconnues dans les

conditions de programme. De plus, des erreurs surviennent dans la technique de coloration, particulièrement dans les grands laboratoires très actifs. Pour ces raisons, les auteurs donnent la préférence à l'utilisation d'une solution à 1% pendant 10 à 15 minutes plutôt que de celle à 0.3% pendant 5 minutes recommandée par l'Union et l'OMS. D'après leur expérience, la solution à 1% entraîne une coloration bien meilleure dans les conditions de routine. Quoiqu'une concentration à 0.3% pendant 5 minutes puisse donner des résultats de rendement similaires dans les laboratoires de référence, elle est trop proche des exigences minimales et laisse peu de marge d'erreur. Beaucoup de programmes utilisent la technique standard originale, c'est-à-dire la solution forte de carbol-fuch sine à 1%, avec de bons résultats.

La filtration du colorant carbol-fuch sine est essentielle ; on l'assure au mieux en versant le colorant sur la lame au travers d'un entonnoir garni d'un papier filtre ; les autres techniques ne sont plus recommandées. Lorsque le niveau du colorant dans les bouteilles de stock est bas, il faut le jeter car aucun papier filtre ne pourra retenir complètement la masse de cristaux qu'il contient.

Il est essentiel de veiller à ce que la carbol-fuch sine couvrant la lame soit chauffée jusqu'à apparition de vapeur et soit laissée dans cet état pendant au moins 5 minutes. Le chauffage répété ainsi qu'une durée prolongée de coloration ne sont pas défavorables ; au contraire, ils entraînent une coloration rouge plus marquée des BAAR à condition que la carbol-fuch sine ne sèche pas sur le frottis. Pour prévenir l'assèchement, la lame devrait toujours être complètement couverte de colorant. Pour y parvenir, les supports de coloration sont habituellement placés au-dessus d'un évier ; dans ce cas, la bonne pratique exige de laisser un espace suffisant (telle la largeur d'un doigt) entre deux lames pour éviter l'écoulement de solution d'une lame vers l'autre.

4. Décoloration

La décoloration est nécessaire pour enlever l'excès de carbol-fuch sine partout sauf au niveau des BAAR. Cela exige l'utilisation d'acides forts. L'addition d'alcool à la solution de décoloration n'est pas absolument nécessaire, mais permet d'obtenir plus facilement un frottis propre. Avec un peu d'habitude et en nettoyant la face inférieure de la lame, on peut également obtenir des résultats satisfaisants en utilisant des acides aqueux moins coûteux. Dans la plupart des cas, on obtient une bonne décoloration soit par une solution de 20 à 30 % d'acide sulfurique dans l'eau soit par une solution d'acide chlorhydrique à 3% dans l'alcool. Il est presque impossible de décolorer par les acides aqueux les BAAR qui ont été correctement

colorés, de sorte que la durée de décoloration n'est pas critique et que l'étape de décoloration peut être répétée si, après un premier essai, une coloration rouge trop marquée persiste. Les frottis trop épais ne peuvent pas être correctement décolorés. L'alcool-acide a une activité décolorante plus puissante que l'acide sulfurique et ne devrait pas être utilisé pendant trop longtemps. Le choix entre l'alcool-acide et les acides aqueux dépend principalement des préférences locales, de la disponibilité et du coût de l'alcool dont de grandes quantités sont nécessaires. D'autres options existent pour le choix de l'acide dilué, mais leurs valeurs respectives doivent être sérieusement discutées pour s'assurer qu'en dehors de leurs avantages pratiques (coût, facilité d'emploi), des résultats équivalents sont obtenus.

5. Contre-coloration

Le contre-colorant est chargé de donner un bon contraste et de cacher les restes de rouge de l'arrière-plan, sans cacher les BAAR dans les frottis plus épais. Il doit permettre de voir *suffisamment* de détails pour que le technicien puisse garder facilement la mise au point du frottis pendant son examen, mais *pas trop* pour que l'arrière-plan ne détourne pas l'attention du technicien.

Le bleu de méthylène n'est pas idéal. Il donne un beau contraste coloré, mais il cache les BAAR dans les frottis épais lorsqu'il est trop concentré ou appliqué pendant trop longtemps. Dès lors, certains experts recommandent une concentration de 0,1% (plutôt que celle de 0,3% recommandée dans le Tableau II.1) appliquée pendant au maximum une minute. Lorsque cette technique entraîne la persistance trop importante de rouge dans l'arrière-plan, c'est que le frottis est trop épais. En tenant compte de ces éléments, il est facile de détecter les déficiences de l'étalement ou l'insuffisance de décoloration.

D'autres solutions de contre-colorant ont été utilisées avec de bons résultats. Une coloration claire, par exemple par des solutions diluées de vert de malachite ou de vert brillant (inadéquates pour les daltoniens), améliore le contraste avec la fuchsine dans les parties plus épaisses du frottis puisqu'elle risque moins de cacher les bacilles colorés en rouge même après une contre-coloration prolongée.

6. Rinçage à l'eau

L'eau de rinçage doit être propre et s'il y a lieu de recolorer les lames pour l'évaluation de qualité, elle doit être aussi dépourvue que possible de mycobactéries environnementales. C'est pourquoi il est déconseillé de placer un tube en caoutchouc sur le robinet pour diriger le jet, car les

mycobactéries environnementales provenant de cette source peuvent contaminer les lames. Il faut utiliser de l'eau propre provenant d'un récipient qui peut être complètement nettoyé.

7. Préparation des colorants pour le Ziehl-Neelsen

Les programmes devraient être particulièrement attentifs à la qualité de la poudre de fuchsine et à celle du phénol qu'ils achètent, en exigeant pour les deux une qualité homologuée alors que les autres produits chimiques utilisés pour les colorants (acides, alcool) peuvent être d'une qualité technique. La préparation correcte des colorants exige un certain équipement et une bonne technique. Il y a lieu de centraliser l'approvisionnement au niveau intermédiaire ou central et de distribuer les colorants prêts à l'emploi aux centres périphériques de microscopie. Les exigences minimales pour la préparation des colorants sont la disponibilité d'eau pure et dépourvue de mycobactéries (eau distillée ou ultrafiltrée et pas simplement bouillie ou désionisée), d'un cylindre de mesure d'un volume approprié et de quelques autres verreries. Le programme s'assurera que des instructions précises sont disponibles pour la préparation des colorants. Une balance simple, d'une sensibilité de 0,1 g, est nécessaire. Le phénol doit être liquéfié et mesuré par volume. Quand on prépare un colorant de carbol-fuchsine à 1%, il n'est pas nécessaire de prendre en compte le contenu en colorant de la poudre et les quantités à utiliser n'ont pas besoin d'être très précises. Le mode de préparation est beaucoup plus important, particulièrement pour le colorant carbol-fuchsine car la solubilité de la fuchsine varie en fonction de sa composition.

Le laboratoire qui prépare les solutions de colorants est également responsable de l'identification correcte et du contrôle de qualité des colorants avant leur distribution. Au minimum, il faut écrire sur l'étiquette de chaque bouteille le type de colorant et la date de préparation. On emploiera la même méthode pour un lot de référence et on prendra note de son contrôle de qualité dans un registre pour les colorants. Le contrôle de qualité des colorants exige qu'ils soient testés sur un petit nombre de frottis fixés mais non colorés, comportant des frottis positifs et des frottis négatifs. Il est préférable que les frottis soient positifs à 1+ et soumis à un cycle unique de coloration avec évaluation du nombre et de l'intensité de coloration des BAAR visualisés. Les marques de fuchsine dont l'absorption maximale est supérieure à 550 nm colorent les BAAR solidement en rouge vif (particulièrement avec un colorant comprenant 1% de fuchsine / 5% de phénol et avec une durée de coloration suffisamment longue). Les contrôles négatifs démontrent l'absence de contaminants. Quant aux acides et au bleu de méthylène, ils exigent un cycle répétitif de colora-

Tableau II.1 Fournitures et réactifs utilisés pour préparer les solutions pour la coloration de Ziehl-Neelsen et méthode de coloration

Formule pour 1 litre de colorant carbol-fuchsine

Ethanol ou méthanol dénaturé	100 ml
Cristaux de phénol	50 g
* Fuchsine basique	10 g
Eau, distillée si possible	850 ml

* Dans de nombreuses recommandations, on trouve 3 g de fuchsine basique. Les auteurs de cette monographie préfèrent une concentration plus forte pour ajouter une marge de sécurité

Dissoudre le phénol dans l'alcool. Ajouter la fuchsine basique et agiter le mélange jusqu'à dissolution de tous les cristaux. Ceci peut être difficile pour certaines marques de fuchsine ; dans ce cas, ajouter une partie de l'eau, puis mélanger en agitant. Finalement ajouter le reste de l'eau et agiter de nouveau.

Transférer le colorant préparé dans une bouteille (de préférence sombre) et étiqueter « Colorant carbol-fuchsine, date de préparation = »

Formule pour 1 litre d'agent décolorant

Eau froide, distillée si possible	750 ml
Ajouter lentement l'acide sulfurique (concentré	250 ml
OU	
Ethanol 96%	970 ml
Ajouter l'acide chlorhydrique	30 ml

Formule pour 1 litre de solution de contre-colorant

Bleu de méthylène	3 g
Eau, distillée si possible	1.000 ml

Pour la coloration, les lames doivent être placées sur un porte-lame pour coloration disposé sur l'évier, face du frottis au dessus, bords séparés de la largeur d'un doigt

1. Couvrir entièrement la surface des lames avec la carbol-fuchsine de Ziehl, en laissant couler le colorant au travers d'un entonnoir garni d'un papier filtre (par exemple Whatman n° 1). Chauffer doucement jusqu'à formation de vapeur. Ne pas amener le colorant à ébullition ni le laisser sécher sur la lame. Laisser le colorant chaud pendant au moins 5 minutes.
2. Rincer doucement chaque lame avec de l'eau courante jusqu'à disparition de toutes les traces macroscopiques visibles de colorant. Couvrir chaque lame avec la solution décolorante pendant 3-5 minutes et rincer à l'eau courante. Incliner les lames au moyen de la pince pour laisser s'écouler l'eau de rinçage. Répéter cette étape pour les frottis qui paraissent encore rouges. Incliner les lames avec la pince pour évacuer l'eau de rinçage.
3. Couvrir les frottis avec la solution de bleu de méthylène et laisser le colorant agir au maximum pendant 1 minute. Rincer doucement chaque lame à l'eau courante jusqu'à disparition de l'excès de colorant. Laisser s'écouler l'eau en inclinant la lame avec une pince et laisser sécher les lames à l'air ambiant en évitant qu'elles soient au soleil.

tion avant l'examen microscopique. Les solutions fraîchement préparées de carbol-fuchsine n'ont pas besoin d'être filtrées pourvu qu'on les filtre lors de la coloration des lames, comme décrit plus haut. Les colorants seront conservés à l'abri de la lumière solaire directe, soit dans une bouteille sombre, soit dans un cabinet fermé. La durée de conservation des solutions de carbol-fuchsine varie en fonction de la qualité des réactifs, de leur préparation, de leur concentration et des conditions de conservation. Pour cette raison, les colorants devraient être préparés en quantité telle qu'ils soient consommés dans les douze mois. Pour l'acide et le bleu de méthylène, la durée de conservation ne se pose pas.

8. Examen microscopique par fluorescence à l'auramine O

L'examen microscopique par fluorescence est indiqué lorsque le nombre d'échantillons à examiner quotidiennement dépasse 30 par technicien et que le courant électrique est disponible de manière continue. Des exigences complémentaires en matière de formation et d'autres ressources (investissements financiers et entretien) doivent être prises en compte avant d'introduire l'examen microscopique par fluorescence. De plus, les lampes à vapeur de mercure ont besoin d'être fréquemment remplacées (durée de vie : 100 à 200 heures de travail). On n'en a pas souvent en stock car elles sont importées et coûtent très cher. En conséquence, elles sont souvent utilisées pendant une durée supérieure à celle recommandée et l'intensité lumineuse qu'elles produisent peut être insuffisante. Les lampes de ce type peuvent éclater et provoquer des dégâts importants au microscope. Le réglage de la lampe ne sera réalisé que par un agent expérimenté, sinon le microscope peut être défectueux sans qu'on s'en rende compte.

Le principal avantage de la fluorescence est la possibilité d'examiner les lames à un plus faible grossissement, ce qui permet l'observation d'une zone beaucoup plus étendue par unité de temps. L'examen microscopique par fluorescence exige seulement deux minutes pour examiner une zone qui demanderait dix minutes avec le microscope à fond clair. Son principal inconvénient est son coût ; un microscope à fluorescence coûte au moins cinq fois plus cher qu'un microscope à fond clair. La différence de rentabilité dépend principalement du salaire des techniciens: les examens par fluorescence deviennent de plus en plus rentables avec l'accroissement du coût du travail.

La coloration par fluorescence utilise la même approche que la coloration de Ziehl-Neelsen, mais la carbol-fuchsine est remplacée par un colorant fluorescent, l'acide pour décoloration est plus doux et la contre-coloration,

même si elle est utile pour étouffer la fluorescence de fond, n'est pas essentielle (Tableau II.2). Dans une très grande étude sur 23.000 échantillons positifs en culture du Statens Serum Institut de Copenhague, la sensibilité de la microscopie à fluorescence était légèrement supérieure à celle de la coloration de Ziehl-Neelsen, avec la même spécificité. En pratique, cela peut ne pas toujours être le cas. Une formation plus approfondie est nécessaire en microscopie à fluorescence pour atteindre la même spécificité que celle du Ziehl-Neelsen parce que, parmi les artéfacts fréquemment présents, certains peuvent ressembler au premier abord à des BAAR. A contrario, le contraste est meilleur, le nombre de champs examinés est plus important et le technicien moins fatigué, ce qui donne fréquemment une meilleure sensibilité, particulièrement en cas de charge de travail élevée ou lorsque les frottis contiennent peu de BAAR.

Le laboratoire national de référence de la tuberculose doit être compétent à la fois pour l'examen microscopique par Ziehl-Neelsen et par fluorescence. La technique originale de coloration à l'auramine O est recommandée pour l'examen microscopique par fluorescence. Avec l'auramine O, les BAAR se présentent en jaune clair sur un fond noir et peuvent être très bien vus avec un agrandissement aussi faible que 200x à 250x (objectif 20x à 25x et oculaires 10x). Si la présence d'un bacille est incertaine en raison du faible grossissement, on peut utiliser un objectif plus puissant (x40) pour confirmer la présence suspectée du bacille. Une autre technique consiste à recolorer pour confirmation par la technique de Ziehl-Neelsen les lames colorées à l'auramine O qui ont de rares BAAR. Cette dernière approche de confirmation de la présence de bacilles suspects implique certains problèmes. Sa reproductibilité peut être faible après recoloration parce que les rares BAAR peuvent avoir disparu après lavage. Ceci annule l'accroissement de sensibilité de la microscopie par fluorescence.

Le nombre de croix (+) attribué pour indiquer la densité en BAAR n'est pas le même qu'avec le microscope à fond clair en raison du grossissement plus faible et de l'examen d'un champ plus large qui en résulte. La zone d'examen augmente avec le carré de la valeur réciproque de la puissance relative de l'objectif, c'est-à-dire qu'un objectif de 40x avec un oculaire de 10x permet d'examiner une zone qui est d'environ cinq fois plus grande que celle vue au travers d'un objectif de 100x et un oculaire qui agrandit 10x, alors qu'il est de dix à douze fois plus grand par rapport à un grossissement de 200 à 250x. Il y a lieu d'ajuster le classement quantitatif des résultats

Tableau II.2 Fournitures et réactifs utilisés pour préparer le colorant fluorescent et méthode de coloration

Adapté de : Hagemann P K H. Fluoreszenzfärbung von Tuberkelbakterien mit Auramin. Münch Med Wschr 1938;85:1066-1068, with a modification by Kuratorium Tuberkulose in der Welt, Gauting, Germany.

Solution de coloration à l'auramine

Auramine O	1 g
Ethanol	100 ml
Phénol liquide	30 ml
Eau distillée	870 ml

* Dissoudre la poudre d'auramine O dans l'éthanol, le phénol liquide dans l'eau et mélanger les deux solutions. Cette solution sera conservée dans des bouteilles sombres.

Le phénol liquide est généralement préparé sous forme de solution stock par dissolution en chauffant 9 parts (poids) de cristaux de phénol dans 1 part (poids ou volume) d'eau. Cette solution chaude restera liquide à la température ambiante (le point de fusion du phénol est 43°C ; le phénol avec 6% d'eau fond à 20°C)

Solution de décoloration

Acide chlorhydrique (concentré)	10 ml
Ethanol 95% ou méthanol	990 ml

Toujours verser l'acide chlorhydrique dans l'eau (ne pas verser l'eau dans l'acide)

Solution pour étouffer la fluorescence de l'arrière-plan

Permanganate de potassium.....	0,5 g
Eau distillée	100 ml

Alternative pour la coloration de l'arrière-plan et la solution d'étouffement

Bleu d'encre.....	100 ml
Eau distillée	900 ml
Phénol liquide	5 ml

Cette coloration de l'arrière plan convient mieux lorsque la coloration des frottis au permanganate a été trop foncée, entraînant des difficultés pour la mise au point. Cela peut dépendre du système de microscopie utilisé.

Technique de coloration

Placer les lames sur le porte-lame de coloration, au dessus d'un évier, en laissant une certaine distance entre chaque lame

- 1) Laisser couler la solution d'auramine fraîchement filtrée sur les lames de sorte que les frottis soient complètement couverts
- 2) Laisser agir pendant 20 minutes
- 3) Bien couvrir les lames avec la solution acide
- 4) Laisser agir pendant 2 minutes
- 5) Rincer les lames à l'eau courante jusqu'à disparition des traces macroscopiquement visibles de colorant
- 6) Recouvrir les frottis avec la solution de permanganate de potassium ou avec la solution de bleu d'encre et laisser agir pendant 1 minute
- 7) Rincer à l'eau courante
- 8) Disposer les lames sur la tranche pour séchage

Le frottis coloré devrait avoir une couleur brun léger (ou bleue si coloré au bleu d'encre). Si la couleur est foncée, c'est que le frottis est trop épais.

en fonction du grossissement utilisé (voir Tableau II.3) pour permettre un classement comparable avec les divers grossissements.

Tableau II.3 Echelles de gradation pour le fond clair (Ziehl-Neelsen) et la microscopie à fluorescence

Echelle Union/ OMS Champ 1000x = 1 CFG*	Fond clair (grossissement 1000x 1 longueur = 2 cm = 100 CFG)	Fluorescence (grossissement 200-250x ; 1 longueur = 30 champs = 300 CFG)	Fluorescence (grossissement 400x ; 1 longueur = 40 champs = 200 CFG)
Négatif	Zéro BAAR / 1 longueur	Zéro BAAR / 1 longueur	Zéro BAAR / 1 longueur
Rares bacilles	1-9 BAAR / 1 longueur ou 100 CFG	1-29 BAAR / 1 longueur	1-19 BAAR / 1 longueur
1+	10-99 BAAR / 1 longueur ou 100 CFG	30-299 BAAR / 1 longueur	20-199 BAAR / 1 longueur
2+	1-10 BAAR / 1 CFG en moyenne	10-100 BAAR / 1 champ	5-50 BAAR / 1 champ
3+	> 10 BAAR / 1 CFG en moyenne	> 100 BAAR / 1 champ	> 50 BAAR / 1 champ

* CFG = Champ à fort grossissement.

D. Examen des frottis de crachats

Pour l'examen des frottis, il faut utiliser un microscope binoculaire avec un objectif à immersion à l'huile (grossissement 100x) et des oculaires de grossissement moyen (8x à 10x). Dans les pays où la fourniture d'électricité est irrégulière, il est préférable d'utiliser des microscopes recourant à la fois à l'éclairage électrique et à des sources directes de lumière. Lorsqu'on utilise un miroir, il faut choisir une zone bien éclairée et enlever le filtre bleu pour améliorer la luminosité du champ.

Avant d'examiner la lame, appliquer une goutte d'huile à immersion sur le bord gauche du frottis coloré ; faire attention à ne pas toucher la lame avec l'applicateur d'huile à immersion afin d'éviter une contamination potentielle de l'huile et le risque de transfert de BAAR vers le flacon ou vers une autre lame. Les BAAR apparaissent en rouge clair et le matériel d'arrière-plan contre-coloré en bleu. La forme des bacilles tuberculeux est très variable allant de fragments très courts à des types très allongés. Ils peuvent être colorés de manière uniforme, comporter des trous ou apparaître comme granuleux. Ils surviennent soit isolément, soit en petits groupes et rarement en grands agglutinats. L'aspect typique des bacilles tuberculeux correspond à des bâtonnets minces et légèrement incurvés. Si on observe des éléments ayant la coloration correcte et une

morphologie compatible, ils doivent être considérés comme des BAAR et consignés comme tels. Les mycobactéries environnementales et certaines espèces des genres *Nocardia* et *Corynebacterium* peuvent avoir un aspect similaire. Il ne faut pas tenter de les différencier par l'examen microscopique car on commettrait très facilement des erreurs. La morphologie des *Nocardia* est parfois très différente, par exemple sous forme de filaments ramifiés. Certaines bactéries et spores fongiques peuvent être acido-résistantes, mais elles sont faciles à distinguer des bacilles tuberculeux.

Au fil des années, on a proposé plusieurs échelles de gradation du nombre des BAAR trouvés dans un frottis. L'échelle de l'Union propose d'exprimer les résultats de lecture d'un frottis en cinq groupes qui doivent être enregistrés comme suit :

Observation	Enregistrement
Absence de BAAR dans au moins 100 champs	Négatif
1 à 9 BAAR pour 100 champs	nombre exact / 100
10 à 99 BAAR pour 100 champs	+
1 à 10 BAAR par champ dans au moins 50 champs	++
Plus de 10 BAAR par champ dans au moins 20 champs	+++

En règle générale, il suffit d'examiner une longueur d'un frottis de 20 mm (ce qui correspond à 100 champs examinés à un grossissement de 1000x) pour donner un résultat négatif. Toutefois, si l'examen de la longueur de 20 mm est exécuté par microscopie à fluorescence à un grossissement de 400x ou de 200x, la zone à examiner doit être ajustée en conséquence. Lorsqu'il est fait avec soin, l'examen de 100 champs à fort grossissement est suffisant et la prolongation de l'examen n'entraîne que très peu de positifs supplémentaires. Cette prolongation systématique entraîne une fatigue qui pourrait éliminer tout gain potentiel lié à l'examen d'une plus grande zone du frottis, voire même entraîner une perte.

Les résultats très faiblement positifs (un à trois bacilles pour 100 champs) ne sont pas en bonne corrélation avec la culture. Dans ce cas, l'examen d'un échantillon supplémentaire venant du patient devrait être fait pour confirmer le résultat. Par contre, les résultats entre quatre et neuf bacilles pour 100 champs ont une bonne corrélation avec la culture. Dans un réseau de laboratoires fonctionnant bien, ces échantillons sont virtuellement toujours confirmés lorsqu'un autre échantillon est examiné. C'est le programme national et non le technicien individuel du laboratoire qui doit décider si oui ou non, la mise en évidence de très rares bacilles est

considérée comme significative. Un tel résultat sera enregistré comme il a été lu et ne sera jamais modifié après avoir été enregistré dans le registre ou sur le formulaire de déclaration.

E. Enregistrement et transmission des résultats des examens de frottis de crachats

Le registre spécifique créé pour les examens de tuberculose dans le laboratoire s'est avéré très utile (Annexe 2). Deux caractéristiques essentielles de ce registre recommandé par l'Union sont essentielles : 1) la distinction faite entre les suspects de tuberculose se présentant pour un examen de diagnostic et les patients atteints de tuberculose se présentant pour un examen bactériologique de suivi ; 2) une seule ligne est attribuée à chaque individu examiné (et non une ligne à chaque examen). Cela facilite le calcul de la proportion de cas parmi les suspects ce qui, à son tour permet le calcul des besoins en produits de laboratoire en se basant sur le nombre de cas déclarés à bacilloscopie positive dans le rapport trimestriel de dépistage. De plus, la distinction entre examens pour suivi et examens pour suspects, avec la présentation claire des résultats des séries de diagnostic facilite grandement l'étude des divers indicateurs de qualité des examens qui seront décrits plus loin.

Les résultats inscrits dans le registre de laboratoire peuvent ne pas être fiables. Parfois, les résultats du seul échantillon examiné sont copiés dans les colonnes destinées aux deuxième et troisième échantillons ; parfois, tous les examens de suivi sont enregistrés comme négatifs, ce qui suggère qu'on n'a pas porté l'attention nécessaire à un examen soigneux de ces échantillons en supposant qu'ils devraient tous être négatifs ; parfois, les résultats très faiblement positifs font défaut ou sont rares (à nouveau une indication d'un examen insuffisamment soigné). Des pratiques médiocres de ce genre sont mauvaises pour la prise en charge du patient ; elles rendent difficile l'évaluation des performances du programme et enlèvent toute valeur à l'évaluation de la qualité du laboratoire. Des enregistrements fictifs peuvent résulter d'une insistance exagérée sur les directives et les objectifs du programme ; par exemple ces falsifications peuvent être encouragées lorsque les superviseurs du programme insistent lourdement sur la nécessité impérieuse d'avoir trois frottis pour chaque suspect ou sur une proportion de négativation à deux mois impossible à atteindre. Le technicien de laboratoire se doit de déclarer et enregistrer ce qu'il a vraiment observé et les superviseurs devraient considérer qu'un enregistrement précis et véritable est un indicateur important de la qualité du laboratoire.

Bibliographie

1. Aber V R, Allen B W, Mitchison D A, Ayuma P, Edwards E A, Keyes A B. Quality control in tuberculosis bacteriology. I. Laboratory studies on isolated positive cultures and the efficiency of direct smear examination. *Tubercle* 1980; 61: 123-133.
2. Allen J L. A modified Ziehl-Neelsen stain for mycobacteria. *Med Lab Sci* 1992; 49: 99-102.
3. Bennedsen J, Larsen S O. Examination for tubercle bacilli by fluorescence microscopy. *Scand J Respir Dis* 1966; 47: 114-120.
4. Bishop P J, Neumann G. The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle* 1970; 51: 196-206.
5. Engbaek H C, Bennedsen J, Olesen Larsen S. Comparison of various staining methods for demonstration of tubercle bacilli in sputum by direct microscopy. *Bull Int Union Tuberc* 1969; 42: 94-110.
6. Hagemann P K H. Fluoreszenzfärbung von Tuberkelbakterien mit Auramin. *Münch Med Wschr* 1938; 85: 1066-1068.
7. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Technical guide. Sputum examination for tuberculosis by direct microscopy in low income countries. Paris, France: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2000.
8. Ipuge Y A I, Rieder H L, Enarson D A. The yield of acid-fast bacilli from serial smears in routine microscopy laboratories in rural Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90: 258-261.
9. Kubica G P. Correlation of acid-fast staining methods with culture results for *Mycobacteria*. *Bull Int Union Tuberc* 1980; 55: 117-124.
10. Lawson L, Yassin M A, Ramsay A, Oladjide I, Thacher T D, Davies P D O, et al. Microbiological validation of smear microscopy after sputum digestion with bleach; a step closer to a onestop diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 2006; 86: 34-40.
11. Rieder H L, Arnadottir T, Tardencilla Gutierrez A A, Kasalika A C, Salaniponi F L M, Ba F, et al. Evaluation of a standardized recording tool for sputum smear microscopy for acidfast bacilli under routine conditions in low income countries. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; 1: 339-345.
12. Smithwick R W. Laboratory manual for acid-fast microscopy. Atlanta, GA, USA: US Public Health Service, 1976.

CHAPITRE III

Formation et assurance qualité pour l'examen microscopique des frottis de crachats

A. Formation des techniciens à l'examen microscopique des frottis de crachats

Une des tâches essentielles du laboratoire national de référence de la tuberculose consiste à standardiser la formation des techniciens de laboratoire. Un plan global des besoins en formation doit être élaboré en tenant compte de la rotation du staff et des besoins d'extension du programme dans le pays. La responsabilité générale du niveau et de la fréquence des formations des techniciens de laboratoire repose sur le laboratoire national de la tuberculose. Celui-ci devrait également permettre aux agents de se former sur le tas sous la supervision directe de techniciens de laboratoire expérimentés. Il encouragera les laboratoires du niveau intermédiaire à développer un curriculum standardisé pour la formation des techniciens de laboratoire, formation initiale et recyclage, pour permettre une décentralisation progressive de ces activités. Il élaborera un texte écrit sur le curriculum de formation et un manuel sur les procédures standard de travail pour les techniciens de laboratoire.

L'examen microscopique des BAAR n'est pas difficile à apprendre, la difficulté consiste à maintenir une coloration et une lecture de haute qualité. On n'attribuera à la théorie qu'un petit nombre d'heures de formation. Il est très important que la théorie soit suivie par des exercices pratiques qui peuvent durer jusqu'à une semaine, puis par une supervision du travail dans le service lui-même pour pouvoir confirmer sur place les bons résultats attendus de la formation. La capacité à identifier correctement les bacilloscopies négatives est contrôlée sur échantillonnage par l'assurance qualité. Pour obtenir qu'un temps suffisant soit consacré à la pratique de préparation et de lecture des frottis, il faut fixer des objectifs, par exemple en exigeant que 100 lames positives de divers degrés de positivité et un nombre égal de lames négatives soient lues par le stagiaire.

Le contenu de la formation comportera l'ensemble des principes du programme national de la tuberculose et de la stratégie DOTS afin d'aider les stagiaires à les comprendre pleinement, de renforcer leur motivation

pour le programme de lutte contre la tuberculose ainsi que leur rôle au sein de ce programme.

Le stagiaire doit acquérir, grâce aux cours et aux exercices pratiques intensifs, l'ensemble des connaissances et du savoir faire sur les aspects techniques suivants de l'examen microscopique des frottis pour recherche des BAAR :

- recueil des crachats, conservation et transport en vue de l'examen microscopique des BAAR et de la culture
- préparation des frottis à partir de particules muco-purulentes des crachats
- fixation, coloration, décoloration et contre-coloration
- utilisation adéquate du microscope et lecture des lames
- rendu des résultats aux agents de santé et enregistrement des données dans le registre de laboratoire de la tuberculose
- entretien (et réparations mineures) du microscope
- conservation des lames pour l'évaluation externe de qualité
- désinfection, stérilisation et élimination des produits contaminés
- mesures et pratiques de sécurité lors de la manipulation des échantillons de crachats en vue de l'examen microscopique
- identification des problèmes survenant au cours de l'examen microscopique des frottis de crachats.

L'intérêt des cours de remise à jour est plus discutable. Ils sont essentiels lorsqu'on modifie les stratégies (par exemple, modification de la technique de coloration), sinon les techniciens qui exécutent régulièrement l'examen microscopique pour la recherche de BAAR et qui sont bien supervisés avec évaluation externe de la qualité, n'ont probablement pas besoin de tels cours de remise à jour. A l'occasion, ces cours peuvent être utilisés comme éléments complémentaires de motivation.

B. Assurance qualité de l'examen microscopique des frottis de crachats

L'objectif d'un *programme d'assurance qualité* est d'améliorer l'efficacité et la fiabilité des services de microscopie des frottis. Un programme d'assurance qualité comporte trois composantes principales :

- *Le Contrôle de qualité (CQ)* : suivi interne systématique des pratiques de travail, des procédures techniques, de l'équipement et du matériel, y compris la qualité des solutions de colorants.
- *L'Évaluation externe de qualité (EEQ)* : processus d'évaluation des performances du laboratoire par des personnes extérieures à ce laboratoire. L'EEQ comporte une évaluation sur place pour superviser le CQ avec relecture sur place de quelques lames récentes. L'EEQ permet d'identifier les laboratoires à problèmes en comparant leurs résultats avec ceux obtenus dans d'autres laboratoires du réseau (laboratoires intermédiaires et centraux) grâce à des tests et des contrôles en série.
- *L'Amélioration de la qualité (AQ)* : processus par lequel les composantes des services de diagnostic de microscopie des frottis sont analysées pour chercher les moyens d'éliminer les obstacles limitant leur succès. La collecte des données, leur analyse et la recherche de solutions créatives aux problèmes sont les composantes-clés de ce processus. Il comporte une évaluation systématique du travail réalisé, l'identification des problèmes, puis une intervention correctrice pour prévenir la récurrence des défauts. C'est au cours des visites de supervision sur le terrain que la solution des problèmes s'avère la plus efficace.

1. Contrôle de qualité (CQ) de l'examen microscopique des frottis de crachats

Maintien de la compétence technique

Pour développer et maintenir la compétence en matière d'exécution des examens microscopiques des frottis de crachats et de leur interprétation, un laboratoire périphérique doit couvrir une population de 50 000 à 100 000 habitants, selon l'incidence des suspects de tuberculose dans la population et l'utilisation des services de santé. On peut y parvenir à condition qu'un suivi continu de la qualité permette une identification précoce des laboratoires où le nombre d'erreurs est excessif.

Coloration

Idéalement le contrôle de qualité interne comporte le suivi de la qualité du colorant et de la procédure de coloration en incluant au moins une lame connue comme positive dans chaque série de frottis de routine. Les frottis positifs de contrôle aident également le personnel à faire la différence entre les BAAR et les artéfacts. Quand c'est possible, une seconde personne devrait contrôler tous les frottis déclarés positifs.

Au minimum, chaque nouveau lot de solution de coloration sera contrôlé avant d'être livré ou utilisé ; il faut enregistrer la date de préparation (qui sert aussi de numéro de lot), la destination et les résultats du contrôle. On utilisera trois frottis positifs et trois frottis négatifs pour ce contrôle.

Les contrôles positifs seront des frottis positifs à 1+ car ils permettent un décompte précis des BAAR. Il faut utiliser de l'eau distillée pour le rinçage afin d'éviter toute possibilité de contamination par l'eau (mycobactéries environnementales dans l'eau) et se mettre dans la position optimale pour pouvoir attribuer à des solutions de colorant défectueuses (contaminées) toute anomalie détectée dans les frottis négatifs de contrôle. Les frottis négatifs de contrôle subiront trois cycles complets de coloration avant examen afin d'augmenter la probabilité que les contaminants éventuels adhèrent aux frottis et se colorent comme acido-résistants, ce qui permettrait d'identifier les colorants déficients (contaminés).

Suivi interne de la détection des cas

La surveillance mensuelle de la proportion de cas positifs parmi les suspects est un outil relativement simple d'identification du rendement des examens de laboratoire (Figure III.1). Un tel graphique apporte une aide visuelle immédiate à toutes les personnes concernées (le technicien, les cliniciens et l'équipe de direction de la tuberculose) même sans estimation de la déviation standard provenant d'un échantillon annuel.

Les résultats peuvent indiquer une déficience dans les procédures de dépistage par les cliniciens ou des déficiences du laboratoire ou les deux. Si la proportion de cas parmi les suspects dépasse une certaine valeur critique (qui pourrait être définie comme deux erreurs standard au dessus de la moyenne annuelle), cela peut indiquer que les cliniciens utilisent des critères de sélection trop stricts pour l'identification des patients suspects de tuberculose ou qu'il y a de grands obstacles d'accessibilité des patients aux services de santé ; cela peut indiquer aussi que le laboratoire examine les échantillons avec plus d'attention ou qu'il notifie par erreur des BAAR. A contrario, si la fréquence des cas parmi les suspects baisse en dessous d'une certaine valeur critique (qui pourrait être définie comme deux erreurs standard en dessous de la moyenne annuelle), on peut se demander si les cliniciens n'ont pas des critères trop lâches pour demander des examens à des patients qui ne devraient pas être considérés comme suspects de tuberculose, ou si le colorant s'est détérioré, ou si le laboratoire est moins attentif lors de l'examen des frottis de crachats et laisse échapper de vrais cas.

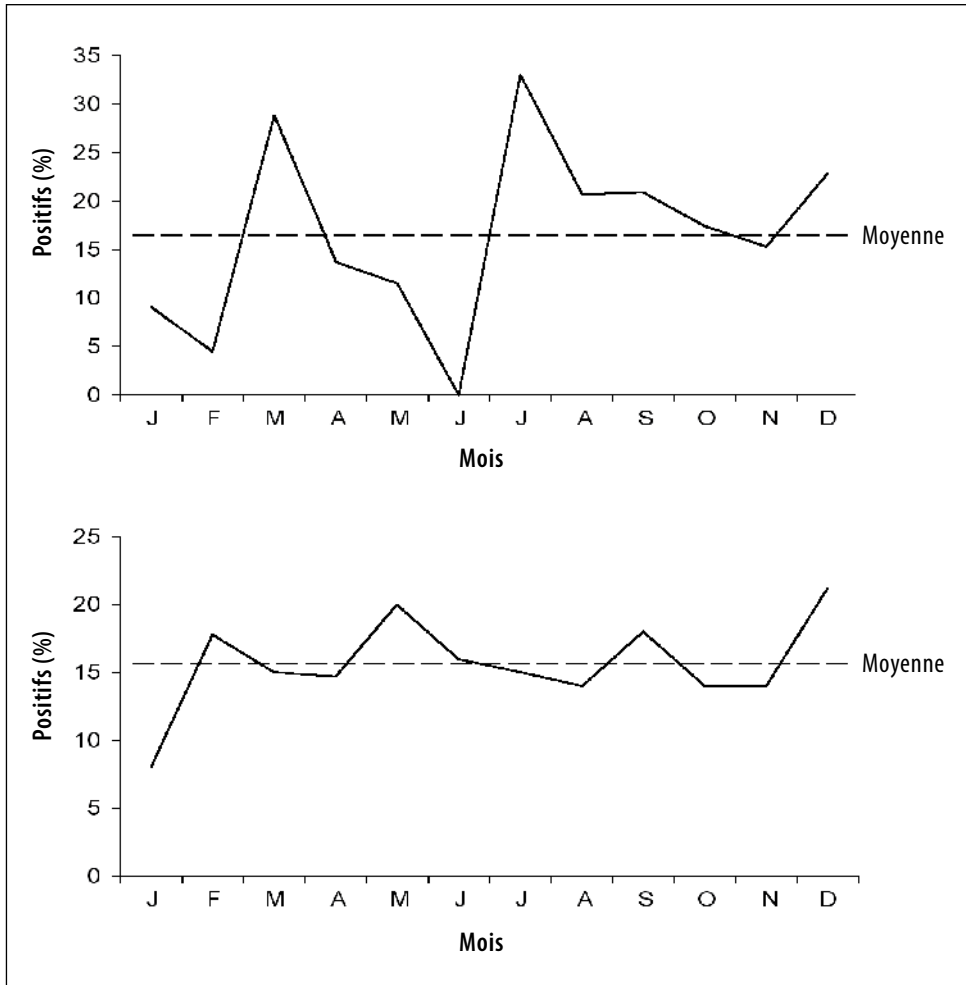


Figure III.1 Exemple de la proportion des cas de tuberculose parmi les suspects au laboratoire, selon le mois. Données aimablement fournies par le Projet Bangladesh de la Fondation Damien.

2. Evaluation externe de qualité (EEQ) de l'examen microscopique des frottis de crachat

Il y a trois méthodes principales d'EEQ des résultats de l'examen microscopique des frottis :

- les tests en série (du centre vers la périphérie),
- le suivi de la qualité de la bacilloscopie des crachats au cours des visites de supervision,
- le contrôle à l'aveugle des lames (de la périphérie vers le centre).

Ces trois méthodes ont chacune des avantages et des inconvénients et par conséquent il est conseillé de développer en parallèle plusieurs méthodes en spécifiant les objectifs de chacune d'elles (Tableau III.1). Une description détaillée des indications, des exigences et de la réalisation technique de chacune de ces méthodes figure à la référence 2.

En plus de ces méthodes d'EEQ, certains aspects du suivi externe des performances du laboratoire sont appréciés à partir des déclarations régulières d'activités. Quoique ces déclarations n'aient pas été jusqu'à présent une pratique généralisée, elles sont utiles en complément de l'EEQ ou pour fournir des informations de base lorsqu'une EEQ efficiente (voir plus loin) n'est pas (encore) réalisable. Un formulaire simple de déclaration est recommandé ; il permet l'analyse de la charge de travail, de certains indicateurs de qualité et des besoins en consommables (Annexe 3). Pour un maximum d'efficacité, il devrait être complété et envoyé par le technicien de laboratoire pour que le PNT ait des informations sur les performances du laboratoire. De plus, ce rapport permettra un suivi interne et facilitera l'échantillonnage au hasard des lames pour le contrôle, ce qui simplifiera le travail des superviseurs.

EEQ par envoi d'un lot de lames-tests du centre vers la périphérie

La façon la plus simple d'évaluer la performance des laboratoires périphériques est d'organiser périodiquement des exercices de lecture de lames-tests dans des laboratoires ciblés. Pour cela, on recueille périodiquement des lames de bonne qualité que l'on conserve dans sept boîtes de lames. Ces boîtes sont gardées dans un lieu frais et sec pour prévenir l'atténuation de la coloration à la fuchsine. Trois boîtes de conservation sont destinées aux lames négatives, une boîte aux lames classées comme très faiblement positives, une pour les lames positives de degré 1+, une pour les lames de degré 2+ et une pour les lames de degré 3+. Tous les 6 mois, des lots de six lames (trois négatives, une très faiblement positive, une positive de degré 1+ et une de degré 2+) sont envoyées simultanément à tous les laboratoires ciblés ; on leur demande de renvoyer un formulaire complété avec les résultats de chaque lame (Annexe 4) dans une enveloppe de réponse incluse préaffranchie à l'adresse du destinataire.

Cette méthode ne contrôle pas la qualité de la coloration et comporte plusieurs lacunes importantes. Il n'est pas certain que toutes les lames initialement trouvées négatives le soient réellement et les positives peuvent se décolorer malgré les précautions prises, de sorte qu'il est nécessaire de recontrôler au laboratoire de référence, les lames pour lesquelles des erreurs

sont signalées. Pour ces raisons et pour évaluer les compétences en matière de coloration, l'envoi d'une combinaison de frottis colorés et de frottis non colorés dont le résultat est connu est une approche plus utile. Elle exige toutefois une préparation plus sophistiquée par le laboratoire de référence et l'utilisation d'échantillons de crachats homogénéisés avec validation minutieuse des lots fabriqués selon la description de la référence 2.

**Tableau III.1 Evaluation externe de qualité (EEQ)
pour l'examen microscopique des frottis de crachats**

Méthode	Avantages	Inconvénients	Utilisation
Supervision sur place	• Contact direct • Observation du travail réel • Motivation du staff • Identification des causes d'erreurs • Vérification de l'équipement et des consommables	• Sélective, ne porte pas sur l'ensemble du pays si assurée uniquement par le laboratoire de référence • Lourde charge de travail • Coût élevé	• Toujours au cours des visites de supervision
Re-contrôle à l'aveugle (de la périphérie vers le centre)	• Conditions de routine • Peut être motivant • Faible charge de travail pour la périphérie	• Travail lourd pour le niveau central • Imprécisions inévitables • Exige une technique très soignée pour obtenir des résultats corrects • Le personnel doit être rendu disponible	• Standard pour la surveillance
Lots de lames-tests (du centre vers la périphérie)	• Faible charge de travail pour le centre • Réponse rapide dans l'ensemble du pays • Peut conduire indirectement à l'identification de défauts d'équipement	• Teste les compétences mais pas nécessairement les performances de routine • Bonnes séries de lames difficiles à préparer	• Après formation • Evaluation rapide des besoins en formation et en équipement • Investigation/confirmation des problèmes suspectés au cours du contrôle

La technique du lot de lames-tests permet d'obtenir de manière efficace une évaluation rapide de la capacité technique, tant par le laboratoire de référence que par les laboratoires périphériques, à lire des lames dans la zone choisie. Si des discordances importantes sont observées par rapport aux résultats attendus, le problème ne réside pas toujours dans la capacité

de l'examineur, mais peut indiquer un équipement de médiocre qualité (particulièrement le microscope) ou une source de lumière insuffisante. La méthode est utilisée en routine après la formation de nouveaux techniciens (ou des cours de mise à niveau) afin d'évaluer leurs performances optimales. C'est la seule méthode raisonnable d'EEQ dans les pays riches à faible prévalence où le contrôle de frottis de routine a un coût prohibitif.

L'inconvénient majeur de la méthode réside dans le fait que les techniciens disposent d'un temps illimité pour l'examen des lames de contrôle (sauf si le test est fait pendant une supervision ou durant un cours de formation) et qu'ils sont conscients d'être soumis à un test. Cette méthode ne donne certainement pas une évaluation de la qualité de la lecture des lames dans les conditions de routine ; elle peut uniquement mesurer la capacité des techniciens à lire (et colorer) correctement les lames. Malgré ses limites, bien appliquée, cette méthode permet d'obtenir une remarquable amélioration de la qualité de la microscopie.

Les résultats globaux peuvent être exprimés de trois façons :

- analyse par lame individuelle,
- analyse de sous-groupes de lames positives et négatives,
- analyse de l'ensemble des lames.

L'analyse par lame individuelle permettra d'exclure les lames de certains lots pour lesquelles un nombre trop élevé de participants signalent des résultats aberrants liés au manque de régularité du lot produit. Dans l'exemple présenté au Tableau III.2, la performance des techniciens était relativement médiocre puisque seulement la moitié d'entre eux ont été capables d'identifier correctement sur 6 lames toutes les positives et négatives. Une telle déviation par rapport au résultat attendu pose de sérieuses questions non au sujet de la capacité des techniciens mais au sujet de la qualité de leur équipement. Elle identifie les laboratoires où une visite de supervision s'impose d'urgence.

L'évaluation des techniciens individuels exige un système de score plus élaboré dans lequel on donne à chaque lame un nombre égal de points. Une erreur sérieuse ne rapporte pas de point, alors qu'une erreur peu grave fera gagner la moitié des points. Les totaux des points remportés sont alors comparés à un score-cible minimum qui peut être prédéfini ou dérivé des résultats obtenus (voir la Référence 2).

Un lot de lames colorées (et/ou non colorées) peut également être utilisé pour évaluer les capacités de lecture (et de coloration) des stagiaires avant et après la formation.

Tableau III.2 Exemple d'une analyse des résultats de lots de lames-tests utilisant 3 lames négatives et 3 lames positives de divers degrés envoyées du laboratoire de référence vers 42 laboratoires périphériques. Analyse par lame et par groupes de lames

Données fournies gracieusement par le Dr Fatoumata Ba, Programme National de Lutte contre la Tuberculose, Sénégal

Analyse par lame			
Laboratoire périphérique	Résultats du laboratoire de référence		
	Positif	Négatif	Total
Positif	115	15	130
Négatif	11	111	122
Total	126	126	252
Pourcentage de lames positives discordantes (11/126) :			
8,7%			
Pourcentage de lames négatives discordantes (15/126) :			
11,9%			
Pourcentage de lames discordantes de l'ensemble ((11+15)/252) :			
10,3%			
Analyse par groupe de lames positives et négatives			
Nombre de lectures correctes d'un lot de trois lames positives :			
32 sur 42			
Pourcentage de lectures correctes d'un lot de trois lames positives :			
76,2%			
Nombre de lectures correctes d'un lot de trois lames négatives :			
29 sur 42			
Pourcentage de lectures correctes d'un lot de trois lames négatives :			
69,0%			
Analyse de l'ensemble d'une série de six lames			
Nombre de lectures correctes d'un lot de six lames :			
21 sur 42			
Pourcentage de lectures correctes d'un lot de six lames :			
50,0%			

Suivi de la qualité de la bacilloscopie des frottis de crachats au cours des visites de supervision sur le terrain

Les visites des laboratoires périphériques par le personnel du laboratoire de référence sont essentielles pour diverses raisons. Seule la visite sur le terrain peut fournir une image réaliste des conditions dans lesquelles les techniciens travaillent. Elle permet de contrôler la structure générale du laboratoire, l'état de l'équipement et l'adéquation de la logistique des consommables. Comme on est dans le domaine propre du technicien, les soucis et les problèmes rencontrés au cours du travail peuvent y être exprimés plus librement. Toutefois, dans la plupart des pays, le laboratoire national de référence ne peut rendre visite qu'à un nombre très limité de

laboratoires périphériques ; cette tâche de routine est principalement la tâche des laboratoires intermédiaires.

Idéalement, il faudrait planifier une visite permettant d'observer le travail exécuté durant toute une journée. Ce travail comporte la collecte et la réception des échantillons, la coloration, l'examen, l'enregistrement et la déclaration. Seule une visite de ce type pendant une journée entière permet une discussion en profondeur de toutes les déviations observées par rapport aux procédures recommandées. Toutefois, s'il n'est pas possible de passer un jour complet dans un seul laboratoire, la visite de supervision reste utile pour s'enquérir des problèmes, prélever un échantillon de lames pour relecture, donner une rétro-information, confirmer que l'approvisionnement est suffisant et motiver les techniciens en leur faisant percevoir qu'ils font partie d'un programme national. Il est clair qu'une visite courte s'intéressant à ces éléments peut être exécutée, et c'est même souhaitable, par des professionnels autres que des techniciens de laboratoire, c'est-à-dire par les superviseurs du programme de tuberculose. Ils doivent apprendre les principes de base de certains aspects de la supervision des bacilloscopies, tels que l'enregistrement et l'échantillonnage pour relecture. Toutefois, les solutions pour les problèmes rencontrés exigeront habituellement la visite d'un professionnel de laboratoire.

Les questions qu'il faut se poser au cours d'une visite de supervision touchent quatre domaines :

- personnel, infrastructure, sécurité et équipement,
- stocks de fournitures et de consommables,
- enregistrement et transmission des résultats,
- performances.

On trouvera à la référence 2 des listes de contrôle détaillées couvrant ces différents aspects. Elles peuvent être utilisées par les superviseurs généraux.

Personnel, infrastructure, sécurité et équipement

Personnel

Le principal défi de la bacilloscopie des frottis est le facteur humain. La technique n'est pas difficile à maîtriser, même si elle est fastidieuse à effectuer jour après jour. Pour ces raisons, il n'est pas inhabituel que la performance d'un staff moins qualifié, comme les auxiliaires de laboratoire, soit meilleure que celle de techniciens hautement qualifiés, plus intéressés par des tests techniquement complexes.

Les besoins et la prise en charge du personnel du laboratoire varient en fonction du lieu. Dans beaucoup de pays à faibles revenus, une grande partie du travail de diagnostic au sein du programme national de tuberculose est effectué dans des sites ruraux. Dans de tels contextes, le travail qu'exige la lutte antituberculeuse est exécuté par un technicien de laboratoire polyvalent pour que la tuberculose ne constitue qu'une de ses responsabilités.

Cependant, le travail concernant la tuberculose est de plus en plus exécuté dans des contextes urbains où la charge de travail peut être très lourde et où les besoins en personnel sont fréquemment sous-estimés. Il peut arriver (quoique ce ne soit pas fréquent) que la seule tâche du technicien concerne la tuberculose. Dans un tel contexte, il faut bien analyser la charge de travail et envisager l'utilisation de la microscopie à fluorescence en pratique de routine.

Au cours de la supervision, il y a lieu d'estimer la charge de travail quotidienne moyenne par technicien et faire ultérieurement tout ce qui est possible pour remédier à la surcharge des techniciens. Une moyenne supérieure à 30 lames par technicien et par jour de travail signifie que certains jours, il faut traiter beaucoup plus de 30 lames. Quoique cela puisse paraître réalisable, si l'on calcule simplement le temps nécessaire, il est illusoire de penser qu'un travail fiable puisse être exécuté sur tant de lames. Si la charge de travail est excessive et que les moyens et l'infrastructure le permettent (habituellement uniquement dans les laboratoires régionaux ou ceux des grands hôpitaux), il est préférable de fournir un microscope à fluorescence qui multipliera immédiatement environ par cinq la productivité. Après une mise en route qui demande une grande attention, les résultats seront probablement plus fiables que ceux de cinq techniciens ayant chacun un microscope ordinaire (ce qui de toutes manières n'est souvent pas réalisable).

Infrastructure

Les visites veillent à évaluer dans quelle mesure les locaux sont adéquats pour permettre de bonnes performances de travail. Quand les visites sont régulières, il n'est pas nécessaire de contrôler l'infrastructure chaque fois, sauf si des modifications majeures sont survenues depuis la dernière visite. Le local doit avoir une surface suffisante pour être divisé au moins en deux zones, une pour l'enregistrement et la bacilloscopie, l'autre pour le traitement des crachats et des frottis ; il disposera d'une structure pour l'élimination sans risque des déchets. La disposition des lieux doit permettre un déplacement aisé de toutes les personnes au travail. Une bonne ventilation est essentielle pour la sécurité. Une lumière naturelle suffisante, outre le fait qu'elle permet l'examen microscopique en l'absence

d'électricité, améliore également la protection de ceux qui travaillent au laboratoire. La disposition d'eau courante, d'électricité et une évacuation satisfaisante des eaux usées constituent les conditions optimum, mais elles ne sont pas toujours disponibles malgré tous les efforts déployés. Les tâches peuvent être exécutées de manière satisfaisante sans eau courante ni électricité si, au minimum, une eau propre peut être obtenue à partir d'une source proche et si le microscope et les conditions d'éclairage permettent un examen des lames en l'absence de courant.

Sécurité au laboratoire périphérique

La sécurité peut être évaluée par l'examen de l'équipement existant et par la surveillance du traitement des échantillons. L'aspect le plus important de la sécurité est la méthode de collecte de l'échantillon de crachat auprès du patient. Elle doit toujours avoir lieu en plein air. L'obtention d'échantillons par induction de crachats ou par bronchoscopie exige des précautions particulièrement rigoureuses.

Les blouses de laboratoire sont d'un faible coût dans la plupart des pays et leur fourniture ne devrait pas poser problème. Quoique l'on recommande l'emploi d'applicateurs à usage unique (le meilleur étant le bambou), lorsque l'on utilise une anse bactériologique il faut disposer d'un récipient comportant du sable et de l'alcool pour la nettoyer avant de la flamber. Les méthodes utilisées pour évacuer les déchets de matériel infecté tels les récipients de crachats et les bâtonnets applicateurs doivent être examinées de près. Un tel matériel ne peut certainement pas simplement être jeté dans une fosse peu profonde ou déversé dans un coin de la parcelle. Quoique d'une durée de vie relativement courte, un simple fût à brûler constitue l'outil le plus approprié. Très souvent, le trempage ou l'ébullition dans des désinfectants pourraient être plus aisés mais ils sont souvent rapidement abandonnés en raison de leur caractère déplaisant. L'utilisation d'un autoclave n'est que rarement possible. Il faut s'assurer de la présence de l'équipement nécessaire et rechercher en même temps les preuves de son utilisation récente.

Les cabinets de sécurité ne sont pas recommandés pour l'activité de bacilloscopie des frottis. Ils ne sont pas nécessaires parce que le travail ne comporte qu'un faible risque pour les techniciens de laboratoire, pour autant qu'existe une bonne ventilation du laboratoire et que les procédures standard de sécurité soient respectées. Les cabinets de sécurité biologique commerciaux ont besoin d'être contrôlés et entretenus régulièrement par des techniciens homologués, ce qui est souvent impossible. Négliger un tel entretien peut entraîner un mauvais fonctionnement du cabinet et augmen-

ter le risque d'infection pour les techniciens. Les cabinets montés sur place sont souvent construits de manière si imparfaite qu'ils sont inutiles ou même dangereux. En cas de craintes particulières, par exemple en raison d'une insuffisance de ventilation de l'espace de laboratoire, la meilleure solution peut être de placer au mur un ventilateur assurant une extraction continue de l'air. Les lampes à ultraviolets sont beaucoup moins efficaces qu'une bonne ventilation, non seulement à cause des déficiences d'installation, de remplacement et d'entretien, mais aussi en raison de la faible protection qu'elles assurent. Elles ne peuvent être utilisées qu'une fois le travail terminé ou sous forme de lampes à boucliers protecteurs, ce qui fait que l'air entourant le technicien au travail n'est pas directement stérilisé.

Pour manipuler les crachats à la recherche de la tuberculose, il n'est pas conseillé d'utiliser des gants sauf pour la préparation des solutions de colorants. L'utilisation de gants n'a pas de sens vu la voie aérogène de transmission de la tuberculose. De plus, on les change toujours trop peu fréquemment, ce qui entraîne une contamination tout autour du laboratoire, et enfin le financement nécessaire à des gants de bonne qualité est généralement prohibitif. Les masques chirurgicaux ne protègent pas le travailleur de laboratoire ; les masques respiratoires filtrant de manière fiable les particules de moins de 5 micromètres sont coûteux et rarement utiles dans les laboratoires de microscopie quand ces derniers sont ventilés conformément aux recommandations.

Equipement

Il faut disposer (Tableau V.1) d'un nombre suffisant de tables et de chaises, d'un bassin (en plastic) pour la coloration et d'un grand seau à couvercle pour les déchets infectés. C'est au superviseur que revient la responsabilité d'obtenir ce matériel pour le laboratoire. Un filtre à eau de type bougie est une exigence minimale pour le centre si l'on y prépare des solutions de colorants et que l'on n'y dispose pas d'eau distillée. Un minimum d'équipement d'incinération ou de désinfection des déchets contaminés doit être disponible à l'intérieur ou à proximité du laboratoire.

Un bon microscope est absolument essentiel à l'obtention de résultats fiables. Le microscope choisi sera solide et ses optiques de qualité supérieure. Les responsables du programme doivent faire tous les efforts nécessaires pour obtenir des microscopes de haute qualité. Ils s'assureront auprès de ceux qui sont responsables des achats que le choix n'est pas déterminé principalement par les coûts. Des ampoules de rechange sont obligatoires ; elles doivent se trouver dans chaque unité de microscopie alors que les autres éléments de rechange et les microscopes de réserve

seront conservés au laboratoire régional ou au laboratoire national de référence de la tuberculose dans un magasin sécurisé, de préférence climatisé. Une réaction rapide s'impose lorsqu'un centre rencontre des problèmes de microscope. Les exigences minimales pour un microscope utilisé pour la tuberculose comportent un plateau mécanique, des oculaires de grossissement 8x à 10x et un bon objectif de grossissement 100x. Le choix d'un objectif plan ou demi-plan du type 100x peut être une bonne idée car il facilitera le travail et la qualité sera automatiquement meilleure. Il faut commander des microscopes avec une source lumineuse électrique mais dans beaucoup d'endroits les miroirs sont également nécessaires car l'électricité n'est pas permanente. Quoique des microscopes binoculaires soient recommandés, les microscopes monoculaires peuvent être adéquats lorsque le nombre de lames à lire est faible ; ils sont même parfois préférables à cause de leur plus grande luminosité en cas d'utilisation du miroir. Dans les grands centres, on peut préférer un microscope à fluorescence. Dans ce cas, il faut s'assurer qu'il existe à tout moment au moins une ampoule de réserve pour le brûleur d'excitation et que les techniciens sachent la placer et l'ajuster correctement. Enfin, comme il est difficile de remplacer les bons microscopes, il faut veiller à les garder en bon état. Dans beaucoup de pays, cela signifie d'abord qu'on prenne toutes les précautions contre le vol, notamment une chambre forte munie d'une serrure. Dans les pays à climat sec, lorsqu'ils ne sont pas utilisés, les microscopes sont gardés sous une housse pour la poussière ou dans un coffret de transport spécial. Toutes les ouvertures prévues pour placer les objectifs ou les oculaires doivent être fermées (par une des lentilles, par un bouchon de plastic ou un morceau de ruban adhésif). Dans les climats humides, les champignons représentent une menace pour le système optique du microscope. La prévention de la contamination par champignons comporte le séchage quotidien des lentilles, ce qui peut être réalisé par la ventilation et la chaleur. Lorsque l'électricité est disponible pendant la nuit, la meilleure solution est de monter une ampoule de 20 à 40 watts dans le compartiment de l'armoire où le microscope est conservé ; un petit nombre de trous près du fond de l'armoire et d'autres à l'autre extrémité, au sommet du compartiment, permettront la circulation de l'air. Dans ce cas, la housse anti-poussière n'est pas nécessaire. Comme alternative, en l'absence complète d'électricité, on peut recourir à un gel de silice ou à un autre agent dessiccateur. Toutefois, il faut disposer régulièrement d'une quantité importante de cet agent, même lorsqu'il est régulièrement régénéré par chauffage dans un four ou sur un poêlon. On en place une petite quantité au fond d'un container ouvert et l'on veille à ce que le volume à dessécher soit aussi petit que possible en maintenant le microscope (et la

silice) sous un couvercle bien fermé ou dans son coffret. Habituellement, la silice sera saturée après une seule nuit et il faudra en utiliser une nouvelle dose chaque jour.

Si les solutions de colorants sont préparées dans le CDT, quelques équipements essentiels seront nécessaires. Ceux-ci comportent des balances à plateaux ou une balance simple d'une sensibilité de 0,1 g. ainsi que des cylindres gradués. Il est préférable d'utiliser de l'eau distillée afin d'éviter la contamination des solutions de colorants par les mycobactéries environnementales. L'eau filtrée constitue un second choix et il sera nécessaire de veiller avec grand soin à ce que le filtre ne soit pas colonisé par des mycobactéries environnementales. L'eau désionisée n'est pas recommandée car les installations pour sa préparation sont elles aussi facilement colonisées.

Stocks de fournitures et de consommables

Lors de chaque visite, il faut contrôler la situation des stocks. Il est conseillé que les stocks de produits de laboratoire soient plus importants que ceux des médicaments car certains éléments sont difficiles à transporter et ont généralement une longue durée de conservation. Comme norme, on recommande une réserve de consommables de 6 mois en plus de fournitures courantes de 3 mois - quoique des stocks plus importants ne fassent pas du tout problème (comme par exemple, les crachoirs, les produits chimiques, le méthanol ou l'huile à immersion). Cependant, en ce qui concerne les lames, l'environnement peut être un facteur limitatif car elles doivent être conservées à sec. Les stocks de solutions de colorants prêts à l'emploi ne doivent pas être excessifs, c'est-à-dire ne pas couvrir plus de 12 mois de consommation, quel que soit le niveau. Les centres plus importants ont besoin de plus grands volumes de solutions de colorants et il peut être plus pratique de les leur fournir sous forme de produits chimiques, en vue d'une préparation sur place. Toutefois, avant de décider d'une telle politique, il faut s'assurer que les techniciens savent comment préparer un bon colorant. Cela comprend la connaissance de la façon de tester les nouveaux lots et la conservation d'un carnet où les résultats de ces tests sont notés. La décision dépendra aussi de la disponibilité de l'équipement nécessaire.

Les boîtes de conservation pour les lames sont fréquemment envoyées d'un endroit à l'autre, d'où des pertes ; les marqueurs de lames autres que les diamants s'usent ; il faudrait considérer ces deux éléments comme des consommables pour qu'ils soient livrés régulièrement. Les couvercles des boîtes de conservation des lames seront bien étanches pour prévenir la pénétration dans la boîte d'insectes qui détruiraient les frottis.

Enregistrement et transmission des résultats

L'enregistrement est une partie essentielle du travail dans n'importe quel laboratoire ; la plupart des erreurs de laboratoire proviennent d'erreurs d'enregistrement. Le simple fait de travailler avec soin et de manière systématique constitue un élément important pour prévenir de telles erreurs et constitue une exigence fondamentale pour tout technicien de laboratoire.

Le formulaire de demande d'analyse des crachats sera contrôlé avec soin pour s'assurer qu'il est correctement rempli. Chaque crachoir sera immédiatement étiqueté dès son arrivée pour assurer une identification du patient dépourvue d'ambiguïté. L'étiquette sera toujours placée sur le récipient lui-même et jamais uniquement sur le couvercle (Figure II.1). On peut utiliser des marqueurs résistants à l'eau, des pinceaux pour l'encre de Chine ou des étiquettes auto-adhésives. Le numéro attribué vient de la séquence au niveau du registre de laboratoire. A ce moment, l'identification complète du patient est inscrite dans le registre et le numéro indiqué clairement sur le formulaire de demande. Ensuite, pour permettre une identification claire de l'échantillon de crachats, les lames doivent être marquées au moyen d'un crayon pour les lames dépolies (ou d'un marqueur indélébile, ou d'un graveur-diamant ou un substitut lorsque l'on n'utilise pas de lames dépolies). L'emploi d'autres marqueurs est inadéquat car les indications s'effacent pendant la coloration. L'identification de la lame inclura le numéro de la ligne (série) ainsi que le numéro de la colonne (lame) du registre. Le numéro de code du centre n'est nécessaire que pour les lames sélectionnées pour un contrôle à un niveau supérieur et il peut être ajouté quand les lames sont sélectionnées pour le contrôle (Figure III.2). Il faut veiller à éviter d'étaler le frottis sur une mauvaise lame. Les résultats seront inscrits rapidement après l'examen dans le registre du laboratoire. Au cours de la supervision, on déterminera dans quelle mesure les résultats des séries examinées la veille ont bien été effectivement inscrits dans le registre. Si tout cela n'est pas fait régulièrement, il y a un risque important d'erreur d'identification pouvant entraîner le traitement ou non du bon patient ; cela peut parfois expliquer les grossières erreurs observées au cours des contrôles.

Le formulaire de demande doit indiquer l'adresse correcte du patient ainsi que le type d'examen (diagnostic ou suivi). Si ces données ne sont pas fournies par les cliniciens, les techniciens doivent les obtenir en interrogeant le patient. Cette information est essentielle pour retrouver les patients qui ne viennent pas chercher le résultat d'un examen diagnostique trouvé positif. D'autre part, la distinction entre diagnostic et suivi est également nécessaire à l'analyse plus approfondie des performances, comme cela sera décrit plus loin.

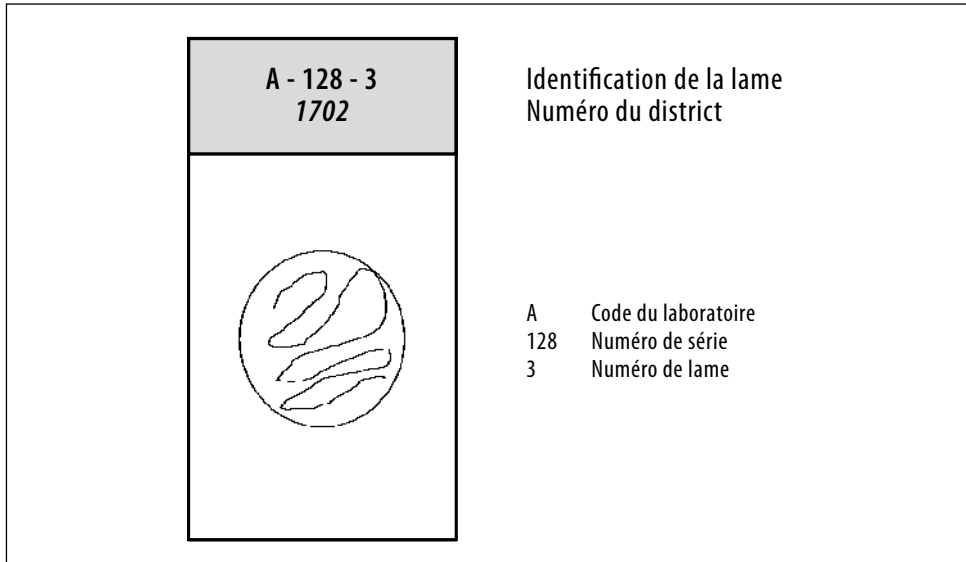


Figure III.2 Identification correcte d'une lame pour l'examen microscopique du frottis de crachat. Le « numéro de district » est écrit en italiques sur la lame car on ne doit l'inscrire que si la lame est sélectionnée pour l'évaluation externe de qualité.

Dans les centres importants, la transmission des résultats peut poser problème. Pour déceler dans quelle mesure ce problème existe, il est nécessaire de comparer les individus inscrits dans le registre du laboratoire avec ceux du registre des cas et ce, dans les deux sens. Tous les cas positifs identifiés par le laboratoire devraient avoir été enregistrés dans le registre des cas. Il existe dans le nouveau registre de laboratoire proposé dans ce guide (Annexe 2) une colonne spécifique pour informer où le suspect trouvé positif à l'examen des crachats est pris en charge pour son traitement : on inscrit soit le numéro du patient du registre des cas du même CDT que le laboratoire, soit le nom du CDT où le malade a été référé. D'autre part, le numéro du frottis de diagnostic du laboratoire sera inscrit dans le registre de la tuberculose du CDT ; les deux sont nécessaires pour obtenir un tableau complet. Tous les cas positifs doivent être mis sous traitement ; la proportion de cas non enregistrés pour traitement sera déterminée. Si les résultats sont reçus tardivement, le patient peut avoir cherché son traitement ailleurs ; plus grave, il peut retourner non traité dans la collectivité. Lorsque de tels problèmes sont identifiés, il faut s'assurer que l'information fournie au patient est bien faite. L'enregistrement systématique de tous les cas à bacilloscopie positive pour traitement peut aider à limiter ces déficiences ; ils seront comptés comme perdus de vue si le traitement n'a jamais été mis en route.

Les techniciens de laboratoire sont responsables de l'explication claire des procédures à donner au patient au moment de la demande du premier échantillon et l'encourageront à fournir tous les échantillons nécessaires. La mise en œuvre de cette politique est évaluée en calculant la proportion de suspects chez qui un seul échantillon a été enregistré pour diagnostic.

On recommande actuellement au moins deux frottis positifs pour classer un patient comme cas de tuberculose à bacilloscopie positive des crachats. La justification de cette règle est la prévention d'une erreur d'identification, plus susceptible de survenir dans un centre très actif. Cela devrait être rare en cas d'évaluation régulière de la qualité. Les résultats bactériologiques faussement positifs consécutifs à des interversions ou à des contaminations au laboratoire se rencontrent plus fréquemment lorsque la culture, technique plus complexe, est utilisée.

Le degré de variation dans la quantification d'une série de frottis de crachats avec au moins un résultat positif peut constituer un indicateur du soin porté à l'examen des séries. Lorsque les résultats d'un même malade ont souvent la même quantification, on peut supposer qu'un seul échantillon a été examiné et que son résultat a été recopié. Dans une étude menée dans quatre pays, les suspects ayant au moins une lame positive dans une série complète de trois lames ont constitué le dénominateur ; la fréquence d'une certaine variabilité a été remarquablement régulière, de l'ordre d'environ 60% dans trois des pays alors que dans le quatrième, la fréquence de la variabilité n'était que de 14%.

Performances

Pour contrôler la performance, on commence par observer l'ensemble du laboratoire ; on ne peut pas s'attendre à un travail fiable dans un laboratoire mal tenu, sale et/ou en désordre. On poursuit en faisant quelques statistiques simples (celles-ci devraient être faites régulièrement par les techniciens locaux eux-mêmes, dans le cadre du suivi interne).

Revue du registre de laboratoire

Le registre du laboratoire contient une masse d'informations et mérite d'être examiné de manière approfondie avec le technicien. La fréquence de positivité chez les suspects varie considérablement d'un pays à l'autre et dépend également du type de centre (par exemple centre de première ligne ou institut de référence). En gros, la prévalence peut se situer entre 5% (fréquemment observée en Amérique Latine) et 20% (fréquemment observée en Afrique sub-saharienne). Des proportions plus élevées sont fréquemment rencontrées dans les situations où existe un retard important

du patient et/ou du médecin ou encore celles où l'accès des services est difficile (distance, problèmes financiers). Occasionnellement, une proportion élevée de cas positifs parmi les suspects peut être la conséquence de résultats faussement positifs ou rarement de fautes professionnelles comme la « vente » de résultats positifs lorsqu'il existe un marché pour cette opération. Des proportions anormalement faibles peuvent se trouver dans des situations inverses, par exemple en cas de sélection trop large des suspects, ou d'une fréquence extrêmement élevée de toux chronique due à d'autres causes, ou encore en cas de nombre élevé de résultats faussement négatifs. Une stratégie de détection active des cas entraîne également une faible fréquence de positivité. Seulement de graves problèmes dans le laboratoire entraîneront une proportion de résultats négatifs clairement différente de la moyenne trouvée dans les laboratoires semblables de la même zone problèmes.

La proportion de résultats positifs (y compris les très faiblement positifs) dans tous les examens de suivi laisse moins de doute quant aux raisons de déviation par rapport à la norme. A la fréquence et au moment recommandés par l'Union et l'OMS, il doit y avoir parmi ces examens de suivi quelques cas (faiblement) positifs, souvent d'ailleurs des cadavres bacillaires. On peut s'attendre à ce qu'environ 10% de l'ensemble des examens de suivi soient positifs ou faiblement positifs dans les pays où les services de laboratoire bénéficient d'un contrôle de qualité. Quoique la proportion de positivité brute dans les examens de suivi puisse varier, particulièrement en fonction du degré moyen de positivité du cas au moment du diagnostic (qui peut être plus faible par exemple chez les patients séro-positifs pour le VIH), une absence totale de résultats positifs dans les cas de suivi n'est pas possible. Des fréquences très faibles, particulièrement lors de l'examen de suivi au deuxième mois (où l'on peut s'attendre à ce que quelques 15% de cas à bacilloscopie positive restent encore positifs), devraient faire suspecter un examen microscopique superficiel et/ou une défaillance de la coloration ou une faute professionnelle.

Parallèlement, la mesure de la fréquence des résultats faiblement positifs (rares positifs ou positifs à 1+) parmi tous les résultats positifs chez les suspects permet de mieux apprécier les types de problèmes existants. Le degré de positivité des frottis de suspects suit une distribution normale, un tiers environ des résultats étant faiblement positif dans un contexte sans VIH et lorsque les cas consultent relativement tard. La détection des résultats très positifs à 3+ ne constitue évidemment aucun problème mais la détection de résultats faiblement positifs exige un effort soutenu et un travail de haute qualité avec de bonnes solutions de colorants et une bonne

technique de coloration. Pour autant que la quantification soit bien comprise, un trop petit nombre de résultats faiblement positifs chez les suspects peut indiquer un examen microscopique superficiel ; cette suspicion est renforcée s'il n'y a pratiquement aucun résultat positif dans les examens de suivi. Une proportion élevée de frottis faiblement positifs chez les suspects peut parfois correspondre à la réalité, mais elle indique plus souvent un problème de coloration, confirmé par l'absence de bacilles dans les frottis de suivi. Plus rarement, de tels résultats seront des faux positifs dus à des niveaux élevés de contamination des solutions de colorants par des mycobactéries environnementales ou à une compétence insuffisante pour l'identification des BAAR.

Un examen approfondi du registre donne une idée de la plausibilité des résultats. Il est rare qu'une série de trois résultats chez les suspects ne contienne qu'un seul résultat positif ou très faiblement positif. Si c'est fréquent, cela peut indiquer un recueil d'échantillons de qualité médiocre, une identification erronée des lames, une technique de coloration déficiente, un manque de compétence dans la lecture ou encore une contamination d'une solution de colorant.

La qualité du travail au laboratoire se reflète également dans la cohérence des résultats au sein des séries de cas positifs. Au moins 80% des cas positifs consécutifs doivent être positifs lors du premier examen quand on utilise la stratégie de recueil « sur place-matin-sur place ». Une proportion plus faible suggère une lecture et/ou une coloration inadéquate ou peut indiquer une qualité médiocre des échantillons recueillis, tous facteurs qui affectent davantage les échantillons recueillis sur place (où la concentration bacillaire est plus faible) que ceux du matin.

Après que le registre ait fourni quelques indications sur ce à quoi on peut s'attendre, une expertise complémentaire sera davantage orientée vers les problèmes, par exemple une évaluation approfondie des solutions de colorant ou de la technique de coloration. Sinon, l'étape logique suivante consiste à faire l'examen macroscopique des frottis déjà préparés. Les frottis conservés pour contrôle seront examinés pour évaluer la qualité générale des frottis et de la coloration, deux facteurs interdépendants. Les éléments à contrôler comportent l'identification correcte de la lame et l'aspect du frottis ; la taille du frottis n'est importante que pour la quantification. Quoique l'on puisse permettre des variations de sa dimension lorsque le technicien comprend combien de champs sont présents dans une longueur, la standardisation est généralement préférable. Une longueur standard d'environ 20 mm est utile car elle correspond à 100 champs à l'huile d'immersion. En largeur, il faut éviter que l'étalement n'atteigne le

bord de la lame. On peut, dans une certaine mesure, estimer la proportion d'échantillons de faible qualité (salivaires) à partir de l'examen macroscopique du frottis : très mince ou à peine visible et contenant souvent de petites boursofflures. Le problème le plus fréquent, particulièrement pour les débutants, est la préparation de lames trop épaisses, dans leur ensemble ou en partie. Il devrait être possible de lire les caractères d'un journal à travers le frottis tenu à quelque distance au-dessus du journal. Un frottis qui apparaît rouge pourpre ou même noir signifie habituellement qu'il est trop épais et qu'il a été impossible de le décolorer correctement. Une autre raison est la crainte qu'ont les techniciens d'utiliser l'acide suffisamment longtemps ou à répétition. Ils devraient savoir qu'il est virtuellement impossible de décolorer les BAAR lorsqu'on n'utilise que des acides en solution aqueuse. Il n'est pas intéressant de viser à une coloration forte par le contre-colorant ; au contraire, les frottis devraient être d'un bleu léger. Dans les frottis épais et lorsque l'éclairage est faible, une contre-coloration trop forte peut cacher les BAAR, au point qu'ils ne puissent être décelés même dans des échantillons fortement positifs.

Contrôle du microscope

L'examen de lames au microscope permet au superviseur d'évaluer i) l'état du microscope, ii) la capacité globale du technicien du centre à identifier les BAAR et iii) la qualité de la coloration. Il faut toujours examiner des lames disponibles et utiliser un ou plusieurs frottis positifs provenant de préférence de la semaine même pour éviter une fausse impression due à l'atténuation possible de la coloration de la fuchsine dans les vieux frottis. Il peut être nécessaire de contrôler un bon nombre de lames faiblement positives récentes lorsque leur fréquence est anormalement élevée. Tout ceci doit être fait au moyen du (ou des) microscope(s) de routine.

Des problèmes comme une platine branlante ou bloquée peuvent être évidents, particulièrement lorsqu'on examine le frottis. S'il est difficile de maintenir la mise au point d'un frottis correctement fixé, cela peut provenir d'une crémaillère ou d'une platine branlante. La luminosité du champ sera évaluée, particulièrement s'il faut utiliser le miroir ; il y a lieu de conseiller au technicien de choisir l'endroit optimal pour l'examen microscopique. Si tout est noir ou lorsque l'on ne peut obtenir aucune vision absolument claire des BAAR avec une bonne lumière lorsque tous les éléments sont correctement ajustés, il faut examiner les lentilles et le tube binoculaire à la recherche de saletés ou de champignons. Il y a lieu d'enlever l'objectif 100x et les oculaires et d'aligner l'ouverture vide de l'objectif sur le champ éclairé. En regardant vers le bas au travers du tube, il est possible de contrôler les prismes au sein du tube pour y déceler la

présence de masses de champignons, de filaments ou d'autres saletés. Si tout est absolument propre, l'objectif et les oculaires sont examinés en les tenant inversés vers la lumière. Si rien n'apparaît, l'objectif est réinséré et un nouveau regard vers le bas dans le tube peut montrer plus nettement la présence de saletés. La saleté extérieure peut être nettoyée avec un tissu trempé dans le xylène ; suivi d'un séchage soigneux. Si les surfaces internes sont sales, c'est-à-dire couvertes de poussières ayant pénétré au travers de l'orifice non couvert d'un objectif ou en raison de la mauvaise qualité de l'huile d'immersion ou à cause du xylène qui a endommagé le ciment de la lentille, il faut confier le nettoyage à un atelier d'entretien des microscopes. Si des pièces de rechange sont disponibles, il faut utiliser un nouvel objectif pour permettre de continuer à utiliser le microscope. Si les lentilles sont griffées ou ébréchées, ou lorsque le ciment des lentilles est endommagé, la seule solution possible est leur remplacement.

Examen d'un frottis positif

Lorsque l'inspection du microscope ne décèle aucune défaillance, on évalue l'aspect des BAAR. On le fait non seulement pour s'assurer qu'il s'agit réellement de BAAR, mais aussi pour examiner dans quelle mesure ils ont une bonne et forte coloration rouge et sont aisément discernables sur l'arrière-plan. Il faut accepter comme de véritables BAAR tous les éléments ayant la morphologie et la couleur voulues, même si le superviseur est certain qu'il s'agit d'une espèce de *Mycobacterium* autre que *tuberculosis*. Pour obtenir un résultat optimal, la couleur rouge doit être suffisamment puissante pour ne pas être effacée trop facilement par le contre-colorant. Lorsque ce n'est pas le cas, le problème est dû à un colorant de carbol-fuchsine trop faible ou à un défaut dans la méthode de coloration : insuffisance du chauffage et/ou du temps de coloration - ce qui fait craindre des résultats faussement négatifs. Cet effet peut également être provoqué par une décoloration excessive à l'alcool mais non par les acides dilués dans l'eau. Les frottis positifs seront examinés pour chercher des cristaux de fuchsine qui peuvent résulter de l'insuffisance d'une filtration (récente) du colorant, de l'utilisation jusqu'à la dernière goutte de la totalité de la carbol-fuchsine du flacon ou du fait que les flacons de réactifs ne sont jamais nettoyés entre les remplissages.

Il n'est pas facile de confirmer les résultats de lames ne comportant que de très rares BAAR. Si leur fréquence semble trop élevée, ce qui peut suggérer leur confusion avec des artéfacts, il peut être nécessaire de les réexaminer lors d'une visite de supervision. Dans ce cas, il sera nécessaire de contrôler *plusieurs* frottis récents avec peu de bacilles pour surmonter leur faible reproductibilité ainsi que l'effet possible de l'atténuation de la coloration à la fuchsine.

Il n'est pas possible et dès lors pas recommandé de recourir au réexamen d'un grand nombre de lames négatives au cours d'une visite de supervision. Quoique le réexamen des lames négatives soit essentiel pour bien évaluer les performances, il nécessite un temps trop long car il doit porter sur un grand nombre de lames. Cela devra être fait lors d'un programme de contrôle systématique des lames périphériques de routine. Comme la visite de supervision permet de fournir une rétro-information sur le contrôle tout autant que de découvrir la cause des erreurs, la supervision et le contrôle sont complémentaires.

Constitution d'une collection représentative de lames

Lorsqu'un système d'évaluation de qualité par contrôle des lames est en place, sa fiabilité et sa performance doivent être vérifiées. La première exigence d'un tel système est la conservation de toutes les lames examinées pour le diagnostic et le suivi, de façon à pouvoir les retrouver aisément et réexaminer leurs résultats à l'aveugle. Ce n'est pas aussi simple qu'il y paraît car les techniciens peuvent être tentés de ne conserver que les « belles » lames positives. C'est néanmoins un élément critique et essentiel d'un échantillonnage représentatif.

La représentativité ne peut être assurée que par la conservation de toutes les lames. Dans les laboratoires où les prestations sont nombreuses, cela peut être difficile et, dans ce cas, on autorisera la conservation des lames correspondant à une partie de la période, par exemple une semaine par mois.

L'huile à immersion est éliminée en la laissant absorbée par un vieux journal ou du papier toilette ou quelque chose de similaire ; toutes les lames seront ensuite déposées dès que possible dans des boîtes destinées à leur conservation (pour les lames colorées au fluorochrome, un endroit sombre et sec est particulièrement important). Afin de faciliter un contrôle aveugle, les lames sont conservées dans l'ordre des nombres de série du registre de laboratoire quel que soit leur résultat. Les boîtes de lames sont utilisées l'une après l'autre jusqu'à ce qu'elles soient remplies ; les lames provenant de la première boîte sont ensuite éliminées de façon à faire de la place pour une collecte ininterrompue et continue. Après sélection des lames pour le contrôle, toutes les lames sont jetées.

Garantie de la validité du contrôle pour l'EEQ

Il faut s'assurer de la représentativité de l'échantillon de lames à relire puisque c'est d'elle que dépend la validité du contrôle. La sélection des lames à partir du registre de laboratoire permet de s'assurer automatiquement de

cette représentativité. Il suffit de choisir au hasard par exemple dix sujets examinés dans le registre de laboratoire, des positifs et des négatifs, des sujets examinés pour diagnostic et pour suivi. On demande au technicien de sélectionner les lames correspondantes dans les boîtes de conservation. Si l'on retrouve moins de neuf des dix lames, on mettra en doute le caractère exhaustif de la conservation des lames. Il faut contrôler les détails de l'étiquetage des lames et les comparer au registre de laboratoire afin de s'assurer de leur validité. La lame elle-même ne doit comporter aucune indication du résultat de l'examen. Toute déficience sur ces divers points indique très clairement que les résultats du contrôle pourraient ne pas être valables.

Contrôle aveugle des lames (de la périphérie vers le centre)

L'évaluation externe de qualité par l'examen d'un échantillon de frottis de routine provenant des centres périphériques à un niveau supérieur du service est la méthode de choix permettant l'évaluation et la motivation continues des centres périphériques. Quoique cela puisse paraître simple et évident, l'acceptation de quelques principes techniques s'impose si l'on veut fournir des résultats valables et interprétables. De plus, ce contrôle ne peut être exécuté de manière fiable et profitable que si le programme national de la tuberculose est déjà bien en place et prêt à investir les ressources nécessaires pour l'exécution de ce travail assez lourd. Dans les pays à prévalence intermédiaire ou faible, où le réseau microscopique est très décentralisé, la prévalence de positifs parmi les suspects est très basse et les coûts salariaux élevés : les ressources nécessaires pour l'application de cette stratégie sont souvent excessives et il faut utiliser une autre méthode. La logistique de l'envoi des lames de la périphérie vers un niveau plus central exige le fonctionnement correct d'un réseau de laboratoire et la collaboration entre les divers niveaux. C'est aux laboratoires de niveau intermédiaire de jouer le rôle principal puisque ce sont eux qui sont en relations directes et fréquentes avec les laboratoires périphériques.

Objectif du contrôle de l'EEQ

Le principal objectif du contrôle de l'EEQ est d'améliorer la qualité du travail en identifiant les centres dont les performances sont inacceptables. Il vient en complément des visites de supervision qui ne peuvent les déceler systématiquement ; il aide à comprendre les causes des erreurs les plus fréquentes et à y remédier. Les techniciens savent qu'ils seront contrôlés et aussi que le service central s'intéresse à leurs problèmes. Ces divers facteurs constituent un encouragement puissant pour ceux qui sont motivés.

Il n'est habituellement pas possible de corriger les diagnostics et la prise en charge des patients par l'EEQ ; ce n'est d'ailleurs pas l'objectif premier de cet exercice. Ce cycle de travail exige trop de temps pour être utile au patient individuel et le système est mis en place pour maintenir la qualité du travail. De plus, l'échantillon sélectionné ne représente qu'une petite fraction de tous les prélèvements examinés. Vu la petite taille des échantillons, l'évaluation individuelle des techniciens n'est pas non plus réalisable : les résultats à court terme ne sont pas toujours précis et doivent être interprétés avec précaution.

Vue d'ensemble du contrôle de l'EEQ

On collecte un échantillon représentatif de lames examinées en routine dans chacune des unités de microscopie pour relecture dans un laboratoire de niveau intermédiaire (premier contrôleur). La taille de cet échantillon est prédéterminée par le programme national de la tuberculose et le laboratoire national de référence, pour permettre que l'échantillon puisse être recueilli par n'importe quel superviseur. Le caractère aveugle de cette première lecture est assuré par le superviseur qui conserve la liste des résultats originaux (voir Annexe 5 le modèle recommandé du formulaire d'échantillonnage qui peut également être utilisé pour envoyer en routine la rétro-information concernant les résultats). Le superviseur compare les résultats originaux avec ceux de la relecture afin d'identifier les lames dont le résultat est discordant (positif/négatif ou graves différences de quantification). Seules les lames discordantes seront envoyées ultérieurement à un troisième lecteur, de préférence à un laboratoire de niveau plus élevé pour un autre examen (deuxième contrôleur). Ce dernier résultat est considéré comme le « gold standard » (même s'il n'est pas totalement dépourvu d'erreurs) pour les lames discordantes, ce qui permet d'identifier les erreurs et de les attribuer soit au centre de microscopie périphérique, soit au premier contrôleur. Le contrôle de l'ensemble des erreurs possibles demande une recoloration de toutes les lames avant la première relecture dans certaines circonstances ; par contre, la recoloration est toujours nécessaire lors de la deuxième relecture. La validité des contrôles doit être garantie : les premiers contrôleurs doivent faire en moyenne moins d'erreurs de faux négatifs que les unités de microscopie périphérique et le deuxième contrôleur ne doit laisser échapper que très rarement un frottis nettement positif. La rétro-information des résultats provisoires sera régulière, mais l'analyse finale n'est faite qu'après achèvement d'un cycle complet (un an). Toutes les unités avec au moins un résultat nettement faux positif ou un nombre de résultats faussement négatifs plus élevé que ce qui est acceptable pour la taille d'échantillon choisie sont considérées comme ayant échoué au test

de contrôle ; les problèmes peuvent être liés au microscope, aux solutions de colorant, à la technique de frottis ou de coloration, à la négligence lors de la lecture ou au manque de compétence du personnel. Toutefois, un échec au test de contrôle peut également être dû au hasard (échantillon de lames comportant une erreur bien que le niveau autorisé ne soit pas dépassé pour l'ensemble de la collecte) ou à une erreur administrative (dans la transcription des résultats). Il faut identifier les vrais problèmes et leur origine au cours d'une supervision réalisée par un professionnel du laboratoire ; les erreurs dues au hasard ne sont pas retrouvées dans les échantillons suivants. Des éléments qualitatifs tels que l'aspect des frottis et la coloration font partie également du domaine du contrôleur. Toutefois, comme ils sont fréquents même en l'absence d'erreur, il ne faudra leur porter une attention particulière qu'en cas d'erreur pour identifier son origine. Sinon, dans la feuille de routine de rétro-information, on ne donne qu'une appréciation brève de ces éléments pour l'ensemble de l'échantillon. Si on n'a pas recoloré, il faudra être très attentif à l'appréciation subjective de la couleur des BAAR.

Exigences techniques

On trouvera ailleurs le détail des exigences techniques et des pièges potentiels (voir bibliographie). Aussi simple que l'exercice puisse paraître, la difficulté technique du contrôle ne peut être sous-estimée. Une erreur majeure dans beaucoup de PNT a été d'envoyer un trop grand nombre de lames pour relecture dans le but d'atteindre une grande précision statistique. Cela entraîne une surcharge des contrôleurs, incapables de relire soigneusement les lames et parfois même recopiant simplement les résultats lorsqu'ils n'étaient pas cachés. Dans la plupart des situations, il ne sera pas possible d'arriver à une bonne précision tant statistique que technique et il faudra choisir la plus petite taille d'échantillon possible. On la choisira en utilisant le système Lot Quality Assurance Sampling (LQAS) basé sur les lames négatives (voir plus loin) ; les lames positives ou très faiblement positives seront automatiquement incluses dans l'échantillon identifié. Cet échantillonnage arbitraire de lames positives ou très faiblement positives suffit (sauf peut-être dans les plus petits CDT) à détecter les vrais problèmes de faux positifs car ils sont rares mais apparaissent habituellement de manière systématique et un petit nombre de positifs suffit. En même temps, la proportion quasi égale de positifs dans les échantillons des relecteurs contrôleurs et dans le travail de routine des CDT permet une comparaison directe des faux négatifs identifiés dans les échantillons destinés au contrôleur et à son/ses unité(s), afin de valider le contrôle. S'il y a doute, par exemple en raison d'un nombre légèrement trop élevé de faux positifs

dans un CDT, un échantillon spécial portant sur les frottis positifs ou très légèrement positifs peut être facilement prélevé pour confirmation.

Dans les unités très petites n'identifiant que quelques positifs chaque année, il faut ajouter toutes les lames positives ou très faiblement positives à l'échantillon aléatoire.

Un contrôle précis de toutes les sources possibles d'erreurs sérieuses exige au départ une recoloration de toutes les lames afin de détecter les déficiences majeures liées au processus de coloration puisque, sans recoloration, des BAAR peuvent être invisibles même pour les contrôleurs. Cette exigence est impérative lorsque le PNT ne peut assurer la fourniture de réactifs de haute qualité et une préparation correcte du colorant carbol-fuchsine ou lorsqu'une technique sub-optimale de coloration est utilisée (par exemple la coloration à froid). Dans ces conditions, l'atténuation complète de la couleur des BAAR faiblement colorés peut se produire si rapidement qu'il est impossible de reconnaître les faux négatifs et donc sous-estimer grossièrement ce problème. La même chose se produira dans les climats chauds et humides même pour des BAAR correctement colorés (Figure III. 3). Une combinaison de ces deux facteurs peut causer une atténuation de la couleur après une seule semaine. L'atténuation de la coloration peut également expliquer la suspicion d'un problème de faux positifs ; il est généralement recommandé de recolorer avant de déclarer une lame faussement positive, afin d'éviter une accusation erronée d'une déficience aussi grave. Toutefois, même cela ne garantit pas une détermination correcte du niveau de faux négatifs. De plus, la recoloration des seules lames discordantes rend impossible l'évaluation du travail des premiers contrôleurs qui peuvent avoir laissé échapper beaucoup de vrais positifs (coloration atténuée).

Dans le cas où la recoloration des séries discordantes fait systématiquement réapparaître des positifs (confirmant ainsi le résultat de la périphérie et expliquant beaucoup de faux négatifs chez le premier contrôleur), l'exercice de contrôle devrait être répété après recoloration même pour les lames dont les résultats sont concordants, afin d'avoir une bonne chance de détecter les faux négatifs de la périphérie.

Limitations de la technique

Même le deuxième contrôleur laissera échapper quelques frottis comportant très peu de BAAR ou des bacilles irrégulièrement dispersés. Ces rares « faux positifs faibles » peuvent être acceptés comme une limitation inhérente à la méthode pour autant qu'ils surviennent rarement et de ma-

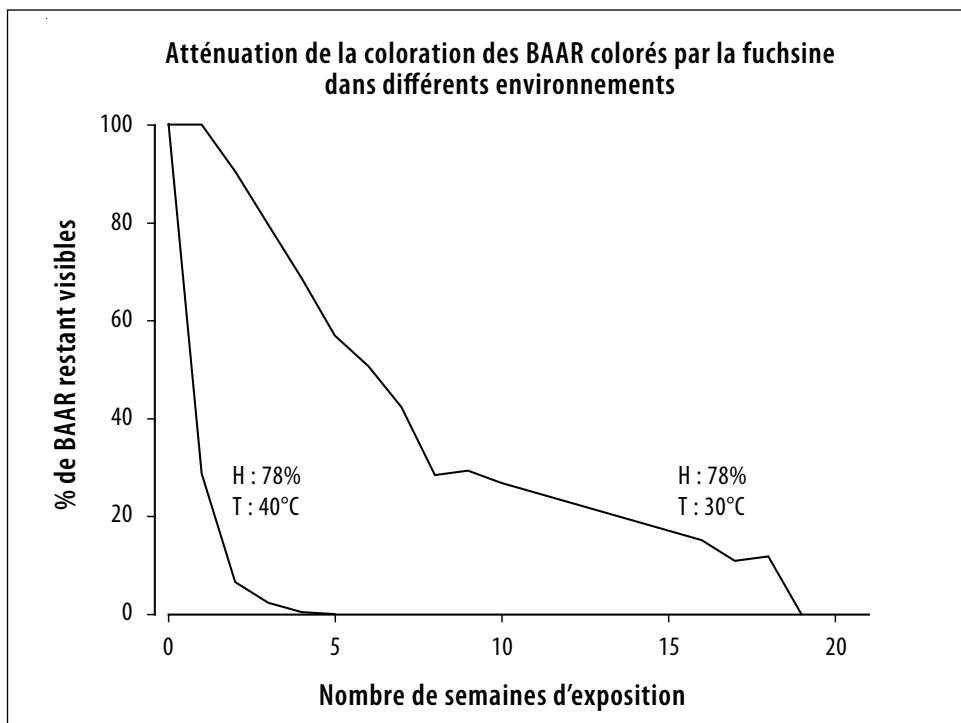


Figure III.3 Atténuation de la coloration des BAAR colorés par la fuchsine dans différents environnements de température (T) et d'humidité (H). Données aimablement fournies par le Projet Bangladesh de la Fondation Damien.

nière similaire chez le premier contrôleur et dans les unités de microscopie contrôlées. D'autre part, les lames dont les résultats sont concordants entre le premier et le deuxième niveau ne seront pas soumises à un réexamen quoiqu'on puisse également s'attendre à des erreurs même en présence de résultats concordants. Il faut les accepter puisque le premier contrôleur ne sert que de comparaison, montrant ce qui peut être obtenu dans les conditions optimales et en respectant les directives techniques. Pour cette raison, le premier contrôleur ne doit pas essayer de détecter le plus d'erreurs possible en lisant un nombre de champs plus important que celui que les CDT sont sensés lire ; à l'opposé, le deuxième contrôleur doit confirmer autant de résultats positifs que possible. Il n'existe pas d'autres alternatives pratiques possibles pour l'établissement d'un « gold standard » et celui qui est proposé est adéquat pour autant que soit garantie une performance optimale (comportant pourtant des erreurs) des contrôleurs. Cela exige une validation régulière des contrôles par comparaison avec des niveaux d'erreur tels que définis plus haut et le renvoi des lames pour lesquelles des erreurs sérieuses ont été trouvées vers le technicien qui a commis l'erreur.

Celui-ci devrait avoir l'occasion de montrer à un superviseur les BAAR qui ont éventuellement échappé au deuxième contrôleur, afin de valider de manière continue la valeur du « gold standard ».

La taille de l'échantillon calculée pour les faux négatifs vise à s'assurer que les laboratoires où l'on ne trouve pas plus de faux négatifs dans l'échantillon relu que ce qui est accepté, travaillent à un niveau de sensibilité égal ou supérieur au minimum requis. Toutefois, cela ne signifie pas automatiquement que les CDT dans lesquels on observe un trop grand nombre de faux négatifs n'atteignent pas ce niveau minimal : cela signifie seulement que leur bonne performance n'est pas statistiquement garantie. L'interprétation tiendra compte du nombre et de la gravité des erreurs ; une visite de supervision sera organisée, prioritairement dans les unités de microscopie où l'existence de vrais problèmes semble la plus vraisemblable. Pour les autres CDT ayant échoué au test de contrôle mais jugés non prioritaires, la visite peut attendre jusqu'à ce que des échantillons ultérieurs aient confirmé la présence d'erreurs inacceptables. Dans un programme fonctionnant raisonnablement bien, cela signifie que la grande majorité des CDT ne nécessite pas de supervision urgente par le staff de laboratoire.

Problèmes concernant l'échantillonnage

Le schéma d'échantillonnage LQAS défini par l'OMS a été retenu car il répond à la seule question importante au cours de l'étape de screening : dans quelle mesure est-on sûr que la sensibilité (niveau de faux négatifs) est acceptable en retenant une taille d'échantillon la plus petite possible afin de permettre une exécution correcte des relectures. Ce schéma est appliqué uniquement aux négatifs, car ce n'est que dans ce groupe que la technique comporte des erreurs intrinsèques. Comme il apparaît au Tableau III.3, tout lecteur, quelle que soit sa qualité, laissera inévitablement échapper de temps en temps un frottis faiblement positif. Cela entraîne un certain niveau de discordances entre deux lecteurs contrôlant les mêmes lames, même lorsqu'ils travaillent à un niveau également élevé de sensibilité et de spécificité. On doit donc disposer d'un système statistique pour différencier cette « variation normale » d'un niveau plus élevé de faux négatifs qui pourraient être dus à des problèmes sous-jacents.

Comme le système est assez difficile à comprendre, la détermination de la taille de l'échantillon ne peut pas être confiée aux personnes travaillant sur le terrain. C'est au niveau national de rassembler l'information requise, définir la taille de l'échantillon et dire aux travailleurs sur le terrain combien de lames seront recueillies par mois ou par trimestre.

L'information à fournir par chaque unité de microscopie comprend le nombre de frottis négatifs et positifs lus chaque année. Le taux de prévalence des résultats positifs est alors calculé puisque ce facteur est directement lié à la proportion des faux négatifs autorisés pour une sensibilité donnée. Alors que la sensibilité-cible minimale est choisie arbitrairement par le PNT, le niveau autorisé de faux négatifs correspondant à ce niveau minimum de sensibilité est directement proportionnel à la prévalence des positifs. Cela signifie entre autres choses, que les performances des unités de microscopie et celles des districts ou des programmes nationaux de la tuberculose ne sont directement comparables que si le taux de prévalence des positifs est le même. Par exemple, dans un pays où les laboratoires signalent en moyenne 25% de positifs parmi les suspects, la fréquence des faux négatifs pour la même sensibilité sera plus de six fois plus importante que dans un pays où 5% seulement de positifs sont décelés dans les laboratoires. Les tables de taille de l'échantillon LQAS fournies dans la référence ne montrent pas la fréquence admise de faux négatifs ; celle-ci a été remplacée par la prévalence des positifs pour une sensibilité-cible donnée. Il est recommandé de simplifier le travail sur le terrain en choisissant une seule taille d'échantillon adaptée aux moyennes de ces paramètres (prévalence du turn-over de positifs et de négatifs) pour autant que leur variation dans la région ou le pays ne soit pas extrêmement élevée.

Il est préférable de choisir une cible de sensibilité minimale modeste comme 75% ou 80%. En fait, avec une sensibilité-cible de 75%, on a la garantie que les CDT dont les performances sont inférieures à ce niveau échoueront presque toujours au test, mais que certains CDT atteignant une sensibilité légèrement supérieure, c'est-à-dire entre 80% et 85%, échoueront également. Ceux dont les performances ne sont pas bonnes et qui n'échouent pas la première année échoueront probablement la deuxième, de sorte que le fait d'opter pour une sensibilité-cible relativement faible imposera de se focaliser sur certains centres exigeant d'urgence une attention. Le nombre acceptable recommandé de faux négatifs dans l'échantillon devrait être égal à zéro. Cela ne signifie pas que dans un travail de routine on ne puisse autoriser aucun faux négatif, mais simplement que la taille de l'échantillon doit être réduite au point qu'il y ait peu de chances que de rares erreurs de faux négatifs soient détectées. Si l'on opte pour un nombre acceptable plus élevé (par exemple accorder un seul faux négatif), la taille de l'échantillon nécessaire sera presque doublée. La probabilité de découverte par le simple fait du hasard de ces rares résultats faussement négatifs augmente elle aussi considérablement, sans apporter beaucoup de précision statistique supplémentaire, alors que l'exécution techniquement correcte des contrôles en souffre certainement. Les programmes natio-

Tableau III.3 Exemple d'une comparaison de résultats obtenus par différents techniciens montrant que les différences les plus importantes sont obtenues pour les frottis paucibacillaires. Cet exemple illustre clairement les limitations inhérentes à l'examen microscopique des frottis de crachats

A partir de : Toman K. Dépistage et chimiothérapie de la tuberculose. Questions et réponses. Organisation Mondiale de la Santé, Masson, Genève, 1980

Résultat d'un technicien	Résultat de l'ensemble des trois autres techniciens					Total
	Nég	+/-	1+	2+	3+	
Négatif	233	25	8	2	0	268
+/-	24	5	1	7	4	41
1+	8	2	11	18	4	43
2+	2	8	16	39	50	115
3+	0	4	4	49	120	177
Total	267	44	40	178	178	644

naux de tuberculose tendent à opter pour des tailles d'échantillon de loin trop élevées surchargeant ainsi les contrôleurs avec comme conséquence des résultats non valables. Dans les contextes à haute prévalence, un échantillon total annuel de 40 à 60 lames par unité de microscopie suffit virtuellement toujours à détecter les vrais problèmes.

Seuil d'intervention

Les erreurs possibles dans la lecture des lames sont résumées au Tableau III.4. Les résultats « faux positifs élevés » et « faux négatifs élevés » sont des erreurs graves qui modifient fondamentalement la décision de prise en charge du patient et montrent un problème sérieux au laboratoire. Le contrôle consiste à détecter une proportion inacceptable de « faux négatifs élevés » et de s'assurer qu'il n'y a pas de « faux positifs élevés ». Les « faux positifs élevés » sont très rares si les connaissances de base sont là et le microscope correct. De telles erreurs ne sont pas acceptables et chacune d'entre elles doit faire l'objet d'une investigation. Si elles surviennent occasionnellement, elles sont souvent dues à des erreurs administratives.

Comme décrit précédemment, pour les faux négatifs, on teste l'hypothèse que le nombre total de résultats faussement négatifs n'est pas plus élevé que le niveau critique correspondant à la sensibilité minimale choisie. Dans les

Tableau III.4 Tabulation croisée et classification des erreurs détectées au contrôle de qualité lors du réexamen des lames provenant d'un laboratoire périphérique par un laboratoire de niveau supérieur

Laboratoire périphérique	Résultat du contrôle de niveau supérieur				
	Négatif	1-9/100	1+	2+	3+
Négatif	Correct	FNF	FNE	FNE	FNE
1-9 / 100	FPF	correct	correct	EQ	EQ
1+	FPE	correct	correct	correct	EQ
2+	FPE	EQ	correct	correct	correct
3+	FPE	EQ	EQ	correct	correct
Correct : Pas d'erreur, y compris pas d'erreur de quantification EQ : Erreur de quantification, erreur mineure mais qui peut indiquer des problèmes importants FNF : Faux négatif faible, erreur légère, attendue à une faible fréquence FPF : Faux positif faible, erreur légère, attendue à une faible fréquence FNE : Faux négatif élevé, erreur grave, une lame nettement positive non identifiée FPE : Faux positif élevé, erreur grave, classement erroné comme cas positif d'un sujet qui ne l'est pas					

centres où les erreurs sont nombreuses, la fréquence de faux négatifs peut être inacceptable et encore plus si on compte ensemble les « faux négatifs élevés » et les « faux négatifs faibles ». En l'absence d'erreurs graves, les « faux positifs faibles » et « faux négatifs faibles » sont considérés des erreurs bénignes car on les rencontre même en l'absence de problèmes majeurs au laboratoire. Les « faux positifs faibles » sont dus le plus souvent à la mauvaise reproductibilité de ce type de résultat : les contrôleurs ne parviennent habituellement pas à trouver de rares BAAR qui avaient été identifiés par hasard dans le CDT. Les « faux négatifs faibles » sont souvent décelés en raison d'une surévaluation liée à la méthode.

Les « erreurs de quantification » en tant que telles sont d'importance mineure puisqu'elles n'ont pas d'influence sur la prise de décision pour les soins du patient. Toutefois, elles aident à identifier des problèmes concernant les solutions de colorant et la coloration. Pour autant que la recoloration de toutes les lames ait été faite préalablement à la relecture, une mauvaise coloration de l'unité de microscopie se manifestera sous forme d'un décalage systématique vers des valeurs trop basses. A l'inverse, sans recoloration, l'atténuation de coloration des positifs est suggérée par la (fausse) découverte d'un décalage vers une quantification trop élevée et en plus, par la découverte de faux positifs.

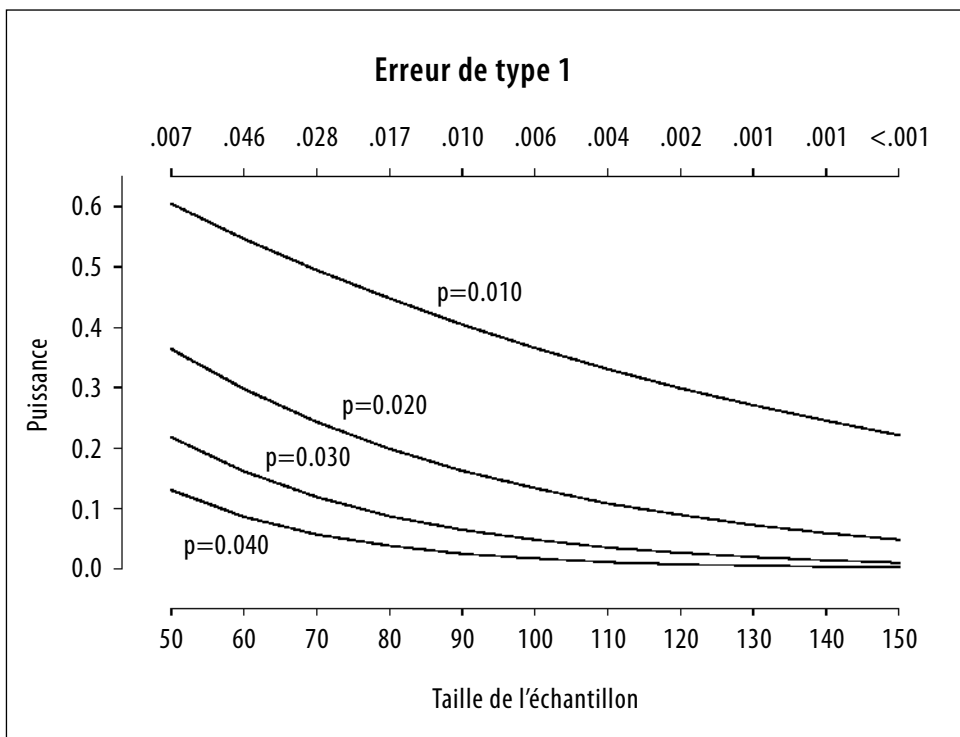


Figure III.4 Echantillonnage pour les lames négatives. Taille de l'échantillon requise pour être certain à 96% que si on ne trouve pas d'erreur, la fréquence réelle des erreurs ne dépasse pas 5%. Données fournies aimablement par le Dr Beat Neuenschwander.

Exemples d'observations

Un échantillon dont les résultats sont absurdes (par exemple un grand nombre de « faux positifs élevés » et/ou de « faux négatifs élevés ») est à attribuer à un technicien ignorant complètement l'aspect des BAAR ou à un microscope hors service (sérieusement abîmé, contaminé par des champignons ou mal éclairé) ou à l'absence complète d'examen des lames.

Un résultat faux positif élevé unique sera fréquemment une erreur administrative et peut être toléré. Lorsque plus d'une erreur de ce type survient, les procédures administratives et d'identification sont évidemment médiocres, ce qui ne peut pas être accepté.

On peut ignorer un très petit nombre de résultats « faux positifs faibles », car leurs causes potentielles sont le plus souvent dues aux limitations du système de relecture lui-même, comme exposé plus haut. En général, ils surviendront à des niveaux comparables à ceux observés dans d'autres centres ainsi que chez les premiers contrôleurs.

Le fait de trouver régulièrement un « faux positif élevé » avec quelques « faux positifs faibles » peut signifier que le technicien n'est pas totalement au courant de la façon de reconnaître les BAAR. Une autre explication possible est la contamination de solutions par des BAAR environnementaux qui n'ont pas été fixés et peuvent avoir été éliminés lors du lavage précédant la lecture de contrôle.

L'observation de « faux négatifs élevés » couplés avec un grand nombre de « faux négatifs faibles » est souvent due à une mauvaise qualité de la solution du colorant carbol-fuchsine ou à une mauvaise technique de coloration (pourvu que la recoloration ait été pratiquée sans quoi, ce problème ne peut être suggéré que par la découverte de BAAR faiblement colorés sur les frottis positifs). Une autre possibilité est l'absence de soin dans la lecture, jusqu'au point de ne pas du tout examiner les échantillons un jour de surcharge. Une fréquence très élevée de « faux négatifs faibles » et de quelques frottis positifs 1+ classés comme faussement négatifs est observée parfois lorsque les frottis sont contaminés par l'eau du robinet dans les centres de contrôle (ces BAAR ne sont décelés qu'après recoloration).

De rares cas faussement négatifs et principalement « faux négatifs faibles » sont habituellement attribuables à un examen microscopique superficiel qui peut être dû à une surcharge de travail. Sinon, il peut s'agir d'un microscope en mauvais état, d'un éclairage insuffisant ou d'une mauvaise qualité du frottis.

Analyse et rapport des résultats de contrôle

On trouvera en Annexe 6 un modèle de rapport des résultats de contrôle destiné au niveau provincial ou national. Il récapitule le nombre de lames contrôlées par laboratoire et les diverses erreurs décelées, ce qui permet une analyse de la couverture du contrôle ainsi que celle de la performance moyenne, du nombre et de l'identité des laboratoires échouant au dépistage. De plus, la performance du ou des premier(s) contrôleur(s) apparaît également puisqu'une comparaison de leurs résultats faussement négatifs avec ceux provenant de centres périphériques permet une évaluation de la qualité des contrôles.

Si on utilise une taille uniforme d'échantillon et que le nombre total de lames examinées en routine est connu, une analyse plus objective devient possible. La conversion du nombre de faux négatifs en sensibilité relative pour chaque centre permet une identification plus précise des laboratoires dont les performances pourraient ne pas être satisfaisantes.

Vérification de la qualité de la classification bactériologique des patients enregistrés

Les méthodes d'EEQ de l'examen microscopique des frottis de crachats décrites jusqu'ici s'adressent uniquement à la qualité du travail du laboratoire. Elles ne parviennent pas à donner une réponse à une question-clé : quelle est la précision du classement des patients enregistrés et soumis à une chimiothérapie antituberculeuse ?

L'approche impliquant le laboratoire dans l'évaluation globale de la qualité de la classification des patients repose sur le registre des cas de tuberculose. Cette procédure est plus complexe et non réalisable en routine tant que le contrôle basé sur le registre du laboratoire n'a pas été suffisamment rationalisé. Des enquêtes périodiques pourraient alors être menées en utilisant cette procédure.

En premier lieu, il est nécessaire que le laboratoire étiquette correctement toutes les lames (Figure III.2) et les conserve selon le système déjà décrit. Lorsqu'il transmet les résultats d'un examen, le laboratoire veillera à indiquer le code d'identification du laboratoire, le numéro de série du laboratoire ainsi que le numéro de la lame (par exemple, A-128-2).

Pour chaque cas nouvellement enregistré, la personne responsable de l'enregistrement des patients dans le registre des cas de tuberculose s'assurera que, en plus du résultat, le code du laboratoire et le numéro de série soient également inscrits dans la colonne appropriée (pour le registre des cas de tuberculose proposé, voir « Guide de la tuberculose pour les pays à faibles revenus »).

Aucun patient ne devrait être enregistré sans qu'un échantillon de crachat ait été examiné ; cela concerne les patients ayant une tuberculose extrapulmonaire et chez qui on vise à exclure une tuberculose concomitante à bacilloscopie positive.

Ce système, quoique souhaitable du point de vue de la programmation, ne s'est pas encore avéré réalisable sur le terrain et ne sera donc pas exposé plus en de détails.

3. Amélioration de la qualité (AQ)

L'EEQ et le contrôle de qualité ne se contenteront pas d'identifier les erreurs ou les faiblesses des services de laboratoire, des interventions correctrices doivent être menées pour les éliminer définitivement. Cela implique un suivi continu des performances par l'EEQ, un programme de contrôle de qualité ainsi qu'un programme de supervision directe. De plus, il ne

faut pas considérer le fonctionnement du laboratoire isolément : les informations provenant des activités et des résultats des laboratoires aident à améliorer les performances globales du programme de tuberculose.

Il est important que chaque visite de supervision dans un laboratoire périphérique cherche également à renforcer les liens et la collaboration entre le laboratoire et le service de prise en charge des patients. Cela implique que les spécialistes du laboratoire connaissent la politique du programme national et, à l'inverse, que les spécialistes de la prise en charge du programme s'intéressent fortement au travail du laboratoire.

Si le suivi montre un mauvais niveau de concordance des résultats des examens microscopiques des frottis, une intervention correctrice pourrait être le recyclage du personnel sur les aspects techniques de l'examen microscopique des frottis, si cette technique semble être en cause ; dans d'autres cas, il faut remplacer le microscope ou les solutions de colorant. Si une supervision directe montre des déficiences sérieuses dans l'enregistrement des données du laboratoire, une nouvelle formation du personnel sur les aspects administratifs des services de diagnostic est nécessaire.

Si, contrairement aux trois examens souvent recommandés pour le dépistage, on constate qu'un seul frottis est pratiqué dans une proportion importante de cas, l'intervention correctrice devrait inclure une discussion avec les soignants qui voient les patients atteints de symptômes respiratoires.

Quoique les exemples ci-dessus ne soient pas exhaustifs, ils montrent à quel point un système de suivi permanent des services de laboratoire peut aider à une amélioration continue de la qualité des programmes nationaux de lutte contre la tuberculose.

En résumé, l'assurance de qualité comportant les activités d'évaluation externe de qualité doit être progressivement mise en œuvre, puis maintenue. Dans une première étape, on peut choisir une approche du centre vers la périphérie, pour identifier les laboratoires dont la connaissance est insuffisante ou dont l'équipement est de mauvaise qualité. Ensuite, la méthode standard d'EEQ (périphérie vers le centre) sera utilisée pour identifier les performances insuffisantes et d'autres problèmes. Il est recommandé de suivre dans le temps la proportion des cas décelés parmi les suspects. Enfin, des enquêtes périodiques pour contrôler la qualité de la classification bactériologique des patients enregistrés pourront être menées.

Bibliographie

1. Allen J L. A modified Ziehl-Neelsen stain for mycobacteria. *Med Lab Sci* 1992; 49: 99-102.
2. Aziz M A, Ba F, Becx-Bleumink M, Bretzel G, Humes R, Iademarco M F, et al. External quality assessment for AFB smear microscopy. Ridderhof J, Humes R, Boulahbal F, ed. Washington, DC, USA: Association of Public Health Laboratories, 2002.
3. Buzingo T, Sanders M, Masabo J P, Nyandwi S, Van Deun A. Systematic restaining of sputum smears for quality control is useful in Burundi. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7: 439-444.
4. Enarson D A, Rieder H L, Arnadottir T, Trébucq A. Management of tuberculosis. A guide for low income countries. 5th ed. Paris, France: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2000.
5. Lwanga S K, Lemeshow S. Sample size determination in health studies. A practical manual. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1991; 1-80.
6. Toman K. Toman's tuberculosis. Case detection, treatment, and monitoring. Questions and answers. Frieden T R, ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2004.
7. Petersen K F. Methods for internal quality control in the mycobacteriology laboratory. *Zbl Bakt I Abt Orig* 1983; A 255: 503-510.
8. Urbanczik R. Present position of microscopy and of culture in diagnostic mycobacteriology. *Zbl Bakt Hyg A* 1985; 260: 81-87.

CHAPITRE IV

Surveillance de la résistance aux médicaments antituberculeux

Ce chapitre comprend quatre parties :

- A. Objectifs du système de surveillance et rôle de la culture : considérations générales sur la culture et les objectifs du système de surveillance ;
- B. Considérations générales sur les problèmes spécifiques du laboratoire : recommandations pour les aspects pratiques de l'exécution de la surveillance de la résistance aux médicaments ;
- C. Procédures techniques spécifiques pour la surveillance de la résistance aux médicaments : échantillonnage et mise en œuvre des procédures ;
- D. Considérations éthiques sur la surveillance de la résistance aux médicaments.

A. Objectifs du système de surveillance et rôle de la culture

1. Objectifs de la surveillance

La surveillance de la résistance aux médicaments fournit i) des informations sur la sensibilité des souches en circulation et ii) une mesure objective de la qualité du programme. La prévalence de la résistance parmi les patients qui n'ont jamais été traités auparavant quantifie l'étendue des cas secondaires dus à la transmission de bacilles déjà résistants aux médicaments. La résistance aux médicaments parmi les patients qui ont déjà été traités antérieurement est une mesure cumulative des erreurs de mise en œuvre du programme. L'objectif de la surveillance de la résistance aux médicaments est de quantifier ces deux indicateurs d'une manière aussi peu biaisée que possible.

Le succès de l'exécution de la surveillance de la résistance aux médicaments dépend de trois facteurs cruciaux : une détermination précise des anamnèses de traitement antérieur (avec un minimum d'erreurs de classement), un isolement réussi du complexe *M. tuberculosis* provenant des échantillons (avec une faible proportion de contaminations ou d'échecs des cultures) et une exécution efficace du test de sensibilité aux médicaments (avec une reproductibilité et une validité acceptables).

Pour la surveillance de la résistance aux médicaments, les patients sont classés comme appartenant à une des deux catégories suivantes : ceux qui ont reçu un traitement antérieur pendant une durée égale ou supérieure à un mois (déjà traités) et ceux qui n'ont jamais reçu un traitement antérieur pendant une durée égale ou supérieure à un mois (jamais traités). Cette distinction a d'importantes conséquences pratiques pour la prise en charge du patient car le traitement recommandé pour ces deux groupes de patients est différent. En conséquence, la surveillance de la résistance doit fournir des indications quantitatives dans ces deux différents groupes.

Seules les souches provenant de patients atteints d'une tuberculose à bacilloscopie positive des frottis de crachats sont éligibles lors de l'évaluation de la surveillance de la sensibilité aux médicaments. Plusieurs raisons militent pour restreindre la surveillance de la résistance à ce type de cas. D'abord, la connaissance des types de sensibilité des cas à bacilloscopie positive reflète directement le type de souches qui circulent dans la collectivité, car les patients autres que ceux atteints d'une maladie à bacilloscopie positive transmettent les bacilles tuberculeux à un bien moindre degré. Deuxièmement, les cas à bacilloscopie positive peuvent être identifiés rapidement dans les laboratoires périphériques, on peut obtenir des échantillons complémentaires et les traiter immédiatement après le diagnostic en étant certain que les échantillons proviennent d'un cas avéré de tuberculose. Troisièmement, le nombre de bacilles des cas à bacilloscopie positive est suffisamment élevé pour tolérer une certaine perte de viabilité au cours du transport ce qui augmente les chances de succès de la culture.

Les patients atteints d'une tuberculose récemment découverte seront interviewés avec soin pour déterminer dans quelle mesure ils ont reçu ou non un traitement antérieur pour tuberculose. Une attention insuffisante lors de l'interview du patient entraîne des erreurs de classement et l'interprétation des résultats est faussée (biaisée). Il y a toujours des patients qui ne parlent pas d'un traitement antérieur, soit parce qu'ils n'en sont pas conscients soit pour d'autres raisons ; l'interview du patient vise à minimiser cette erreur de classement.

La résistance observée chez les patients *déjà traités* existait, dans une large mesure, avant ce traitement et reflète dans une moindre mesure un traitement inadéquat (véritable *résistance acquise aux médicaments*), à condition que le PNT fonctionne correctement. La résistance chez les patients *jamais traités* antérieurement (*résistance primaire aux médicaments*) reflète l'étendue de la transmission des porteurs de souches résistantes à d'autres membres de la collectivité (cas secondaires de résistance). Si l'on étudie ensemble un échantillon représentatif de ceux qui ont et n'ont

pas été traités antérieurement (résistance combinée aux médicaments) on prend également en compte les proportions relatives des deux groupes et ces données indiquent l'importance de la résistance aux médicaments dans la collectivité étudiée. La fréquence de la résistance aux médicaments, à la fois chez ceux qui ont et n'ont pas eu de traitement antérieur, peut dès lors être utilisée pour évaluer la qualité du programme.

La surveillance de la résistance aux médicaments devrait constituer une activité continue du programme national. Pour des raisons épidémiologiques, il suffit de répéter les enquêtes à des intervalles de cinq ans pour obtenir des tendances précises. Les coûts des enquêtes répétitives sont plus faibles que ceux d'une surveillance continue, mais cela doit être réfléchi en tenant compte des problèmes provenant de l'interruption de routines établies. La rotation du personnel et la nécessité de recyclage sont des aspects négatifs liés aux enquêtes périodiques. La complexité de l'organisation d'une enquête est considérable et, lorsque c'est possible, il faut préférer une surveillance continue à des enquêtes périodiques. Lorsque les ressources le permettent, le maintien en fonction d'un petit nombre de centres entre les enquêtes répétées aide à réduire les coûts et les problèmes d'interruption. L'adjonction d'un nombre plus grand de grappes après chaque enquête est un bon moyen d'accroître les capacités du laboratoire.

L'objectif principal est de suivre les tendances de la résistance aux médicaments antituberculeux plutôt que d'évaluer son niveau à un moment donné.

La monorésistance est définie comme la résistance à un seul médicament ; *la polyrésistance* correspond à la résistance à deux médicaments ou plus, quels qu'ils soient. La résistance à la fois à l'isoniazide et à la rifampicine a un intérêt particulier car sa haute prévalence pourrait rendre inefficaces les régimes contenant la rifampicine. Parmi les souches polyrésistantes, le sous-groupe comportant une résistance à la fois à l'isoniazide et à la rifampicine est défini comme *multirésistant*.

2. Culture pour la surveillance de la résistance aux médicaments

Pour identifier les sujets atteints de tuberculose pulmonaire, la culture des échantillons pour isolement de *M. tuberculosis* est plus sensible que la bacilloscopie : pour avoir 50% de chances de déceler des BAAR lors de la bacilloscopie, il faut au moins 1.000 bacilles pour 1 ml de crachat, alors qu'une technique de culture de grande qualité exécutée avec soin permet de déceler 10 à 100 bacilles cultivables par ml de crachats.

Pour le diagnostic, cet accroissement de sensibilité par rapport à la microscopie est un élément critique pour définir le rôle des cultures dans la prise en charge des cas : si le gain marginal dans la discrimination entre patients qui ont et qui n'ont pas besoin de traitement est modeste, la culture ne peut pas être considérée comme efficiente. A l'opposé, pour ce qui est de la surveillance de la résistance aux médicaments, seuls les échantillons multibacillaires provenant de cas à bacilloscopie positive connus sont utilisés, et dès lors les exigences de sensibilité du test sont beaucoup moins importantes.

Dans les pages suivantes, on s'intéressera au rôle de la culture et du test de sensibilité pour la surveillance de la résistance aux médicaments. L'intérêt de la culture pour accroître la sensibilité du diagnostic n'est pas discuté dans ce texte ; il revient à d'autres d'aborder les problèmes complexes que cela pose. Cependant, une promotion indiscriminée de la culture pour accroître la détection de la tuberculose pose problème ; un tel schéma a la plus grande chance d'échouer lorsque les exigences de qualité d'infrastructure générale et de personnel compétent ne sont pas satisfaites car il est impossible de mettre en œuvre ou de maintenir un service de qualité ayant une large couverture géographique. Même si ces exigences de base étaient présentes, l'espoir que les cultures aient un rendement similaire à celui observé dans les pays industrialisés n'est pas certain en raison des caractéristiques différentes des patients tuberculeux entre les pays à revenus élevés et ceux à faibles revenus. Dans ces derniers, les patients tuberculeux ne se présentent habituellement pas à un stade précoce de maladie, de sorte que lorsque ces deux techniques sont exécutées correctement, seulement une fraction minime des patients tuberculeux sont frottis-négatifs mais culture-positive.

Retrouver ces patients est souvent impossible à cause des délais nécessaires à l'obtention d'un diagnostic définitif ; même les techniques rapides de culture (qui exigent au moins deux à trois semaines pour obtenir un résultat chez les patients à bacilloscopie négative des frottis de crachats) sont trop lentes. De plus, dans ces pays, la tuberculose occupe une place de tête dans le diagnostic différentiel des médecins, et c'est encore plus vrai lorsque le diagnostic et le traitement sont gratuits. Le diagnostic de tuberculose est porté (correctement ou incorrectement) avec beaucoup moins de retard lorsqu'il repose sur un avis clinique ou sur un cliché thoracique (s'il est disponible et financièrement accessible). Le rôle de la culture dans un tel contexte est de confirmer ultérieurement ce diagnostic, mais seulement si le laboratoire est fiable. Le programme de lutte contre la tuberculose peut chercher à modifier cette situation en

adoptant une approche restrictive, exigeant la preuve bactériologique du diagnostic comme c'est le cas dans certains pays. Cette exigence ne se justifie ni pour les soins individuels au patient (au point même de ne pas être éthique) ni même probablement pour la maîtrise de la tuberculose.

B. Considérations générales sur les problèmes spécifiques au laboratoire

Pour l'organisation de la surveillance de la résistance à *M. tuberculosis*, quatre problèmes spécifiques au laboratoire doivent être pris en compte :

- le recueil des échantillons,
- le transport des échantillons,
- le traitement et la culture des échantillons,
- l'identification des mycobactéries et les tests de sensibilité aux médicaments.

1. Recueil des échantillons

La tuberculose est une maladie infectieuse qui atteint le plus fréquemment les poumons. Les échantillons provenant du tractus respiratoire inférieur ont la plus grande chance de permettre la détection et la mise en évidence de *M. tuberculosis*. Pour produire un échantillon de bonne qualité, les patients doivent recevoir des instructions sur la façon de produire un crachat provenant des poumons. Une fois l'échantillon recueilli, il sera traité rapidement car, au fil du temps, les bacilles tuberculeux perdent leur viabilité même lorsque l'échantillon est gardé au réfrigérateur.

2. Transport des échantillons

On fera tout son possible pour obtenir le transport immédiat d'un échantillon fraîchement recueilli vers le laboratoire. Cela n'est pas toujours possible et des délais existent entre le recueil de l'échantillon et son traitement. De tels délais donnent aux microorganismes contaminants l'occasion de se multiplier et de dominer les bacilles tuberculeux.

L'utilisation d'un agent préservateur permet de réduire l'émergence des contaminants. Le plus fréquemment utilisé est le chlorure de cétylpyridinium (ou le bromure), un composé ammonium quaternaire. Le laboratoire utilise la centrifugation pour extraire le cétylpyridinium de l'échantillon avant de le traiter pour la culture.

3. Traitement et culture des échantillons

Les échantillons de crachats contiennent des microorganismes qui se multiplient beaucoup plus rapidement que les bacilles tuberculeux. Le traitement de l'échantillon vise à tuer les microorganismes contaminants tout en maintenant le plus possible la viabilité du bacille tuberculeux.

Toute une panoplie d'agents et de procédures de décontamination ont été développées. La sélection de l'agent spécifique de décontamination dépend de l'objectif (contaminants visés, temps d'exposition désiré, etc.). La procédure la plus largement utilisée est la méthode à la soude caustique, proposée initialement par Petroff et qui porte son nom.

Comme base des milieux de culture, on peut utiliser les œufs, l'agar ou le bouillon. Chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients. Dans les pays riches, les laboratoires utilisent en général au moins deux types de milieu car, dans de tels contextes, l'objectif principal de la culture est l'obtention d'une sensibilité élevée en vue du diagnostic. Dans la discussion qui suit, nous ne prendrons en considération que les milieux à base d'œufs. Quoique leur sensibilité soit légèrement moindre (lorsqu'on les emploie pour le diagnostic), cette diminution est négligeable dans le cadre de la surveillance, particulièrement lorsqu'on ne sélectionne que les échantillons multibacillaires à frottis positifs.

Pour prévenir la mort des bacilles tuberculeux par une exposition continue au décontaminant, il faut éliminer la solution alcaline soit par addition répétée d'eau et centrifugation, soit par neutralisation. La neutralisation peut être réalisée par inoculation dans un milieu tamponné ou par utilisation d'acide avant inoculation dans un milieu non tamponné. Il y a lieu d'insister sur la distinction entre les milieux tamponnés (comme le milieu modifié d'Ogawa) et les milieux non tamponnés (comme le milieu de Löwenstein-Jensen ou le Milieu de l'Union Internationale Contre la Tuberculose [IUTM]).

4. Identification des mycobactéries et test de sensibilité aux médicaments

Des mycobactéries environnementales peuvent être isolées à partir d'échantillons de crachats. Comme leur type de sensibilité aux médicaments peut différer de celui de *M. tuberculosis* et qu'il n'a pas de signification épidémiologique, les espèces se développant en culture doivent être identifiées comme appartenant bien au complexe de *M. tuberculosis*. Le type de sensibilité à l'égard des médicaments principaux que sont l'isoniazide, la rifampicine, la streptomycine et l'éthambutol est déterminé pour des iso-

lats de *M. tuberculosis*. La sensibilité à l'égard du pyrazinamide ne peut pas être déterminée de façon valable sur les milieux cités et on ne l'emploie donc pas pour la surveillance.

C. Procédés techniques spécifiques pour la surveillance de la résistance aux médicaments

Dans la section suivante, on trouvera les informations techniques visant à aider les programmes nationaux de lutte contre la tuberculose à participer au Projet Mondial sur la Surveillance de la Résistance aux Médicaments Antituberculeux de l'OMS/ Union.

1. Echantillonnage représentatif

Les résultats de la surveillance de la résistance aux médicaments doivent refléter la situation dans le pays qui fait l'objet de l'enquête. En conséquence, il est essentiel de décider d'un schéma d'échantillonnage qui soit représentatif de la population pour laquelle il faut tirer des conclusions (en évitant les biais). Les trois méthodes le plus fréquemment utilisées pour obtenir un échantillon représentatif sont l'échantillonnage par grappes, l'échantillonnage systématique et l'échantillonnage aléatoire. Ce manuel donnera la préférence aux méthodes d'échantillonnage par grappes et d'échantillonnage systématique qui sont les plus pratiques.

La taille de l'échantillon à examiner dépend de la précision exigée. Habituellement, dans l'optique d'une surveillance chez les patients *jamais traités*, un échantillon de 350 à 1000 patients suffit. Les patients *déjà traités* antérieurement sont de moins en moins nombreux au fur et à mesure de l'amélioration des performances du programme. Toutefois, la taille de l'échantillon exigée pour de tels patients est elle aussi plus faible, car on s'attend à une prévalence plus élevée de la résistance ; ce groupe est particulièrement intéressant pour la surveillance continue des tendances au-delà même de la période d'enquête.

Il y a lieu d'ajuster la taille de l'échantillon en tenant compte des pertes dues aux échecs des cultures des crachats (provenant de la contamination ou de l'absence de croissance) et aux patients éligibles qui refusent de participer. Les fréquences attendues d'échecs des cultures peuvent varier en fonction du délai de transport et des compétences du laboratoire impliqué dans la culture des crachats ; la taille de l'échantillon sera augmentée en conséquence.

Echantillonnage par grappes

L'échantillonnage par grappes a été utilisé très largement pour l'évaluation de la couverture vaccinale au sein du Programme Elargi de Vaccination et une grande partie de sa méthodologie a été élaborée dans ce contexte.

Les méthodes d'échantillonnage par grappes sont particulièrement utiles dans les situations où il est logistiquement difficile de couvrir la totalité de la surface du pays, lorsqu'il n'y a pas de recensement fiable de la population faisant l'objet de l'enquête (base de données pour l'échantillonnage) et lorsque le nombre de cas de tuberculose est élevé. L'unité d'échantillonnage est une grappe de personnes plutôt qu'une personne isolée. Chaque grappe comportera approximativement le même nombre de patients tuberculeux à bacilloscopie positive diagnostiqués consécutivement dans un CDT. Pour satisfaire aux exigences statistiques, un minimum de 30 grappes est nécessaire. L'échantillonnage par grappes exige d'avoir à disposition une base de données consistant en une liste complète de tous les CDT qui déclarent des cas de tuberculose dans le pays, avec le nombre de patients à bacilloscopie positive diagnostiqués par an dans chaque centre. La sélection des grappes est faite à partir de cette liste ; plusieurs grappes peuvent appartenir au même CDT si celui-ci est particulièrement important. Une procédure détaillée de l'échantillonnage par grappes est fournie dans les Directives de l'OMS/Union pour la Surveillance de la Résistance Médicamenteuse en Tuberculose qu'il est conseillé de consulter avant d'entreprendre une telle enquête.

Echantillonnage systématique

Chaque patient à bacilloscopie positive des frottis de crachats récemment diagnostiqué est potentiellement éligible pour fournir un échantillon en vue de l'évaluation de la prévalence de la résistance aux médicaments.

Lorsque dans un pays, il y a par an 6.000 nouveaux cas ou davantage à bacilloscopie positive, il suffit généralement de recueillir un échantillon pour culture provenant approximativement de 5% à 15% de ces patients.

De préférence, l'unité centrale produit une liste à partir des rapports annuels des cas provenant des CDT. Si l'on suppose que le recrutement des patients est stable au fil des mois (absence de variation saisonnière), le nombre total de cas déclarés par tous les CDT est alors divisé par douze, et l'on identifiera autant de CDT que nécessaire pour arriver approximativement à ce nombre de cas. Différents CDT se verront attribuer un mois spécifique de l'année pendant lequel on leur demandera de fournir un échantillon de crachat de chaque nouveau cas diagnostiqué pendant cette

période, pour culture et test de sensibilité. En raison de pertes ou d'inattention, le nombre d'échantillons effectivement reçus peut être fortement réduit. On ajustera pour les pertes prévues en demandant aux CDT de soumettre des échantillons pendant une période plus longue afin d'obtenir le nombre minimum voulu de tests de sensibilité aux médicaments. Comme le nombre de patients nécessitant un retraitement (échecs, rechutes, et patients se présentant à nouveau avec des frottis positifs de crachats après abandon) est habituellement beaucoup plus faible que le nombre de nouveaux patients, la période d'échantillonnage dans ce groupe de retraitement sera beaucoup plus longue et pourrait même durer toute une année. Il est recommandé de prévoir un suivi continu de la résistance entre les enquêtes parmi les cas déjà traités antérieurement, en incluant un nombre aussi élevé que possible de ces patients à partir d'autant de CDT que possible.

Quoique les cas déjà traités constituent un groupe complexe, consistant en échecs, rechutes, réinfection, reprises de traitement après des durées diverses d'interruption, et résistances acquises au cours du traitement ou ayant précédé le traitement, ils constituent un groupe utile pour les analyses de tendance. Les niveaux de résistance aux médicaments y sont plus élevés et peuvent refléter des modifications de façon plus nette et plus précoce, particulièrement dans le cas d'une augmentation des résistances acquises liée à des traitements inadéquats. Mais il sera difficile d'obtenir les fréquences relatives de ces patients, particulièrement dans les pays où un nombre considérable de cas sont traités par un secteur de santé autre que le PNT, de sorte que la prévalence ponctuelle dans ce groupe peut ne pas être précise.

Echantillonnage aléatoire

Un échantillon aléatoire constitue théoriquement la solution idéale, mais sa mise en œuvre comporte souvent des obstacles insurmontables. C'est la raison pour laquelle le procédé n'est mentionné ici que brièvement.

La méthode la plus attrayante consiste à établir au niveau national une liste du nombre de cas de tuberculose déclarés au cours de l'année dans chaque CDT. On utilise alors par exemple OpenEpi (<http://www.openepi.com>) pour produire un échantillon de 20% ou davantage (en fonction de la taille requise de l'échantillon final) parmi des nombres aléatoires de chaque CDT situés entre un et le nombre de cas déclarés au cours de l'année précédente.

Les nombres tirés au hasard sont ensuite envoyés à chaque CDT avec comme instruction d'envoyer pour tests de sensibilité un ou de préférence deux échantillons provenant des cas inscrits sous ces nombres dans le CDT pour autant que le patient correspondant soit enregistré comme nouveau cas de tuberculose à bacilloscopie positive des frottis de crachats. Si environ la moitié seulement de tous les nouveaux cas enregistrés sont des nouveaux cas à bacilloscopie positive des frottis de crachats, l'échantillon original de 20% sera réduit de moitié. A nouveau, il est important de rappeler que pour ce procédé aussi, il faut demander que les échantillons de crachat de tous les cas enregistrés pour retraitement soient soumis à une culture et à un test de sensibilité.

2. Collecte des échantillons

On ne peut obtenir l'échantillon représentatif requis de souches de *M. tuberculosis* que si les échecs des cultures de crachats par contamination ou absence de développement n'excèdent pas l'ampleur attendue. Pour cette raison, il faut s'efforcer de prévenir au maximum les échecs de culture de crachats.

Pour la surveillance de la résistance, la décision d'obtenir un échantillon est habituellement prise après que le diagnostic de tuberculose à bacilloscopie positive des frottis de crachats ait été porté. Les bacilles tuberculeux ne perdent pas leur caractéristique d'acido-alcoolo-résistance avec le temps, mais ils perdent rapidement leur viabilité ; les échantillons soumis pour culture doivent dès lors être traités différemment de ceux soumis pour le seul examen microscopique (par exemple, les échantillons traités à l'eau de Javel ne peuvent absolument pas être utilisés pour la culture).

La viabilité des bacilles tuberculeux diminue rapidement lorsque la température ambiante est élevée et lorsque le délai après collecte augmente. C'est une raison de plus pour n'inclure dans la surveillance que les cas positifs à la bacilloscopie : les chances de retrouver des bacilles viables, même après transport, sont augmentées. On demandera aux patients sélectionnés pour la surveillance de produire un échantillon du petit matin dès que possible après le diagnostic ; deux échantillons consécutifs des crachats seront prélevés pour chaque patient. Sauf lorsque du cétalpyridinium a été ajouté comme agent préservateur, l'échantillon prélevé devrait être conservé dans un local aussi frais que possible ; l'intervalle entre la collecte de l'échantillon et son traitement au laboratoire de référence ne devrait pas dépasser trois jours.

3. Transport des échantillons

Il est souhaitable de traiter les échantillons de crachats dans les laboratoires du lieu où ils ont été recueillis puisqu'il est préférable de traiter un échantillon frais. Toutefois, l'identification de l'espèce et les tests de sensibilité aux médicaments antituberculeux ne peuvent en général être exécutés qu'au laboratoire national de référence de la tuberculose. La seule exception est le laboratoire qui pratique les tests de sensibilité en routine et où toutes les précautions de sécurité et d'approvisionnement régulier en consommables sont assurées. Des essais impliquant les centres de collecte d'échantillons et le niveau central sont utiles pour acquérir une expérience avant de commencer l'enquête.

Pour envoyer les échantillons de crachats au laboratoire de référence, les crachoirs simples en plastic ne sont pas appropriés. Des « containers universels » sont nécessaires. Ces flacons ont un couvercle étanche (filetage comportant une circonférence et demie), ils sont en verre ou en plastic robuste, difficiles à briser même soumis aux pressions considérables qui peuvent se produire au cours du transport. Des boîtes en contreplaqué spécifiquement prévues pour loger les containers universels, afin de prévenir écrasement et dessiccation, seront de préférence construites sur place ; elles devraient être légères. Lorsque des containers sont transportés en couches superposées au sein d'une même boîte, les flacons doivent avoir une taille uniforme et être suffisamment résistants pour supporter le poids des couches supérieures. On trouve à la Figure IV.1 l'exemple d'un container adéquat en verre et d'une boîte pour transport. Comme alternative, on peut utiliser des boîtes en mousse de polystyrène dans lesquelles on cale les flacons pour le transport ; ces boîtes réduiront le poids et les coûts du transport, mais elles s'écrasent plus facilement.

Il faut décider si une solution de conservation est nécessaire pour le transport. La décision repose sur le temps de transport réel (Figure IV.2). Si l'on s'attend à ce que 90% ou davantage des échantillons arrivent au laboratoire de référence dans les trois jours, aucune solution de transport n'est nécessaire. Si le délai dépasse trois jours dans plus de 10% des cas, alors la solution la plus adéquate est l'utilisation d'une solution aqueuse à 1% de chlorure de cétalpyridinium ou d'une solution aqueuse à 0,6% de bromure de cétalpyridinium (aucun des deux produits n'est soluble dans l'eau pure mais dans une solution à 2% de chlorure de sodium). Les documents d'accompagnement indiqueront dans quelle mesure ce produit a été ajouté (car dans ce cas, une centrifugation est toujours nécessaire). Lorsque la centrifugation ne peut pas être réalisée correctement au laboratoire central, ces produits ne doivent pas être utilisés.

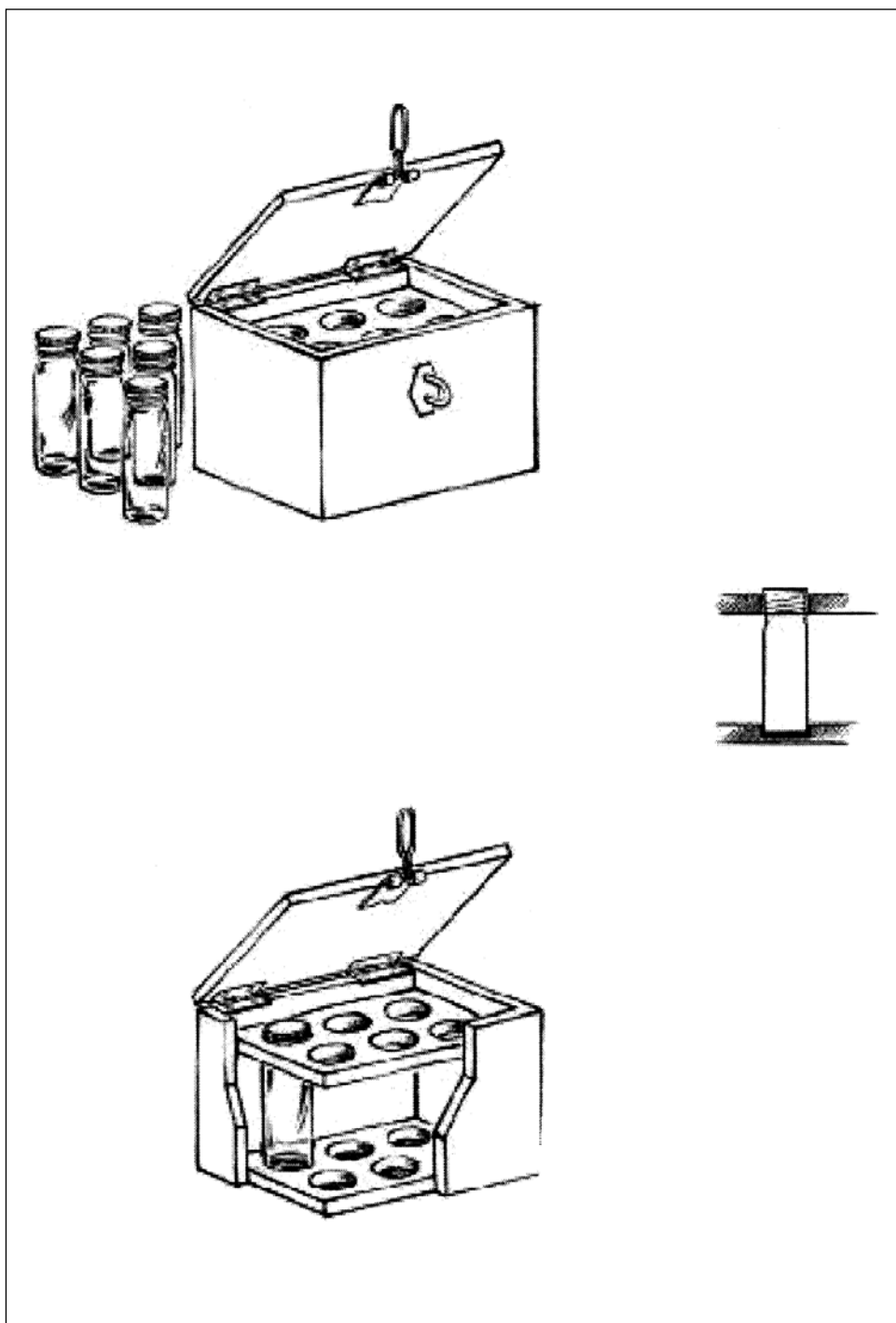


Figure IV.1 Exemple de flacons robustes en verre (container universel 28 ml) et de boîtes de transport pour l'expédition des échantillons de crachats pour culture et tests de sensibilité.

4. Décontamination et homogénéisation

De nombreuses techniques sont disponibles. Aucune d'entre elles n'est idéale, c'est-à-dire qu'aucune d'entre elles ne détruira de manière sélective que la seule flore contaminante et n'obtiendra une liquéfaction totale de l'échantillon. Un compromis raisonnable est nécessaire pour détruire la plus grande partie possible de la flore de contamination tout en veillant à ne faire du tort qu'au plus petit nombre possible de mycobactéries. De plus, tous les réactifs nécessaires doivent être peu coûteux et facilement disponibles.

Pour les échantillons qui n'ont pas été traités en périphérie par le cétylpyridinium, la décontamination de l'échantillon est effectuée dès l'arrivée au laboratoire de référence.

La contamination des milieux provient souvent d'une insuffisance de décontamination (temps d'exposition et/ou concentration), du traitement d'échantillons endommagés par une conservation inadéquate et prolongée ou de la re-contamination par inadvertance d'un échantillon décontaminé ou d'un milieu de culture. L'absence de croissance de *M. tuberculosis* dans l'échantillon provient habituellement d'un processus de décontamination trop agressif, d'un trop long délai avant la mise en culture, d'une centrifugation inadéquate (force et durée insuffisantes de la centrifugation), ou d'un traitement inapproprié de l'échantillon préalablement décontaminé par le chlorure (ou le bromure) de cétylpyridinium.

Méthode pour les échantillons prétraités au chlorure/ bromure de cétylpyridinium

La méthode au chlorure/bromure de cétylpyridinium, un composé d'ammonium quaternaire, a été proposée pour obtenir la digestion et la décontamination des crachats en attente. Lorsqu'un échantillon digéré/décontaminé arrive au laboratoire, il est centrifugé pour concentrer les bacilles tuberculeux et écarter le chlorure/bromure de cétylpyridinium. Cela peut être obtenu en remplissant le tube avec de l'eau avant centrifugation, puis décantation et addition d'eau fraîche par une deuxième centrifugation (Figure IV.2). Le sédiment est alors inoculé directement dans le milieu. Les crachats traités au cétylpyridinium ne doivent pas être conservés au réfrigérateur ni dans un environnement froid où le produit pourrait cristalliser car l'échantillon ne serait plus protégé contre la contamination et la croissance de *M. tuberculosis* serait inhibée après inoculation dans le milieu. Pour la même raison, le système de refroidissement de la centrifugeuse doit être éteint lors de la centrifugation des échantillons traités au cétylpyridinium, afin de prévenir la recristallisation de ce produit dans le sédiment.

Lorsque, malgré le traitement au cétylpyridinium, la fréquence de contamination est élevée par suite d'un temps de transport excessivement long ou d'une technique inadéquate, il peut être indiqué de recourir à un raccourcissement de la décontamination en recourant à l'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4% pendant cinq à dix minutes jusqu'à neutralisation plutôt qu'à un simple lavage.

La méthode au NaOH à 4% utilisée pour les échantillons non traités

Dans le monde entier, on préfère la technique de Petroff qui permet une décontamination au moyen d'une concentration maximale finale allant jusqu'à 2% de NaOH (utilisation d'un volume égal d'échantillon et de solution de NaOH à 4%) pendant 15 à 30 minutes pour les échantillons qui ne peuvent pas être inoculés rapidement.

Il faut insister sur quelques observations générales. La solution de soude caustique à 4% représente la limite supérieure de concentration (Petroff lui-même avait suggéré 3% pour les échantillons de crachats). Le paramètre décisif est la fréquence de contamination des milieux de culture. Si celle-ci reste en dessous de 5% avec par exemple 2% de NaOH, il est tout à fait

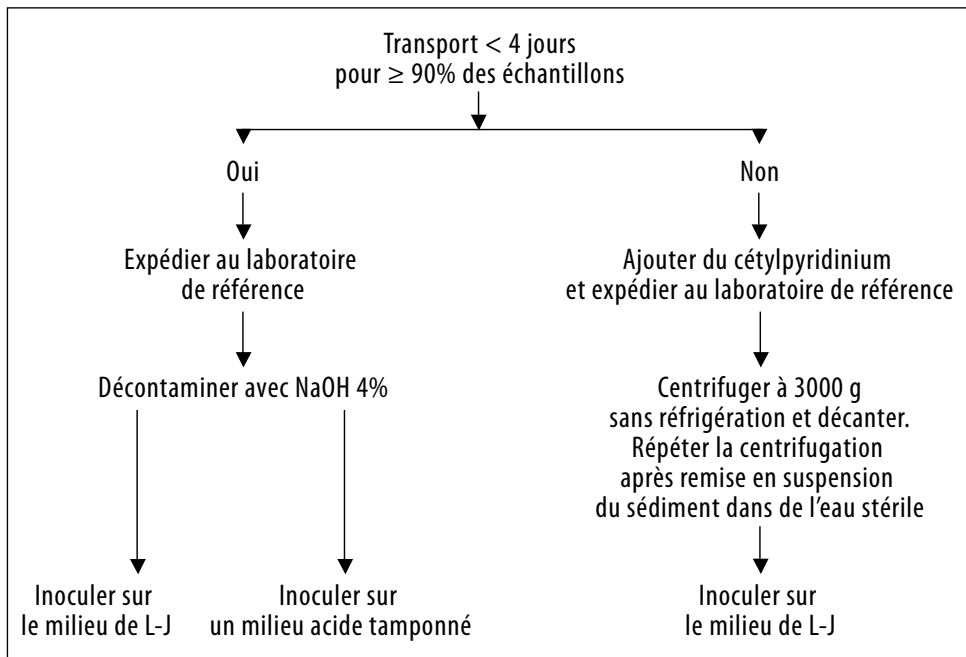


Figure IV.2 Arbre de décision pour le milieu de transport, la décontamination, la centrifugation et le choix du milieu.

légitime d'utiliser cette concentration. La concentration de soude caustique à utiliser dépend donc de la fréquence de contamination des milieux. Cette fréquence doit être déterminée en divisant le nombre de tubes contaminés par l'ensemble *des tubes* inoculés et non pas en calculant la proportion avec comme dénominateur le nombre *d'échantillons*.

On ajoute aux 3 ml de crachats du container universel, 3 ml de NaOH à 4%. La concentration finale sera donc de 2% de NaOH. Il faut faire très attention à ce que la bouteille de NaOH et la pipette de transfert ne viennent jamais en contact avec le goulot du container contenant l'échantillon afin de réduire le risque de contamination croisée.

La décontamination à l'hydroxyde de sodium nuit aux mycobactéries. Prolonger le temps de contact indiqué détruit une proportion croissante des bacilles tuberculeux de l'échantillon. C'est la raison pour laquelle, quand c'est nécessaire, il faut toujours augmenter la concentration d'hydroxyde de sodium (jusqu'à un maximum de 4%) mais jamais la durée de contact.

En cas d'utilisation du milieu de Löwenstein-Jensen, la décontamination de Petroff est suivie d'une neutralisation ou d'un lavage répété à l'eau puis d'une centrifugation. La neutralisation consiste à ramener la mixture alcaline à un pH neutre. On peut y arriver par différentes méthodes. Beaucoup de laboratoires utilisent de l'acide et un indicateur de pH (comme le rouge phénol), mais si cette méthode n'est pas utilisée avec précision, elle peut se terminer par un excès d'acidification surtout lorsqu'elle est appliquée à un sédiment de centrifugation. Une autre méthode consiste à ajouter un volume suffisant de tampon (par exemple du tampon phosphate à pH 6,8). Dans la troisième possibilité, après une décontamination de 15 à 30 minutes, on ne recourt qu'à une seule étape de lavage à l'eau, suivie par une seule centrifugation ; bien que cette méthode laisse théoriquement persister une certaine alcalinité, celle-ci peut n'avoir aucune importance pratique.

Une autre option est l'utilisation d'un milieu acide tamponné. Cette technique n'exige pas de centrifugation puisque l'échantillon décontaminé au NaOH est inoculé directement dans le milieu ; elle est efficace pour la culture des échantillons de crachats à bacilloscopie positive recueillis pour la surveillance de la résistance (Figure IV.2). Ce procédé est très simple ; il peut être utilisé facilement et prévient la contamination exogène ainsi qu'une dévitalisation supplémentaire de *M. tuberculosis* en réduisant le temps de manipulation et le nombre d'étapes de décontamination.

5. Préparation des milieux et inoculation

Les méthodes reposant sur la croissance utilisent les milieux à l'œuf, à l'agar et les milieux liquides.

Quand l'objectif est le diagnostic, la vitesse à laquelle un résultat peut être envoyé (« temps de rotation ») est un élément critique. De nouvelles techniques utilisent pour cette raison des milieux liquides dans une approche visant à une *détection précoce de la croissance bactérienne*. Ces techniques reposent sur la production de dioxyde de carbone par les mycobactéries, la consommation d'oxygène, la production de triphosphatase d'adénosine ou la lyse par mycobactériophages.

Quand l'objectif est la surveillance de la résistance aux médicaments, la rapidité n'étant pas un élément critique, il est recommandé d'utiliser les *méthodes conventionnelles reposant sur une croissance bactérienne*. Les fréquences plus faibles de contamination et les coûts moins élevés sont des éléments intéressants. Des trois types de milieux conseillés, le plus utilisé en vue de la surveillance de la résistance aux médicaments est le milieu à l'œuf.

Certaines souches de bacilles tuberculeux poussent préférentiellement dans certains milieux. Un exemple typique est celui du milieu à l'œuf de Löwenstein-Jensen sans fécule de pomme de terre recommandé par l'Union (dénommé IUTM) (Tableau IV.1). Dans les contextes où *M. bovis* ou certaines souches de *M. africanum* sont des pathogènes fréquents du complexe *M. tuberculosis*, on peut utiliser le milieu IUTM en y remplaçant les 5,5 ml de glycérine par 4,5 g de pyruvate de sodium, sans rien modifier par ailleurs.

Lorsque l'on utilise la culture essentiellement pour la surveillance de la résistance des bacilles tuberculeux aux médicaments plutôt que pour le diagnostic, il est recommandé d'utiliser la technique simple pour l'isolement primaire (Tableau IV.2) ; pour les tests de sensibilité aux médicaments, le milieu IUTM doit toujours être utilisé.

Technique simple au moyen d'un milieu tamponné à l'acide

La technique dite « simple » utilise l'inoculation directe dans le milieu, sans centrifugation préalable. C'est la méthode de référence pour la surveillance de la résistance aux médicaments.

On a proposé de nombreuses méthodes différentes de « culture simple », notamment celles proposées par Marks, Ogawa et Kudoh, pour citer seulement les plus importantes (voir la bibliographie). Quoique toutes soient utilisées

Tableau IV.1 Préparation du milieu de Löwenstein-Jensen de l'Union Internationale Contre la Tuberculose (IUTM)

Adapté de Jensen K. A. Towards a standardisation of laboratory methods. Second rapport du Sous-Comité des Méthodes de Laboratoire de l'Union Internationale Contre la Tuberculose. Bull Int Union Tuberc 1955; 25 (N° 1-2): 89-104.

a) Solution de sels minéraux

L-Asparagine.....	3,6 g
KH ₂ PO ₄ , phosphate de potassium, dibasique, anhydre	2,4 g
Citrate de Magnésium	0,6 g
MgSO ₄ 7H ₂ O, sulfate de magnésium	0,24 g
Glycérine	12 ml
Eau distillée.....	600 ml

Dissoudre les ingrédients, en suivant l'ordre, dans l'eau distillée tout en chauffant. Mettre à l'autoclave à 121°C pendant 30 minutes pour stériliser. Laisser refroidir à température ambiante. Cette solution se conserve indéfiniment et peut être gardée au réfrigérateur en quantités appropriées.

b) Solution de vert de malachite

Vert de malachite. Il est impératif que les cristaux de vert de malachite soient choisis avec soin. N'utiliser que du vert de malachite du commerce qui a été soumis au test d'activité antimycobactérienne, puisque de nombreux lots de ce colorant sont bactéricides pour les mycobactéries.

Colorant vert de malachite	2 g
Eau distillée stérile	100 ml

En utilisant des techniques aseptiques, dissoudre le colorant dans de l'eau distillée stérile en le plaçant dans un incubateur pendant 1 à 2 heures. Cette solution ne se conserve pas indéfiniment. En cas de précipitation ou si la coloration de la solution s'atténue, jeter la solution et en préparer une nouvelle.

c) Œufs entiers homogénéisés

Des œufs de poule frais (ne datant pas de plus de 7 jours) provenant de poules dont la nourriture ne contient pas d'antibiotiques sont nettoyés au moyen d'une brosse dans de l'eau chaude contenant un simple savon alcalin. Laisser tremper les œufs pendant 30 minutes dans la solution savonneuse, ensuite les rincer soigneusement à l'eau courante et les faire tremper dans l'éthanol à 70% pendant 15 minutes. Avant de manipuler les œufs propres et secs, se brosser et se laver les mains. Casser les œufs dans un flacon stérile au moyen d'un couteau stérilisé et les fouetter avec un fouet à œufs stérilisé ou dans un mixer stérile.

Préparation du milieu

Les ingrédients suivants sont rassemblés aseptiquement et bien mélangés dans un grand flacon stérile :

Solution de sels minéraux.....	600 ml
Solution de vert de malachite	20 ml
Œufs homogénéisés (20-25 œufs, en fonction de leur taille).....	1.000 ml
Faire coaguler pendant 45 minutes à 85° C (humidité 80%).	

Tableau IV.2 Composition du milieu à l'œuf tamponné à l'acide (milieu d'Ogawa modifié)

Kudoh S., Kudoh T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. Bull World Health Organ 1974; 51: 71-82

Composants	Quantité
Phosphate de potassium, dibasique, anhydre (KH ₂ PO ₄)	2 g
Citrate de Magnésium	0,1 g
Glutamate de sodium	0,5 g
Eau distillée	100 ml
Glycérine	4 ml
Homogénéisat d'œufs	200 ml
Vert de malachite (2%)	4 ml

La préparation proposée est la suivante :

Milieu recommandé et sa préparation

Milieu d'Ogawa modifié (Kudoh)

Solution saline

Monophosphate de potassium (KH₂PO₄).....2 g

Citrate de magnésium..... 0,1 g

Glutamate de sodium..... 0,5 g

Ces composants sont dissous dans 100 ml d'eau distillée.

La solution est chauffée pour dissoudre les sels.

Glycérine4 ml

Ajouter la glycérine à la solution saline décrite ci-dessus.

Homogénéisat d'œufs

Les œufs doivent être frais (2 jours) et sans antibiotiques. Nettoyez soigneusement les œufs à la brosse avec de l'éthanol à 70°. Après avoir cassé les œufs, les blancs et les jaunes sont homogénéisés au moyen d'un mixer stérile et filtrés à travers une gaze stérile. Ajouter 200 ml de l'homogénéisat d'œufs à chaque 100 ml de solution saline.

Vert de malachite

N'utiliser qu'un vert de malachite du commerce qui a été soumis au test d'activité antimycobactérienne, puisque de nombreux lots de ce colorant sont bactéricides pour les mycobactéries.

Vert de malachite4 ml

Le vert de malachite est ajouté à la solution saline contenant les œufs et la glycérine.

Répartition

La solution mélangée est répartie comme l'exige le type des flacons de culture. Procéder à la coagulation pendant 45 minutes à 85°C (humidité 80%).

dans différents laboratoires, on donne souvent la préférence au milieu dit d'Ogawa modifié proposée par Kudoh (Tableau IV.2). Fondamentalement, la technique simple utilise un milieu contenant un tampon pour neutraliser le décontaminant alcalin. C'est pour cette raison qu'il est préférable de le dénommer « milieu tamponné à l'acide ».

L'échantillon de crachats/décontaminant (environ 6 ml avec une concentration de NaOH proche de 2% à 3%) est mélangé dans un mixer vortex pendant 20 secondes. On laisse ensuite agir le décontaminant pendant 15 minutes.

Le crachat décontaminé est inoculé directement sur le milieu tamponné à l'acide. La taille habituelle de l'inoculum est de deux gouttes (approximativement 0,1 ml) de l'échantillon décontaminé (mais non neutralisé) quand on emploie des pipettes Pasteur à usage unique. Lorsque ces dernières ne sont pas disponibles, on peut utiliser le contenu de deux grandes anses.

Pour chaque échantillon, il faut inoculer au moins deux tubes. On éliminera d'abord l'excès d'eau de condensation de la culture.

Quand l'objectif est la surveillance de la résistance aux médicaments, cette méthode est recommandée pour l'isolement primaire des bacilles tuberculeux. Une fois le milieu de culture inoculé, il est mis à incuber.

Concentration des bacilles tuberculeux par centrifugation

L'utilisation de la centrifugation peut accroître la sensibilité de la culture des mycobactéries. Toutefois, c'est moins un problème pour la surveillance de la résistance que pour le diagnostic de la tuberculose (où il y a beaucoup de problèmes qui ne sont pas évoqués ici). La centrifugation sera également requise pour écarter les substances toxiques comme le chlorure/bromure de cétylpyridinium utilisé pour le transport et/ou la décontamination. Utiliser plusieurs fois la centrifugation pour éliminer le décontaminant aide à réduire une contamination ultérieure

La méthode de concentration par centrifugation exige l'élimination de l'agent décontaminant soit par des cycles d'addition d'eau distillée (en remplissant presque complètement le flacon ou le tube) puis centrifugation jusqu'à élimination de l'agent décontaminant, soit par la neutralisation de l'agent décontaminant. On peut exécuter la neutralisation avant ou après la centrifugation, mais comme la durée de décontamination doit être strictement respectée, il est préférable de neutraliser d'abord. La méthode de centrifugation a l'avantage de permettre la concentration des bacilles

tuberculeux dans le sédiment. Ses inconvénients comportent un allongement de l'exposition à l'agent décontaminant, une étape supplémentaire (centrifugation) et des coûts d'équipement plus élevés (centrifugeuse à importante force de gravitation équipée avec un système clos pour prévenir la libération d'aérosols dans l'environnement).

Dans l'espèce *Mycobacterium*, il y a des lipides complexes qui peuvent représenter jusqu'à 60% du poids total de la paroi cellulaire. Ces lipides rendent difficile la centrifugation des bacilles tuberculeux par des centrifugeuses standard ; un équipement beaucoup plus puissant est donc nécessaire à la production et à la persistance d'une force de centrifugation relative (FCR, exprimée en g) d'au moins 3.000 g. De telles centrifugeuses sont coûteuses et peuvent nécessiter la réfrigération pour prévenir la destruction des bacilles tuberculeux par la chaleur qu'elles produisent. Les laboratoires qui utilisent la méthode de centrifugation doivent contrôler régulièrement que leur centrifugeuse atteint une force de centrifugation adéquate de 3.000 g. Il est nécessaire d'avoir un plan d'entretien de la centrifugeuse ainsi qu'un plan d'urgence en cas de bris de tubes. La FCR est déterminée par le nombre de tours par minute (TPM), le rayon du rotor de la centrifugeuse et une constante. La relation s'établit comme suit :

$$\text{FCR} = 1,118 \times 10^{-5} \times \text{rayon}_{\text{max (cm)}} \times \text{TPM}^2.$$

Par convention, on utilise la distance la plus éloignée (le rayon maximum) en mesurant la distance séparant l'axe de rotation du fond des tubes lorsque la centrifugeuse est en marche. Le nombre de rotations nécessaires pour atteindre 3.000 g (le minimum exigé) se calcule comme suit :

$$\text{TPM} = \text{racine carrée de } \{3.000 / (1.118 \times 10^{-5} \times \text{rayon}_{\text{max (cm)}})\}.$$

Le taux de sédimentation des mycobactéries dépend de manière critique de la durée de centrifugation et de la force de centrifugation. Alors que la prolongation du temps de centrifugation peut compenser une force de centrifugation relativement plus faible, l'augmentation du temps de centrifugation augmente aussi la température de l'échantillon, ce qui peut entraîner une augmentation de perte de viabilité des mycobactéries. Les tubes contenant les crachats seront bouchés correctement et équilibrés avant centrifugation ; la centrifugeuse ne sera jamais ouverte avant arrêt complet. La durée totale de contact avec la solution décontaminante n'excédera pas 30 minutes, c'est-à-dire 15 minutes avant la centrifugation et 15 minutes pour le premier cycle de centrifugation.

Le surnageant est versé dans un récipient étanche destiné aux déchets et contenant du phénol à 5% ; tout liquide autour du goulot du récipient est enlevé avec du papier absorbant. Un entonnoir déposé au sommet d'un

bécher ou d'une bouteille et dont l'extrémité inférieure trempe sous la surface du désinfectant prévient les projections.

Après achèvement de la centrifugation, le culot est remis en suspension en ajoutant 1 ml d'eau distillée et en agitant brièvement ; il est ensuite inoculé.

Il est souhaitable de conserver le sédiment restant, s'il y en a, pendant au moins 2 jours jusqu'à ce qu'il soit certain que les milieux inoculés ne sont pas contaminés. S'ils s'avèrent contaminés, le culot est traité avec une petite quantité d'acide oxalique pendant 20 à 30 minutes pour enlever les contaminants alcalino-résistants. Il est dilué avec de l'eau distillée stérile, centrifugé et inoculé dans les milieux.

6. Incubation et lecture des cultures

Le courant électrique n'est pas disponible régulièrement dans tous les pays. C'est pourquoi, il faut surveiller continuellement la température de l'étuve. Les températures signalées par l'enregistreur de température peuvent ne pas être fiables. Il faut toujours garder un thermomètre à l'intérieur de l'étuve pour confirmer à tout moment la précision des enregistrements.

L'inoculum pipeté sera dispersé à la surface du milieu en inclinant le tube de culture. Ensuite, le tube doit être fermé, mais le couvercle ne doit pas être vissé à fond pour permettre l'évaporation de tout excès d'eau. Pour la première nuit, on incube le tube de culture en position horizontale à 37°C. Le jour qui suit l'incubation, on contrôle le tube. Si tout l'excès d'eau ne s'est pas évaporé, le couvercle est dévissé pendant quelque temps. Une fois toute l'eau évaporée, il faut visser le couvercle à fond et ne plus jamais l'ouvrir jusqu'au moment du test de sensibilité aux médicaments. Une fois le couvercle vissé, les tubes peuvent rester en position verticale pendant la période d'incubation de 9 semaines. Dans les laboratoires utilisant des flacons ou des tubes en plastic pour la culture, l'excès d'eau peut s'évaporer ou non pendant l'incubation ; cela dépend de la qualité du plastic utilisé et du type de couvercle. Lorsque les cultures sont transportées vers un autre laboratoire pour l'identification et les tests de sensibilité aux médicaments, la présence d'excès d'eau entraîne des problèmes de contamination.

Les milieux inoculés seront examinés chaque semaine. La plupart des milieux contaminés et des mycobactéries à croissance rapide sont détectés au cours de la première semaine d'incubation. Le développement de *M. bovis* et de certaines souches dysgoniques de *M. tuberculosis* peut apparaître après 5 à 9 semaines.

La plupart des laboratoires périphériques de culture limitent leurs activités à ces tâches. De tels laboratoires ne doivent pas tenter d'identifier ou

de tester la sensibilité aux médicaments, mais doivent envoyer les flacons de culture dès que la croissance apparaît vers un laboratoire plus central *sans jamais ouvrir ces flacons de culture pour quelque raison que ce soit*. Si les laboratoires adhèrent strictement à cette règle, ils n'auront pas besoin de cabinet de sécurité biologique. L'observation stricte de cette règle ne semble pas permettre d'enlever l'excès d'eau avant l'envoi. Pour faire face à ce problème, la manière la plus sûre et la plus pratique pour éliminer l'excès d'eau est de laisser les couvercles légèrement dévissés immédiatement après la préparation des milieux pour leur permettre de sécher dans l'étuve pendant un jour ou deux ; après quoi, ils sont refermés et plus jamais ouverts.

Toute culture positive pour le complexe *M. tuberculosis* devrait être conservée au laboratoire qui l'a exécutée jusqu'à ce que le laboratoire supranational ait échantillonné les souches et donné les résultats du test de contrôle. Elles seront gardées solidement fermées, si possible dans le réfrigérateur, et protégées de la lumière.

La conservation de cultures à long terme peut être assurée par l'exécution de suspensions concentrées de bactéries dans du lait écrémé ou d'autres milieux liquides. On peut aussi utiliser un flacon de culture en polyéthylène (cryovial de 2 ml) de milieu de Löwenstein-Jensen qui préservera mieux la souche à -20°C. Si les souches sont conservées dans un congélateur à -70°C, elles peuvent être conservées dans une grande variété de milieux pendant de nombreuses années sans perte significative de viabilité.

7. Identification du complexe *Mycobacterium tuberculosis*

Les procédés d'identification des mycobactéries sont complexes et nécessitent une multitude de tests biochimiques (ou de tests moléculaires coûteux) pour déterminer l'espèce de *Mycobacterium* à laquelle elles appartiennent. Dans le contexte de la surveillance de la résistance aux médicaments, le processus peut être simplifié puisqu'il sera uniquement nécessaire de décider avec un degré raisonnable de certitude s'il s'agit ou non d'une espèce pathogène du complexe *M. tuberculosis*. On recommande une procédure très simple d'identification intégrée dans le processus de tests de sensibilité (Figure IV.3). Les cultures contaminées sont immédiatement écartées, alors que le développement de colonies paraissant correspondre à des mycobactéries (morphologie, couleur et moment de développement compatibles) est confirmé et que sa pureté est contrôlée par une coloration de Ziehl-Neelsen après réalisation d'un frottis dans une goutte d'eau. Les cultures pures de mycobactéries sont soumises aux tests de sensibilité et font l'objet d'une subculture dans un milieu à l'acide paranitrobenzoïque (PNB) (Tableau IV.3).

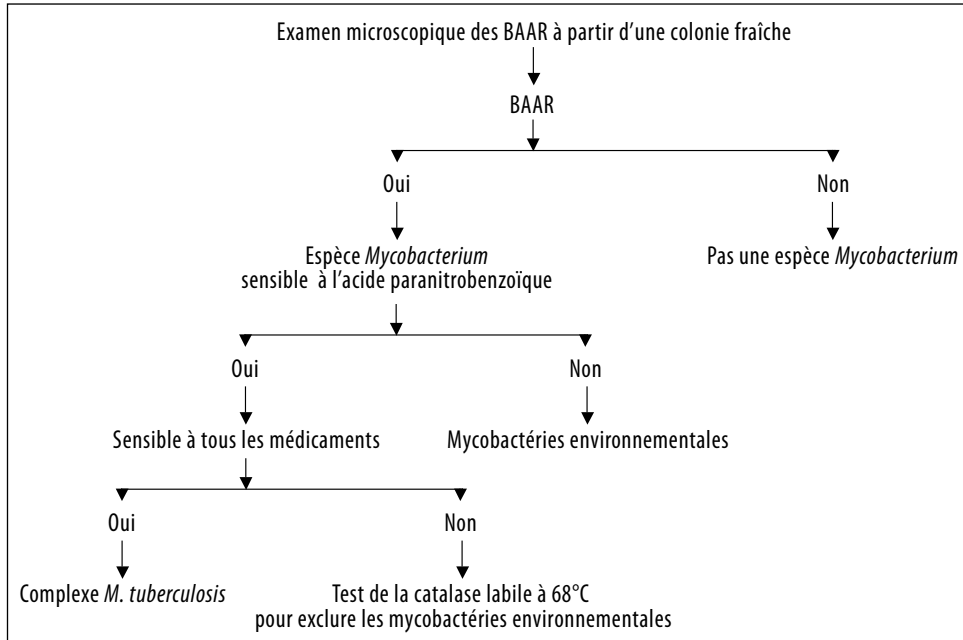


Figure IV.3 Identification du complexe *Mycobacterium tuberculosis*.

Seules les cultures qui se développent sous PNB et les cultures résistantes aux médicaments seront soumises aux tests biochimiques. Par contre, tout ce qui ressemble à *M. tuberculosis*, se développe comme *M. tuberculosis* et a la sensibilité de la plupart des souches de *M. tuberculosis* ne nécessite aucune confirmation complémentaire, particulièrement dans les contextes à haute prévalence.

Pour les identifications ultérieures, en présence d'une croissance abondante, la culture peut être soumise aux tests biochimiques. Le test de catalase labile à 68°C (décrit au Tableau IV.3) permet de distinguer entre le complexe *M. tuberculosis* et les autres mycobactéries, à l'exception de *M. gastri*, *M. haemophilum* et *M. marinum* (extrêmement rares dans les échantillons de crachats). Les tests à la niacine, la réduction des nitrates et le test à l'hydrazide de l'acide thiophène-2-carboxylique permettent de distinguer entre *M. tuberculosis* et *M. bovis* tout autant qu'à l'égard de beaucoup d'autres mycobactéries. Le test à la niacine est négatif pour *M. bovis* et certaines souches de *M. tuberculosis*. Le recours au test à la niacine est actuellement plus difficile en raison des restrictions du transport des réactifs nécessaires, liées à leur toxicité. Les tigettes pour le test à la niacine sont coûteuses et donnent régulièrement des résultats douteux et ont donc été abandonnées par beaucoup de laboratoires.

Tableau IV.3 Tests essentiels d'identification : milieu à l'acide para-nitrobenzoïque (PNB) et test à la catalase labile à 68°C

Développement sur le milieu à l'acide paranitrobenzoïque (PNB)

Les bacilles du complexe *M. tuberculosis* ne se développent pas sur le milieu PNB, alors que la plupart des autres membres du genre le font. Cela permet l'identification des mycobactéries environnementales, ainsi que les mycobactéries environnementales coexistant avec *M. tuberculosis*. Ce test est mis en route au même moment que le test de sensibilité aux médicaments au moyen d'un tube de milieu PNB à 500 µg/ml. Ce tube est inoculé avec environ 1.000 bacilles, c'est à dire 10µl de la dilution 10⁻² utilisée pour inoculer le set de contrôle ainsi que les milieux contenant les médicaments.

Pour préparer 500 mg/ml de milieu PNB, on dissout 250 mg de PNB dans 10 ml de diméthylsulfoxyde ou de méthanol. On ajoute 2 ml de cette solution stock à 100 ml de milieu de Löwenstein-Jensen avant de répartir ce dernier dans des tubes. Les milieux sont coagulés par dessiccation à 85°C pendant exactement 45 minutes.

Test à la catalase labile à la chaleur (à pH 7,0 et 68°C)

Méthode :

- (1) Prélever 2 à 3 contenus d'anse dans les flacons de culture et les mettre en suspension dans 0,5 ml de tampon phosphate 0,067M (pH 7,0) dans un tube à capuchon à vis de 16x125 mm. Préparer deux tubes.
- (2) Incuber un tube au bain-marie à 68°C pendant 20 minutes et laisser l'autre tube à la température de la pièce.
- (3) Après refroidissement du tube chauffé à la température ambiante, ajouter 0,5 ml d'un mélange Tween-peroxyde fraîchement préparé à la fois dans les tubes chauffés et non chauffés et laisser le couvercle dévissé.
- (4) Si des bulles d'air se forment dans le tube non chauffé et non dans le tube chauffé, la souche testée produit de la catalase labile à la chaleur et peut donc être identifiée comme appartenant au complexe *M. tuberculosis* si elle provient de crachats. Attendre 20 minutes avant de la déclarer négative.

La plupart des mycobactéries environnementales produisent de la catalase stable à la chaleur, formant des bulles à la fois dans les tubes chauffés et non chauffés. Si les bulles n'apparaissent dans aucun des tubes, le test a échoué ou la souche peut être catalase négative (c'est le cas par exemple de certaines souches de *M. tuberculosis* résistantes à l'isoniazide).

Réactifs :

Tampon phosphate pH 7,0

- Solution stock 1 : phosphate disodique 0,067 M
dissoudre 9,47 g de Na₂HPO₄ anhydre dans de l'eau distillée pour obtenir 1 litre
- Solution stock 2 : phosphate monopotassique 0,067 M
dissoudre 9,07 g de KH₂PO₄ dans de l'eau distillée pour obtenir 1 litre
- Mélanger 61,1 ml de la solution stock 1 avec 38,9 ml de la solution stock 2.
Contrôler au pH mètre.

Tween 80 à 10%

Mélanger 10 ml de Tween 80 avec 90 ml d'eau distillée. Mettre à l'autoclave à 121°C pendant 10 minutes.

Après passage à l'autoclave, mélanger en agitant pendant que la solution refroidit pour obtenir une bonne dissolution du réactif. Conserver au réfrigérateur.

Mélange Tween-peroxyde

Immédiatement avant le test, mélanger selon le ratio 1:1 le peroxyde d'hydrogène à 30% avec le Tween 80 à 10%.

Presque toutes les souches du complexe *M. tuberculosis* sont sensibles à l'acide paranitrobenzoïque et *M. bovis* est sensible à la fois à l'acide paranitrobenzoïque et à l'hydrazide de l'acide thiophène-2-carboxylique (TCH). Toutefois, l'identification de *M. bovis* doit être confirmée par la négativité des tests de réduction des nitrates. Dans les régions du monde où *M. africanum* ou la variante sensible à l'acide thiophène-2-carboxylique de *M. tuberculosis* sont prévalentes (par exemple dans beaucoup de régions d'Asie), leur identification correcte est laborieuse et n'est pas recommandée. C'est pour cette raison que les tests à la niacine, au TCH et à la nitratase ne sont pas davantage décrits ici.

8. Détermination de la sensibilité aux médicaments

La résistance aux médicaments résulte de la sélection par exposition à un médicament d'un petit nombre de mutants préexistant dans une population de bacilles tuberculeux. C'est pour cette raison que la standardisation de l'inoculum est un des problèmes les plus importants dans les tests de sensibilité aux médicaments. Il y a de nombreuses décennies, on a estimé que dans une suspension contenant approximativement 1 mg de poids humide des bacilles/ml, la variation inter- et intra-souches du nombre d'unités formant des colonies de bacilles tuberculeux (CFU) s'étendait de ≥ 106 à ≤ 108 . Par voie de conséquence, en fonction de la méthode utilisée, une souche sensible pourrait être classifiée par erreur comme résistante à cause d'un ensemencement excessif dans le milieu contenant le médicament.

Le milieu d'Ogawa modifié (Kudoh) est recommandé uniquement pour l'isolement primaire. Pour les tests de sensibilité aux médicaments, c'est le milieu de Löwenstein-Jensen (IUTM) qui doit être utilisé.

Méthodes, avantages et désavantages des tests de sensibilité aux médicaments

Trois méthodes ont été largement admises par les mycobactériologistes. Ce sont la méthode du *ratio de résistance*, la méthode des *concentrations absolues* et la méthode des *proportions*. Ces méthodes sont une réponse à des problèmes différents : facilité d'application, erreurs dans la concentration des médicaments et incertitude concernant la taille de l'inoculum. Pour faire simple, la méthode du ratio de résistance contrôle les erreurs de concentration des médicaments. Elle n'a qu'un intérêt limité lorsque la différence entre la concentration minimale inhibitrice des souches sensibles et celle des souches résistantes est très faible. La méthode des concentrations absolues est techniquement la plus aisée des trois, mais elle n'apporte pas de réponse aux problèmes de taille de l'inoculum, de développement

faible ou lent de certaines souches dans les milieux contenant les médicaments ni aux erreurs potentielles de concentration de médicaments. La méthode des proportions ne répond pas au problème de concentration des médicaments mais elle est préférable en ce qui concerne le problème de taille de l'inoculum. Comme, selon l'avis de beaucoup de mycobactériologistes, c'est ce dernier qui est le problème le plus sérieux, la méthode des proportions est la plus largement adoptée. Toutefois dans la méthode des proportions, l'effet d'agglutination peut introduire de sérieuses erreurs, particulièrement lorsqu'on utilise des colonies sèches. Pour éviter la possibilité d'erreurs de calcul de la proportion d'organismes résistants liée à l'effet d'agglutination, il faut que l'inoculum soit bien dispersé, particulièrement pour les colonies provenant de cultures sèches. La dispersion des organismes des colonies provenant de cultures sèches exige plus de temps ; on prolonge donc la durée d'homogénéisation ou on soumet les souches à une subculture préalablement au test de sensibilité aux médicaments. A cet égard, la méthode des concentrations absolues est avantageuse puisqu'on y utilise le poids humide comme inoculum standard.

Les souches paraissant appartenir au complexe *Mycobacterium tuberculosis* (en raison de leur aspect et de la lenteur de leur croissance) sont testées en routine pour la sensibilité à l'égard de l'isoniazide, de la rifampicine, de la streptomycine et de l'éthambutol. Il y a lieu d'utiliser le milieu de Löwenstein-Jensen IUTM dans des containers universels (28 ml) ou dans des tubes sans ou avec incorporation des médicaments aux concentrations recommandées (Tableaux IV.4 et IV.5).

Une anse calibrée d'inoculation (fabriquée avec du fil gauge 24) d'un diamètre interne de 3 mm fournira 0,01 ml. L'importance du développement dans la culture primaire doit être quantifiée : si l'on n'observe le développement que de 5 colonies ou moins, les résultats du test de sensibilité aux médicaments peuvent ne pas être fiables ; il est recommandé de ne pas réaliser de tests de sensibilité aux médicaments à partir de telles cultures. Un échantillon représentatif de 5 à 10 mg provenant de la culture primaire ou d'une subculture réalisée pendant une ou deux semaines après l'apparition du développement est prélevé au moyen d'une anse d'inoculation et placé dans un flacon stérile de McCartney (flacon de 14 ml avec un capuchon à visser) contenant 1 ml H₂O et 10 billes de verre de 3 mm de diamètre. On homogénéise le mélange sur un mixer Vortex pendant environ une minute en veillant à de brèves interruptions et ensuite (quand c'est nécessaire), on ajuste par addition d'eau distillée stérile l'opacité de la suspension à celle d'une suspension standard de 1 mg par ml de BCG ou à celle du standard McFarland N°1 (pour la préparation exacte : voyez Kent P T, Kubica G P.

Public Health Mycobacteriology. A guide for the level III laboratory, US Department of Health & Human Services, Center For Disease Control, Georgia, USA, 1985: p 168).

A partir de la suspension originale, on fait deux dilutions en série, à 10⁻² et 10⁻⁴, en utilisant l'anse calibrée d'inoculation ainsi que les récipients stériles McCartney contenant 1 ml de H₂O. Le sédiment de la suspension originale ne doit pas être agité afin d'éviter la formation de gros agglutinats dans les dilutions en série. On inocule une pente du milieu de contrôle et de chaque milieu contenant des médicaments au moyen d'une anse prélevée dans chacune des dilutions (0,01 ml).

Lorsqu'elle est pratiquée correctement, la méthode des proportions minimise les résultats non fiables du test de sensibilité qui sont dus aux variations de taille de l'inoculum.

Tableau IV.4 Concentrations critiques des médicaments et proportions critiques pour la résistance (milieu de Löwenstein-Jensen)

Médicament	Concentration	Proportion critique
Isoniazide	0,2 mg/l	1%
Rifampicine	40 mg/l	1%
Dihydrostreptomycine	4 mg/l	1%
Ethambutol	2 mg/l	1%

Milieux contenant les médicaments

On peut préparer et conserver à 4°C pendant au maximum un mois les milieux de Löwenstein-Jensen en pentes modifiés selon IUTM et contenant 0.2 mg/l d'isoniazide, 4 mg/l de dihydrostreptomycine, 40 mg/l de rifampicine et 2 mg/l d'éthambutol.

Il faut enregistrer les numéros de lots de ces produits (voir le chapitre sur le contrôle de qualité). Pour certains médicaments, il est nécessaire de convertir la quantité nécessaire du sel du substrat en substance active en tenant compte du degré d'hydratation et de la pureté du sel selon un facteur de puissance qui doit être spécifié par le fabricant (Tableau IV.5). C'est le cas pour la dihydrostreptomycine qui est habituellement fournie sous forme de sulfate et pour la rifampicine. L'éthambutol est habituellement fourni sous forme de dihydrochlorure et la plupart des laboratoires font la correction pour la puissance. L'isoniazide est toujours utilisé dans un ratio sel sur base de 1 : 1.

Tableau IV.5 Préparation des médicaments pour les tests de sensibilité aux médicaments par la méthode des proportions

1. Pesée et préparation des solutions stock de médicaments antituberculeux
2. Préparation des dilutions des solutions stock pour incorporation dans le milieu
3. Conservation des médicaments et des solutions stocks

1. Pesée et préparation des solutions stock de médicaments anti-tuberculeux

On ne peut utiliser que des poudres purifiées de médicaments provenant d'un fabricant de bonne réputation. Il est préférable de les conserver dans un dessiccateur pour éviter l'absorption de l'humidité environnementale. Il faut les remplacer régulièrement en se basant sur l'information concernant l'activité du lot que l'on peut obtenir en consultant le site Web du fabricant. Si cela n'est pas possible, il est préférable d'acheter des poudres fraîches tous les ans ou tous les deux ans. Sauf peut-être pour la rifampicine, la plupart des laboratoires ne devront donc acheter qu'un petit flacon chaque fois.

Il faut tenir compte de la puissance des poudres achetées car elles varient d'un fabricant à l'autre et d'un lot à l'autre. Elle dépend de 1) la pureté du médicament, 2) son contenu en eau et 3) la fraction sel / contre-ion :

Puissance = (pureté vérifiée) x (fraction active) x (1- contenu en eau)

Exemple : Si la pureté contrôlée de la rifampicine est de 0,998 (c'est un exemple, examinez la pureté contrôlée indiquée par le fabricant), la fraction active étant de 0,950 (contrôlez la fraction effective indiquée par le fabricant) et si le contenu en eau est de zéro, alors :

Puissance = $0,998 \times 0,950 \times (1-0) = 0,948$

La puissance n'est donc pas indiquée sur le flacon de médicament. Elle peut être calculée comme ci-dessus ou parfois obtenue sur le site Web du fabricant. Quand ce n'est pas possible, il est acceptable d'utiliser des valeurs moyennes pour calculer cette puissance en multipliant la quantité pesée par la fraction du produit actif : ces fractions sont 1,00 pour l'isoniazide, 0,95 pour la rifampicine, 0,80 pour la dihydrostreptomycine et 0,75 pour l'éthambutol.

Les solutions stock des médicaments se conservent mieux quand elles sont plus concentrées. Pour n'importe quel médicament, il y a lieu de préparer une solution stock de 100 mg de produit actif dans 10 ml de solvant (10 mg/ml) et de la conserver congelée en « aliquots » correctement identifiés de 1 ml. On y arrive facilement en pesant avec précision une quantité proche de 100 mg divisée par la puissance (ou sa moyenne, comme indiqué plus haut) c'est-à-dire environ 100 mg (100/1) d'isoniazide, mais environ 133 mg (100/0,75) de dihydrochloride d'éthambutol. Le poids exact en mg est indiqué et le contenu exact de produit actif est alors calculé en multipliant la quantité pesée par la puissance. Cette quantité divisée par 10 indique le volume exact de solvant nécessaire pour faire une solution stock de 10 mg/ml.

Exemple : il y a lieu de peser environ 133 mg d'hydrochloride d'éthambutol, mais la quantité prélevée n'est que de 121 mg. Ceci donne donc $121 \times 0,75 = 90,75$ mg de produit actif. Nous devons dissoudre ceci dans 9,075 (arrondi à 9,1) ml de solvant pour obtenir la solution stock de 10 mg/ml. On utilise pour les solutions stock l'eau distillée stérile comme solvant, sauf pour la rifampicine où il faut employer du diméthylsulfoxyde (DMSO) ou du méthanol pur.

Les solutions de médicaments sont considérées comme auto-stérilisantes et ne doivent pas être mises à l'autoclave ni soumises à ultrafiltration. *Suite du tableau* ➔

2. Préparation des dilutions de solutions stock pour incorporation dans les milieux

La concentration finale de rifampicine dans le milieu est de 40 µg/ml ; on a donc besoin de 4.000 µg soit 4 mg pour 100 ml de milieu. La solution stock contient 10 mg/ml et ne doit pas être diluée davantage. Il faut simplement ajouter 0,4 ml de solution stock par 100 ml de milieu Löwenstein-Jensen et bien mélanger.

Pour les autres médicaments, plusieurs étapes de dilutions dans l'eau distillée stérile sont nécessaires (voir le Tableau ci-dessous).

Médicament et concentration de la solution stock	Concentration finale du produit actif dans le milieu	Facteur de dilution. Quantité nécessaire par 100 ml de milieu	Quantité de solution stock nécessaire pour 100 ml de milieu	Etapes de dilution	Volume de la dernière dilution nécessaire pour 250 ml de milieu
Isoniazide 10 mg/ml	0,2 µg/ml	20 µg = 0,02 mg	10/0,02 = 500	10 x/10 x/5 x	2,5 ml
Ethambutol 10 mg/ml	2 µg/ml	200 µg = 0,2 mg	10/0,2 = 50	10 x/ 5 x	2,5 ml
Dihydro- streptomycine 10 mg/ml	4 µg/ml	400 µg = 0,4 mg	10/0,4 = 25	10 x/ 2,5 x	2,5 ml

Toutes les pipettes et tubes utilisés doivent être stériles et il faut employer des pipettes volumétriques précises. Pour les dilutions de 10x, ajouter exactement 0,5 ml de la solution stock à exactement 4,5 ml d'eau distillée stérile et mélanger. Pour les dilutions suivantes, ajoutez 1 ml de la dilution précédente correctement mélangée à 9 ml d'eau distillée stérile (deuxième dilution pour l'isoniazide) ou à 4 ml (troisième dilution pour l'isoniazide, deuxième dilution pour l'éthambutol) ou à 1,5 ml (deuxième dilution pour la dihydrostreptomycine) et bien mélanger.

Pour la dernière dilution, ajouter 1 ml par 100 ml de milieu et bien mélanger. Pour de grands volumes de milieu, on peut omettre la dernière étape de dilution. Par exemple, pour préparer 500 ml de milieu avec de la dihydrostreptomycine à 4 µg/ml, il suffit de diluer 10 x la dilution stock à 10 mg/ml et d'ajouter 2 ml de cette dilution aux 500 ml de milieu (qui contient donc 2 mg soit 500 x 4 µg de produit actif).

1. Conservation des médicaments et des solutions stock

Les poudres de médicaments peuvent être conservées pendant un à deux ans si l'on respecte les exigences de température :

- l'isoniazide et l'éthambutol sont conservés à la température ambiante, de préférence avec un peu de gel de silice dans un dessiccateur (le dihydrochloride d'éthambutol est hygroscopique)
- la dihydrostreptomycine est conservée dans un réfrigérateur à 4°C.
- la rifampicine est conservée à l'état congelé à -20°C.

Les solutions stock des médicaments et de PNB peuvent être conservées congelées en aliquots de 1 ml dans des tubes bien fermés et bien étiquetés pendant au maximum 12 mois. Ce qui reste après décongélation et dilution doit être jeté. Toutefois, la plupart du temps, le contenu d'un flacon d'antibiotique est beaucoup trop important pour être consommé en un ou deux ans ; lorsque le congélateur n'est pas fiable en raison de coupures de courant, il ne faut donc pas conserver de solutions stock.

Ce qui reste des autres dilutions ne doit jamais être conservé.

Les milieux contenant les médicaments seront conservés au réfrigérateur dans des tubes bien fermés et seront utilisés de préférence dans les trois mois.

Au cours de la coagulation des milieux, il est essentiel de maintenir la température exactement à 85°C pendant 50 minutes ou de suite après l'adjonction des œufs et de maintenir une température égale pour tous les tubes ou les flacons. Ceci exige des types particuliers de coagulateur utilisant la vapeur ou un bain-marie. Une température et une durée excessives diminuent la puissance des médicaments dans les milieux.

Lecture, interprétation et expression des résultats

Il y a lieu d'examiner les milieux ensemencés après une semaine d'incubation à 37°C pour rechercher une contamination. La première lecture des résultats des tests de sensibilité aux médicaments est faite après 4 semaines (28 jours) d'incubation. A ce moment, toutes les souches résistantes aux médicaments peuvent être enregistrées comme telles. Comme certaines souches multirésistantes se développent très lentement, il est préférable d'attendre une deuxième lecture après 6 semaines (42 jours) avant d'enregistrer la sensibilité, même si la croissance sur le milieu sans médicament est abondante au 28^e jour. Dans le cas où la croissance dans le milieu-contrôle est médiocre même après 6 semaines (c'est-à-dire s'il y a peu ou aucune colonie à la dilution bactérienne de 10^{-4}) il y a lieu de répéter le test. Un résultat plus correct peut être obtenu en utilisant des inocula plus concentrés (10^{-1} et 10^{-3}), à condition que ceci n'entraîne pas un nombre excessif de colonies. Le test devrait être également répété lorsque la pente du milieu de contrôle montre un développement abondant avec la dilution bactérienne de 10^{-4} (ou 10^{-3}) et lorsqu'une résistance à certains médicaments semble présente (risque de fausse résistance en raison d'un inoculum trop concentré).

La résistance est exprimée en pourcentage de colonies dans le milieu contenant les médicaments par comparaison avec le développement sur le milieu sans médicament aux concentrations critiques des produits, c'est-à-dire 0,2 ml/l pour l'isoniazide, 40 mg/l pour la rifampicine, 4 mg/l pour la dihydrostreptomycine et 2 mg/l pour l'éthambutol. Le critère habituel de résistance est une croissance de 1% pour ces quatre médicaments (Tableau IV.4). Le test doit être répété lorsqu'aucune interprétation claire n'est possible.

9. Enregistrement des résultats de la culture et des tests de sensibilité aux médicaments

Il faut distinguer les informations essentielles pour la surveillance du point de vue de la santé publique et celles essentielles pour le suivi du processus de travail du laboratoire.

Pour le suivi du travail du laboratoire, il vaut mieux enregistrer l'information sur des fiches individuelles ou dans un registre spécial avec, pour chaque échantillon, une information détaillée sur les résultats de la lecture permettant une identification précise des problèmes concernant la culture et les tests de sensibilité aux médicaments (exemples dans les Annexes 7 et 8). De tels registres varient selon les préférences de chaque laboratoire, le nombre des différents tests pratiqués, la fréquence des lectures et d'autres facteurs.

L'unité du service envoyant un échantillon pour culture fournira les informations concernant le patient sur un formulaire de demande spécialement conçu (Annexe 9).

Les réponses des résultats concernant les tests de sensibilité aux médicaments doivent être complets ; c'est-à-dire qu'il ne faut répondre que pour les cultures dans lesquelles les quatre produits ont tous été testés et il faut faire la liste de toutes les combinaisons possibles. Ceci facilitera les comparaisons ultérieures. Les résultats seront transmis par type de patient afin d'assurer une estimation de la fréquence de la résistance aux médicaments dans les souches provenant soit de nouveaux cas, soit de cas traités antérieurement. Le formulaire de déclaration est dans l'Annexe 10.

10. Contrôle interne de qualité des cultures et des tests de sensibilité aux médicaments

Le contrôle interne de qualité couvre tous les aspects de la prise en charge par le laboratoire de référence afin de suivre la précision et la reproductibilité des résultats qu'il obtient.

Tous les travailleurs de laboratoire concernés par ces tâches spécifiques doivent disposer d'un manuel et d'un organigramme décrivant étape par étape ce qui doit se produire lorsque des anomalies apparaissent lors du suivi du contrôle de qualité. Les graphiques traçant les indicateurs critiques de performance, comme les fréquences de contamination des cultures, les fréquences de positivité des cultures dans les échantillons à bacilloscopie positive de crachats provenant de cas non traités ainsi que les fréquences et les profils de résistance aux médicaments sont utiles pour un suivi de ce genre.

On peut tester facilement la qualité des milieux de culture sans médicament en utilisant une souche de *Mycobacterium* à croissance rapide tel que *M. fortuitum*. Lorsqu'aucun développement ne survient dans les 5 jours après l'inoculation, le milieu n'a pas les propriétés requises.

Il est de loin préférable de contrôler la qualité des tests de sensibilité aux médicaments en testant la souche standard H37Ra de *M. tuberculosis* pour chaque lot nouvellement produit de milieux. Une autre méthode de contrôle de qualité consiste à inclure dans chaque série de tests la souche standard H37Ra ainsi que deux souches de *M. tuberculosis* avec des degrés modérés de résistance à l'égard de certains des médicaments ; ensemble ce seront les marqueurs de résistance aux quatre médicaments.

11. Test de compétence pour les tests de sensibilité aux médicaments

Pour s'assurer que les résultats des tests de sensibilité aux médicaments sont fiables et comparables sur le plan international, l'OMS et l'Union ont créé en 1994 un réseau de laboratoires supranationaux de référence. L'objectif principal de ce réseau était la standardisation des tests de sensibilité de *M. tuberculosis* aux médicaments à travers le monde. Aujourd'hui, le réseau supranational évalue la compétence des laboratoires nationaux engagés dans la surveillance de la résistance aux médicaments antituberculeux. Ces tests de compétence consistent à échanger des échantillons de souches de *M. tuberculosis* entre le laboratoire supranational et le laboratoire national de référence et à comparer les résultats avec le « gold standard » qui a été défini comme un résultat consensuel du réseau de laboratoires supranationaux.

La deuxième étape dans les tests de compétence des résultats provenant des enquêtes nationales consiste en l'échantillonnage systématique (pour les souches résistantes) ou aléatoire (pour les souches sensibles) des souches incluses dans les enquêtes nationales et à comparer les résultats en double aveugle.

Il est recommandé que chaque laboratoire national de référence de la tuberculose mettant en route une surveillance de la résistance aux médicaments antituberculeux établisse un lien avec le laboratoire supranational de référence de la tuberculose le plus approprié afin d'assurer son intégration dans le réseau mondial.

12. Analyse des résultats des tests de sensibilité aux médicaments

Il est très important de connaître la population d'où proviennent les souches de bacilles tuberculeux. Idéalement, ils devraient être représentatifs de la totalité de la population de patients tuberculeux, comme indiqué plus haut. Si l'on n'est pas arrivé à cette représentativité, la potentialité de biais doit être clairement spécifiée.

Il faut distinguer très clairement et analyser séparément les patients qui n'ont *jamais été traités* et ceux qui ont *déjà été traités* pour deux raisons. Premièrement, l'échantillonnage peut avoir été différent pour les patients déjà traités puisque l'on conseille souvent pour ce groupe un sur-échantillonnage. Une simple addition des deux pourrait alors provoquer une grave distorsion du tableau. Toutefois, l'analyse de la résistance des deux groupes combinés se justifie pour un échantillon suffisamment grand dans lequel les deux groupes sont représentés chacun proportionnellement à leur fréquence, par exemple, pour les résultats d'une enquête de population comportant un échantillonnage systématique de tous les nouveaux cas enregistrés. Cela peut donner une bonne idée du pool total de souches résistantes circulant dans la population à ce moment précis. Les résultats d'un échantillonnage continu des cas déjà traités ne peuvent pas être utilisés pour étudier la prévalence, mais ils devraient être similaires aux résultats des enquêtes ponctuelles pour le même groupe pour autant que leur échantillonnage ait été suffisamment complet et représentatif. Ils seront plutôt utilisés pour étudier les tendances ; pour connaître celles-ci les échantillons annuels successifs devraient être représentatifs de tous les types de cas incidents traités antérieurement ainsi que de leurs proportions relatives.

Dans un bon programme, une souche résistante provenant de patients ayant des antécédents de traitement antérieur (*déjà traité*) représente le plus souvent la transmission d'une résistance primaire : la souche était déjà résistante au début du traitement et c'est là la raison de l'échec ou de la rechute. Les niveaux de résistance sont plus élevés en raison du mécanisme de sélection agissant au cours du traitement. Cela n'a rien à voir avec les déficiences du programme. Toutefois, une partie des résistances observées dans ce groupe représente une résistance acquise par suite d'erreurs du traitement. Cette dernière ne peut être décelée que par comparaison avec le profil de résistance préalablement au traitement, mais comme cette comparaison est généralement impossible, seul le suivi des tendances dans l'ensemble du groupe traité antérieurement permet de tirer des conclusions concernant les performances du programme. Dans les programmes médiocres, la fréquence de la résistance augmentera (rapidement) par suite d'une proportion considérable de résistances acquises, alors qu'elle décroîtra lentement en cas de performances adéquates du programme.

Le groupe de cas déjà traités peut mettre en évidence des erreurs très récentes du programme ; par contre, l'apparition de résistance chez des patients qui n'ont jamais été traités antérieurement est fréquemment retar-

dée vu la durée d'incubation variable de l'infection tuberculeuse latente avant apparition d'une maladie clinique évolutive. La prévalence de la résistance aux médicaments chez les patients *jamais traités* est par voie de conséquence un moyen beaucoup moins efficient pour suivre les performances du programme. Il est essentiel de recueillir l'information sur l'âge des patients et de calculer la prévalence de la résistance aux médicaments spécifique à chaque âge. Pour obtenir des informations sur le vrai type de souches actuellement en circulation, il serait idéal d'obtenir des cultures et des tests de sensibilité aux médicaments provenant d'enfants âgés de moins de cinq ans, puisque celles-ci reflètent par définition les souches en circulation dans un passé récent et proviennent le plus probablement de patients *jamais traités*. Comme cela n'est habituellement pas réalisable puisque les maladies à bacilloscopie positive sont rares chez les enfants, l'allure de la distribution de la résistance aux médicaments spécifique pour l'âge parmi les patients *jamais traités* peut fournir une mesure d'approximation grossière pour les tendances. Si l'on observe dans les groupes d'âge croissant une diminution de la prévalence de la résistance aux médicaments chez les patients *jamais traités*, cela signifie que la fréquence de la résistance aux médicaments est susceptible d'avoir augmenté au fil du temps. A l'inverse, si l'on observe une augmentation de fréquence avec l'âge, cela peut suggérer que la situation s'améliore ou que des erreurs de classification des patients sont survenues (classement de cas *déjà traités* dans le groupe de cas *jamais traités*). Il en est ainsi parce que plus le patient est âgé, plus vraisemblable est le fait que le temps moyen écoulé depuis l'infection par la souche conduisant à la tuberculose actuelle est plus long. Cela est particulièrement vrai lorsqu'il y a déclin de la tuberculose et lorsque le risque de réinfection est relativement bas. Quand le risque de réinfection est élevé, cela est peut être moins fiable.

Pour déterminer le niveau de résistance chez les patients *jamais traités*, il suffit de calculer la proportion de souches résistantes. La *proportion* de souches résistantes a moins de signification en ce qui concerne la résistance chez les patients *déjà traités*. Dans ces conditions, c'est le *nombre absolu* de cas avec résistance médicamenteuse identifiés pendant une année qui fournit l'information la plus intéressante.

Il est important de savoir aussi précisément que possible quelle est la proportion de patients ayant eu un traitement antérieur et éligibles pour la surveillance de la résistance aux médicaments du pays qui ont subi effectivement un test de sensibilité aux médicaments. Plus complète sera l'évaluation et plus limitée sera l'extrapolation nécessaire à l'estimation du nombre absolu de tels cas porteurs de souches résistantes.

L'information élémentaire enregistrée dans les registres du laboratoire de référence de la tuberculose pour les cultures sera saisie dans l'ordinateur de manière régulière. Un ordinateur comportant un logiciel approprié est essentiel pour l'efficacité de l'analyse des données. Le logiciel minimal requis comporte EpiData, un tableur et un traitement de texte. EpiData et OpenOffice appartiennent au domaine public et peuvent être téléchargés gratuitement sur Internet (www.epidata.dk et www.openoffice.org).

13. Perspectives d'avenir

Malgré les réalisations importantes en termes de standardisation des techniques au sein du Projet Mondial de la Surveillance de la Résistance aux Médicaments Antituberculeux, le tableau global est encore loin d'être clair : une fraction minime seulement de la population de patients tuberculeux dans le monde est couverte par ce projet. Cet échec dans la couverture de pays entiers par des échantillons représentatifs peut être au moins partiellement attribuable aux exigences techniques importantes pour les services centralisés de culture et de tests de sensibilité ainsi qu'aux problèmes que comporte l'obtention de bacilles viables dans les pays où le transport en temps utile est difficile.

La complexité de la mise en œuvre d'une surveillance adéquate de la résistance aux médicaments antituberculeux par des laboratoires nationaux de référence a été fréquemment sous-estimée. Du point de vue de la surveillance, un système simple suivant la résistance à la rifampicine (un agent prédictif excellent d'échec des régimes basés seulement sur les six médicaments essentiels) en est l'élément essentiel. Les techniques moléculaires identifient des mutations du gène *rpoB*. La technique commercialement disponible a une sensibilité proche de 95% pour découvrir la résistance à la rifampicine par comparaison avec la méthode phénotypique utilisée comme *gold standard*. Sa spécificité est probablement du même ordre si l'on tient compte de la prévalence des sites spécifiques de mutation *rpoB*. Le test peut être réalisé à partir d'un échantillon de crachats à bacilloscopie positive des frottis; il comporte une étape d'amplification du DNA qui n'exige pas la présence de bacilles viables, puis une hybridation du DNA ou un séquençage en vue de l'identification des mutations éventuelles.

Les échantillons pour les tests moléculaires peuvent être recueillis en périphérie et transportés au niveau central sans souci de viabilité. En fonction de la qualification des laboratoires nationaux de référence ou de recherche, la détermination de la sensibilité ou de la résistance à la rifampicine peut être assurée localement ou, comme alternative, l'échan-

tillon stérilisé peut être envoyé à un laboratoire supranational de référence rémunéré par la communauté internationale pour assurer ce service. Une telle perspective pourrait permettre peut-être de sortir de la situation généralement décevante d'aujourd'hui.

D. Considérations éthiques sur la surveillance de la résistance aux médicaments

En accord avec la Déclaration d'Helsinki de l'Association Médicale Mondiale, les sujets faisant l'objet de recherches doivent être volontaires et informés du propos de la recherche médicale ; celle-ci ne doit être entreprise que s'il est raisonnablement vraisemblable que les populations dans lesquelles elle est menée en seront bénéficiaires.

Lors de la conclusion de l'étude, chaque patient qui a été admis devrait être assuré d'accéder aux méthodes prophylactiques, diagnostiques et thérapeutiques les mieux démontrées et identifiées par l'étude. Au cours du processus de planification, il est nécessaire d'identifier la possibilité pour les participants d'accéder après l'essai à des procédures prophylactiques, diagnostiques et thérapeutiques identifiées comme intéressantes ou d'accéder à d'autres soins appropriés. Il faut décrire dans le protocole de l'étude les dispositions prises pour cet accès dans les suites de l'essai ainsi que pour d'autres soins afin que le comité d'éthique puisse examiner ces dispositions au cours de sa révision.

Alors que l'identification d'une résistance autre que la multirésistance ne s'accompagne habituellement pas d'un résultat final défavorable du traitement lorsqu'on utilise les combinaisons disponibles de médicaments essentiels, la guérison de la tuberculose due à des organismes résistants à la fois à l'isoniazide et à la rifampicine est beaucoup moins probable si on n'utilise pas des médicaments dits de seconde ligne. Tous les pays n'ont pas accès à ces médicaments de seconde ligne et tous n'ont pas de services aptes à organiser le traitement complexe de patients atteints de tuberculose à germes multirésistants.

Là où un traitement est disponible pour la tuberculose à germes multirésistants il faut faire les plus grands efforts pour retrouver les patients chez qui la souche a été isolée, s'enquérir de leur état clinique et en cas d'absence de réponse favorable au traitement, leur donner accès aux médicaments qui donnent une chance de guérir. Cela doit être décrit dans le protocole tout en tenant compte des difficultés liées au délai nécessaire à l'obtention des résultats des tests de sensibilité aux médicaments.

Bibliographie

1. Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mitchison D A, Rist N, Smelev N A. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bull World Health Organ 1969; 41: 21-43.
2. Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroy P, Langerova M, Mahler H T, et al. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bull World Health Organ 1963; 29: 565-578.
3. Collins C H, Grange J M, Yates M D. Tuberculosis bacteriology. Organization and practice. Second edition. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1997.
4. Henderson R H, Davis H, Eddins D L, Foege W H. Assessment of vaccination coverage, vaccination scar rates, and smallpox scarring in five areas of West Africa. Bull World Health Organ 1973; 48: 183-194.
5. Jensen K A. Towards a standardisation of laboratory methods. Second report of the Sub-Committee of Laboratory Methods of the International Union Against Tuberculosis. Bull Int Union Tuberc 1955; 25(No 1-2): 89-104.
6. Khomenko A G. The variability of *Mycobacterium tuberculosis* in patients with cavitary tuberculosis in the course of chemotherapy. Tubercle 1987; 68: 243-253.
7. Kubica G P, Gross W M, Hawkins J E, Sommers H M, Vestal A L, Wayne L G. Laboratory services for mycobacterial diseases. Am Rev Respir Dis 1975; 112: 773-787.
8. Kubica G P, Pool G L. Studies on the catalase activity of acid-fast bacilli. I. An attempt to subgroup these organisms on the basis of their catalase activities at different temperatures and pH. Am Rev Respir Dis 1960; 81: 387-391.
9. Kudoh S, Kudoh T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. Bull World Health Organ 1974; 51: 71-82.
10. Laszlo A, Eidus L. Test for differentiation of *M. tuberculosis* and *M. bovis* from other mycobacteria. Can J Microbiol 1978; 24: 754-756.
11. Laszlo A, Rahman M, Espinal M, Raviglione M. Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory Network: five rounds of proficiency testing, 1994-1998. Int J Tuberc Lung Dis 2002; 6: 748-756.
12. Marks J. A simple method for the cultivation of tubercle bacilli. Monthly Bull Min Health PHLS 1959; 18: 81-86.
13. Marks J. A system for the examination of tubercle bacilli and other mycobacteria. Tubercle 1976; 57: 207-225.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard. Wayne, PA: NCCLS 2003; 23 (No 18): 1-71.
15. Ogawa T, Saito N, Sawai T, Nakajima K, Toyama K, Honda A, et al. The comparative studies between NaOH method and neutralization method for isolation of tubercle bacilli. Kitasato Arch Exp Med 1960; 23: 9-24.
16. Paramasivan C N, Narayana A S L, Prabhakar R, Rajagopal M S, Somasundaram P R, Tripathy S P. Effect of storage of sputum specimens at room temperature on smear and culture results. Tubercle 1983; 64: 119-124.
17. Petroff S A. A new and rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and feces. J Exp Med 1915; 21: 38-42.
18. Stonebrink B. Tubercle bacilli and pyruvic acid. The Hague Proc Tub Res Council, 1957; 44: 67-74.
19. World Health Organization. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Antituberculosis drug resistance in the world. Report No. 3. WHO/CDS/TB/2004.343: 1-129. Geneva, Switzerland: WHO, 2004.
20. World Health Organization, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis, 1997. WHO/TB/96.216: 1-36. Geneva, Switzerland: WHO, 1997.

CHAPITRE V

Moyens, produits, équipement et environnement physique du réseau national de laboratoires de la tuberculose

A. Configuration du laboratoire périphérique de microscopie

La disposition détaillée du laboratoire périphérique varie très largement en fonction de :

- 1) l'exécution ou non d'activités autres que la microscopie de la tuberculose,
- 2) la taille et la forme des locaux disponibles,
- 3) l'utilisation de l'électricité ou de la lumière du jour pour l'examen microscopique.

A titre d'exemple, le laboratoire peut être disposé de manière à comporter trois secteurs séparés (Annexe 11) :

- une zone bien éclairée pour la préparation et la coloration des frottis,
- une zone bien éclairée pour les examens microscopiques,
- une zone pour l'enregistrement et le stockage.

Le laboratoire à activités multiples (incluant la mycobactériologie) devrait comporter au moins un évier et trois paillasses ou tables :

- une table pour préparer les frottis,
- un évier pour colorer les frottis,
- une table pour examiner les frottis,
- une table pour l'administration.

Des chaises ou de préférence des sièges ajustables sont également nécessaires. Le Tableau V.1 reprend la liste d'une partie de l'équipement nécessaire au laboratoire périphérique.

Une bonne ventilation est essentielle pour la protection du personnel contre les gouttelettes infectantes. La meilleure technique est l'utilisation des fenêtres et des portes afin de créer un courant aérien direct vers l'environnement extérieur (et non l'inverse). Pour une ventilation correcte dans des locaux sans fenêtres, il est nécessaire d'utiliser un extracteur d'air.

Le laboratoire doit également avoir accès à un incinérateur de technologie locale pour l'élimination sans risque des produits contaminés.

Tableau V.I Equipement nécessaire dans un laboratoire périphérique

Item	Unités	Coûts en Euro	
		Unité	Total
Microscopes binoculaires, électriques/à miroir, objectifs de réserve, lampes	1	800	800
Evier avec évacuation ou bassine en plastique	1	Variations locales	
Robinet à eau ou grand seau avec couvercle	1	Variations locales	
Tambour pour incinération des déchets avec couvercle et serrure	1	Variations locales	
Statif en métal pour la coloration	1	Variations locales	
Statif de séchage, en bois	1	Variations locales	
Lampe à alcool, en métal	1	20	20
Boîtes de conservation des lames	5	4	20
Bouteille de réactif 1L, en Winchester résistant, de couleur ambre	4	15	60
Bouteille pour colorant, 250 ml, en plastique, avec gicleur	3	4	12
Bouteille compte-gouttes pour l'huile, en plastique	1	2	2
Bécher, 1 litre, en plastique, avec poignée pour le rinçage	1	10	10
Petit entonnoir, en plastique	3	<1	2
Petite table	3	Variations locales	
Chaise	1	Variations locales	
Chaise de laboratoire	2	Variations locales	
Rayonnage pour les bouteilles	1	Variations locales	
Armoire pour le microscope	1	Variations locales	

B. Configuration du laboratoire national de référence de la tuberculose

1. Situation du laboratoire

La décision concernant la situation du laboratoire sera prise au niveau le plus élevé des autorités de santé publique du pays, en consultation avec le programme national de lutte contre la tuberculose. Beaucoup d'éléments doivent être pris en compte. Les services nationaux sont fréquemment situés dans la capitale du pays où l'infrastructure nécessaire à leur bon fonctionnement est la plus adéquate.

D'un point de vue organisationnel, il est important que le laboratoire soit sous le contrôle administratif de l'administration de la santé publique. Il est habituellement commode qu'il soit localisé à proximité immédiate d'autres institutions, souvent à côté d'autres laboratoires de santé publique.

L'infrastructure physique comme les routes, la distribution d'eau, les égouts, l'électricité et si possible le gaz devrait être disponible. Ces derniers services peuvent provenir des installations intérieures du bâtiment. Dans beaucoup de pays, il est nécessaire de disposer d'un générateur de courant électrique pour les urgences. De plus, l'utilisation de bouteilles de gaz (on recommande le butane) est correcte et le bâtiment devrait disposer de sa propre réserve d'eau ou d'un équipement de purification de l'eau.

Lorsqu'un bâtiment déterminé a été sélectionné pour le laboratoire, un architecte devrait évaluer s'il convient. Il est important de déterminer la taille du terrain par rapport aux exigences d'espace déterminées à l'avance. D'autres paramètres, comme le sol, l'accessibilité, la vue, le bruit du trafic, l'exposition au soleil, le vent et les poussières de l'air auront aussi leur influence sur la configuration du bâtiment.

Si l'endroit ne convenait pas à l'objectif visé, il faudrait sélectionner un autre lieu avant de commencer les plans. Une fois le site définitif identifié, il faut obtenir des autorités l'assurance que toutes les charges concernant la parcelle sont bien précisées (propriété, conflits à l'égard d'autres constructeurs possibles, limitations techniques, etc.) et que le choix du site ne risque pas d'être modifié après le début de l'élaboration des plans. De telles modifications ne sont pas rares et peuvent entraîner des délais ainsi que des conflits en matière de responsabilité pour les coûts additionnels encourus.

2. Critères pour la planification des espaces

On trouve au Tableau V.2 les locaux nécessaires et les dimensions du laboratoire de référence avec une brève explication de l'affectation de chaque pièce. L'évaluation des dimensions doit être considérée comme approximative et varie en fonction de la forme, de l'ameublement et de l'équipement du local. Les dimensions indiquées représentent les exigences minimales.

Les fonctions ne devraient pas être réparties sur plus de deux étages et toutes les fonctions techniques seront au même niveau.

Tableau V.2 Critères de planification des espaces

Fonctions techniques du laboratoire		
Description de la zone	m²	Travail effectué dans la zone
Réception des échantillons	8	Déballage et enregistrement des échantillons
Secteur de préparation des milieux	12	Production des milieux et de l'eau distillée
Secteur de stockage	15	Entreposage de la verrerie, du matériel à usage unique, etc.
Chambre d'entreposage du gaz	3	Entreposage des bouteilles de gaz (exige un accès depuis l'extérieur)
Secteur de microscopie	25	Microscopie à fond clair
Secteur de traitement des cultures	30	Tests d'identification et de sensibilité aux médicaments
Secteur de stérilisation	12	Nettoyage et stérilisation du matériel
Local pour microscopie à fluorescence	4	Chambre noire pour l'examen microscopique par fluorescence
Chambre froide (4°C)	6	Entreposage des produits chimiques et des milieux de culture dans une chambre froide ou dans des réfrigérateurs
Chambre d'incubation (37°C)	8	Chambre pour incubation
Fonctions administratives		
Secrétariat	20	Conservation des rapports pour les fonctions administratives générales
Salle de conférence	25	Réunions, pauses, cafétéria, cours de formation
Bureau du directeur	12	Bureau du Chef du Laboratoire de Référence
Archives	12	
Local de stockage	12	
Sanitaires	10	Sanitaires et douches pour les employés hommes
Sanitaires	10	Sanitaires et douches pour les employés femmes

3. Relations de planification des espaces

Au Tableau V.3, on trouve la proximité/les relations entre les diverses fonctions au sein du bâtiment. Il n'est pas nécessaire de se préoccuper trop des détails précis du plan du local/espace. La description des fonctions doit être considérée comme « une zone attribuée à une fonction ou une affectation spécifique », et pas nécessairement comme un espace confiné dans des murs et fermé par une porte. Les fonctions en relation entre elles doivent se situer de préférence à l'intérieur des quatre mêmes murs. Toutefois, un certain nombre de fonctions doivent être totalement isolées des autres, par exemple le secteur de préparation des milieux pour lequel existent des critères spécifiques de propreté ainsi que la chambre noire pour la microscopie à fluorescence.

Le laboratoire de référence de Dakar au Sénégal, schématisé à l'Annexe 12, a été conçu pour prendre en compte le fait que toutes les fonctions de laboratoire constituent un espace unique dans lequel les employés peuvent se déplacer entre les diverses parties du laboratoire sans avoir à passer par des portes. Ainsi les personnels travaillant dans les diverses parties du laboratoire peuvent se voir et communiquer les uns avec les autres. On assure l'hygiène grâce à des procédures opératoires standard ; c'est l'application de ces procédures qui détermine l'existence ou non d'un risque de contamination.

Les installations du laboratoire assurent une sub-division du laboratoire permettant l'attribution des espaces aux diverses fonctions. Toutefois, l'ameublement et l'équipement sont généraux et si certaines fonctions ou activités exigent à certains moments des espaces plus importants que ceux attribués initialement, elles doivent pouvoir s'étendre à l'intérieur des quatre mêmes murs. Ceci facilite une grande flexibilité et la possibilité de contacts immédiats entre collègues.

Les fonctions annexes du laboratoire sont situées dans une pièce voisine avec accès direct à partir du laboratoire. Il n'est donc pas nécessaire qu'il y ait un couloir, plus courtes sont les distances et moindres sont les coûts de construction. Le secteur de stérilisation a un accès direct à la chambre de stockage. De cette manière, tout le matériel peut être lavé et/ou stérilisé en passant de la chambre de stockage vers le laboratoire. Un second autoclave est très utile à proximité immédiate du cabinet biologique de sécurité, afin de réduire les risques de dispersion accidentelle. Le secteur de préparation des milieux est séparé vu les exigences de propreté. En connexion avec cette pièce, il y a une chambre de stockage contenant les réfrigérateurs et un congélateur pour la conservation des produits chimiques et autres pro-

duits. Cette pièce pourrait être transformée en une chambre froide à 4°C. Si l'on choisit de construire une chambre froide, on doit prendre les mesures nécessaires pour prévenir la condensation à l'intérieur des murs, particulièrement dans les climats chauds et humides. On ne devrait utiliser que des chambres froides préfabriquées placées à l'intérieur et indépendantes des murs de structure. Une chambre froide exige également la disponibilité de services rapides de réparation. Plusieurs réfrigérateurs devraient être disponibles pour fournir une capacité utile de réserve en cas de nécessité.

Tableau V.3 Proximité/rerelations entre les diverses fonctions du bâtiment

	Réception des échantillons	Examens microscopiques	Culture	Stérilisation	Préparation des milieux	Microscopie à fluorescence	Chambre froide	Chambre d'incubation	Entreposage du gaz	Magasin / Stockage
Réception des échantillons		AD	SD		SD					
Secteur de microscopie	AD		AD	PR		AD		PR		PR
Secteur d'exécution des cultures	SD	AD		AD	AD	AD	PR	AD	PR	PR
Secteur de stérilisation		PR	AD		AD			PR	AD	PR
Secteur de préparation des milieux	SD		AD	AD			AD		PR	PR
Local pour microscopie à fluorescence		AD	AD							
Chambre froide 4°C			PR		AD					
Incubateur 37°C		PR	AD	PR						
Local de stockage			PR	AD	PR					
Local d'entreposage du gaz		PR	PR	PR	PR					

AD = accès direct ; PR = à proximité ; SD = séparé de.

Le point faible du plan repris à l'Annexe 12 est que pour accéder à la chambre froide, on doit traverser le secteur de préparation des milieux. Dans ce cas particulier, le secteur de préparation des milieux a été séparé des autres pièces. Ce secteur peut également servir de local de stockage pour la verrerie et d'autres items stérilisés. Une fenêtre le reliant au secteur de stérilisation est commode pour le transfert d'éléments après stérilisation. La pièce principale de réserve adjacente au secteur de stérilisation est utilisée pour le matériel non stérile et pour le matériel stérile emballé provenant de fournisseurs externes. Les éléments qui nécessitent d'être stérilisés avant usage passent par le secteur de stérilisation. Les éléments stérilisés sont déballés au laboratoire.

Lorsque les conditions de structure le permettent, il est conseillé d'utiliser des panneaux solides mais transparents pour la partie supérieure des murs ou pour les séparations entre les pièces. Cela permet une meilleure visibilité entre travailleurs ainsi qu'une surveillance des activités, y compris celle des accidents qui peuvent exiger une intervention immédiate.

Le laboratoire peut également disposer d'un local de stockage (ou d'une chambre de réserve supplémentaire) disponible pour des extensions futures. Il peut également être utile de disposer d'un débarras pour seaux et balais pour faciliter le nettoyage tout en évitant que le matériel de nettoyage du laboratoire ne soit utilisé dans d'autres parties du bâtiment. A l'entrée du laboratoire, il faut prévoir l'espace d'un petit local pour permettre au personnel de changer de vêtements et de se laver à l'entrée et à la sortie ; il y a lieu de prévoir un lavabo, un sèche-mains et une armoire.

4. Ventilation

Pour limiter les problèmes dus à une température ambiante élevée, le laboratoire de Dakar a été conçu de telle sorte que les pièces auxiliaires telles que les chambres de stockage, etc., soient en saillie sur la façade et n'aient que de petites fenêtres, alors que toutes les salles de travail et celles dans lesquelles se situe le personnel ont été dessinées dans le corps du bâtiment et sont munies de grandes fenêtres. Cela donne de l'ombre aux surfaces vitrées ; lorsque les fenêtres sont exposées à la lumière solaire directe, les locaux s'échauffent et deviennent inconfortables. Une construction à double paroi (paroi externe plus plafonnage) fournit un espace de ventilation et pour cette raison prévient la surchauffe. On a néanmoins installé l'air conditionné pour qu'un confort maximum soit offert au personnel ; cela représente un coût additionnel auquel on peut toutefois renoncer si l'on n'en a pas les moyens. Dans un laboratoire complètement climatisé, il faut veiller à ce que le courant d'air circule des zones propres vers les zones contaminées.

Un environnement optimal est obtenu par un système équilibré de ventilation qui fournit aux zones propres de l'air frais venant de l'extérieur et qui assure l'extraction d'un même volume à partir des cabinets de sécurité (ou d'autres zones contaminées du laboratoire). Cela crée un flux directionnel constant d'air depuis la zone propre vers la zone contaminée.

Cette solution technique sophistiquée est toutefois difficile à réaliser dans beaucoup de pays. Elle exige un fonctionnement continu des cabinets de sécurité ; dans les climats chauds, le refroidissement d'un courant constant d'air frais provenant de l'extérieur est coûteux. A l'inverse, dans les climats froids, le chauffage de l'air peut représenter une dépense importante. Un système comportant une filtration de l'air contaminé au travers d'un cabinet de sécurité avec un système de recyclage peut être une bonne solution économique, mais augmente le risque de contamination de l'atmosphère du laboratoire. Donc l'air du cabinet de sécurité biologique devrait être évacué de préférence par le toit. Si le refroidissement est nécessaire, les ventilateurs des conditionneurs d'air devraient être situés de telle sorte que le courant d'air n'agisse pas sur les zones sensibles de travail comme les cabinets de sécurité. Il peut être commode de suspendre au plafond, au-dessus des autoclaves, des hottes d'évacuation en verre ou en acier pour recueillir la vapeur et les odeurs lors de l'ouverture des autoclaves.

5. Exigences d'installation et d'équipement

Très tôt, l'architecte doit avoir une vue générale de l'équipement que le bâtiment abritera et savoir dans quelle mesure cet équipement exige un approvisionnement en eau ainsi que l'installation d'évacuations et d'électricité. Comme certains équipements sont encombrants (par exemple, les cabinets de sécurité biologique, les autoclaves, etc.), il faut informer l'architecte des dimensions de l'ensemble de l'équipement pour qu'il puisse trouver leur place dans le bâtiment. On prendra contact avec les fournisseurs pour obtenir en temps utile les dimensions, les exigences en matière de courant et autres spécifications importantes.

Il y a lieu de donner la préférence aux fournisseurs dont les représentations locales peuvent assurer les services de maintenance, avant d'acheter un équipement, il faut vérifier que cela est prévu.

Le Tableau V.4 donne une vue générale des précautions de construction à prendre pour faciliter l'installation de l'équipement nécessaire dans les secteurs les plus importants du laboratoire.

Tableau V.4 Exigences techniques minimales au laboratoire de référence

Secteur	Exigences techniques minimales
Réception des échantillons	Paillasse de laboratoire, eau courante, évier, plusieurs prises 220V monophasiques
Secteur de microscopie	Paillasse de laboratoire, eau courante, évier, plusieurs prises 220V monophasiques, gaz-butane
Secteur de cultures	Paillasse de laboratoire, eau courante, évier, plusieurs prises 220V monophasiques, gaz-butane
Secteur de stérilisation	Paillasse de laboratoire, eau courante, grand évier double, planche d'évacuation, plusieurs prises 220V monophasiques, 380V tri phasiques (autoclave), gaz-butane
Secteur de préparation des milieux	Paillasse de laboratoire, eau courante, évier, plusieurs prises 220V monophasiques, surface pour l'étuve
Local pour microscopie à fluorescence	Possibilité d'éteindre la lumière, paillasse de laboratoire, prise 220V monophasique
Chambre froide (+ 4°C)	Plusieurs prises 220V monophasiques pour réfrigérateurs ou chambre isolée avec indicateur de température, rayonnages
Chambre d'incubation (+ 37°C)	Contrôle de la température, lecteur et enregistrement de la température à l'extérieur, rayonnages
Secteur de stockage	Rayonnages
Local de réserve de gaz	Accessible de l'extérieur

C. Construction du laboratoire national de référence de la tuberculose

1. Collaboration avec les autorités publiques

Il est important que le laboratoire de référence soit sous le contrôle administratif des autorités nationales de santé publique qui seront responsables du projet. Il faut établir les contacts au niveau le plus élevé possible de l'administration. Un responsable senior des services de santé assura la liaison avec le directeur des services publics pour permettre la poursuite du projet au cas où des problèmes majeurs surviendraient.

Il est important que les autorités politiques responsables de la santé publique comprennent dès le début la nécessité d'un laboratoire de référence et que toutes les personnes impliquées aient discuté et accepté les tâches à exécuter par un tel laboratoire. Il faut être conscient également que la fixation des prémices fondamentales pour le laboratoire pourrait être l'occasion de rivalités professionnelles. Dans ce contexte, les objectifs fondamentaux du laboratoire de référence ne devraient pas être perdus de vue.

Lorsqu'une localisation spécifique a été attribuée au projet et avant que le planning détaillé ne commence, il faudrait obtenir l'assurance écrite des plus hautes autorités que le site a bien été retenu pour cet objectif et que cette décision ne sera pas modifiée après le début de la construction.

De même, les règlements concernés en matière de droits d'entrée, de taxes et d'autres droits doivent être clairement compris. Si le projet est exempt de ce genre de charges, il est important que ce soit confirmé par écrit. Les mêmes règles s'appliquent pour l'importation d'équipements techniques venant de l'extérieur du pays. S'il y a un accord d'exemption de taxes avec adoption de méthodes alternatives de paiement des taxes (par exemple par des transferts de fonds interdépartementaux) le mécanisme et les responsabilités d'exécution doivent être clairement précisés. Il est souvent plus simple et plus efficient d'inclure les taxes dans le budget initial.

2. Constitution de l'équipe du projet

La constitution de l'équipe du projet est un facteur décisif pour son organisation, qu'il s'agisse d'un projet purement national ou d'un projet comportant l'apport d'un donateur extérieur. Il est néanmoins difficile de donner des directives générales pour l'organisation et la composition de l'équipe du projet. Elles dépendent des conditions locales spécifiques. De toute manière, on doit savoir clairement quels experts seront engagés localement et quels sont ceux qui viendront de l'extérieur. Dans certains cas, l'implication d'une ou de plusieurs organisations internationales est également utile. Lorsqu'il s'agit d'un projet bénéficiant du soutien d'un bailleur extérieur, l'avis d'un expert en construction du pays donateur peut être profitable au projet.

Dans le cas du laboratoire de référence de Dakar, c'est un architecte du pays donateur qui a dressé les plans de construction en collaboration avec les experts de l'Union. Des avis complémentaires d'experts ont été donnés par les autorités sénégalaises ainsi que par des compagnies privées locales. Cela a bien fonctionné, mais une fois de plus, il est important d'insister sur la nécessité de prendre en considération les données du cadre du projet.

Le superviseur local, qui est une personne techniquement compétente (architecte, ingénieur ou travailleur expérimenté dans la construction), payé par le promoteur est un élément-clé de la phase de construction. Le superviseur de la construction surveillera l'ensemble du travail et s'assurera que le bâtiment correspond bien aux plans.

3. Description du projet

L'élaboration des différents documents devrait commencer par la consultation de constructeurs professionnels locaux au sujet des documents habituellement exigés. Ceux-ci comportent les plans de construction, les descriptions techniques et le métrage. L'étendue de la documentation dépend considérablement de la forme du contrat et de la stratégie d'entreprise choisie. Que l'on choisisse de soumettre le projet à une offre ouverte ou fermée, que l'on exige des prix ou d'autres modèles, les exigences habituelles concernant les documents sont en règle générale les suivantes :

Plan de situation	Echelle 1:200
Description des sols	Echelle 1:50 (1:100)
Sections transversales	Echelle 1:50 (1:100)
Elévations	Echelle 1:50 (1:100)
Détails importants	Echelle 1:20 (ou autre échelle adaptée)

Il est important que l'échelle ne soit pas trop petite, surtout lorsque le suivi est sporadique. La règle générale est que plus grand est l'éloignement géographique et culturel entre ceux qui élaborent les plans et le site de construction, et plus détaillés doivent être les croquis et les descriptions.

La description technique sera détaillée et les différentes étapes du processus de construction décrites par écrit. Pour ce qui concerne les estimations préliminaires des prix et le contrat lui-même, il est important d'utiliser des montants quantifiables pour chaque aspect de la construction ou de l'approvisionnement. Une feuille de calcul constitue un excellent outil de base pour la description technique. Elle facilite la relation entre quantités et items ainsi que les calculs. Naturellement, des programmes spécifiques existent pour l'élaboration des descriptions techniques, mais ceux-ci reposent souvent sur des standards nationaux et ne sont pas universels.

Il est essentiel que le constructeur discute en détail sur le terrain du contenu du projet avec le directeur local de la construction et avec le contremaître de la construction pour que les deux parties se mettent d'accord sur ce qui a été spécifié et prévenir ainsi les malentendus.

4. Soumission et contrat

Il est nécessaire de choisir la forme de contrat et la stratégie d'entreprise en coopération avec les experts locaux de la construction. Dans les pays à économie de marché, soit une soumission ouverte est utilisée - annoncée publiquement et les sociétés déclarent leur intérêt, soit la compétition est fermée et les soumissions sont sollicitées auprès de certaines entreprises sélectionnées. Dans les pays sans économie de marché, le contrat peut être passé avec une entreprise réputée, en se mettant d'accord sur un prix pour les tâches spécifiées. Dans certains pays, les autorités ont leurs propres organisations publiques ou parastatales qui exécutent des opérations de construction de ce genre. Dans de tels cas, les coûts sont souvent moins importants. Toutefois, il est néanmoins nécessaire d'incorporer dans le contrat les diverses exigences concernant la qualité et l'avancement du projet comme dans le cas de négociations avec les entrepreneurs privés.

Il est important de contrôler les justificatifs écrits de l'entrepreneur avant de signer le contrat. Ceci s'applique à la fois à sa fiabilité financière et à la qualité technique de la construction. C'est particulièrement important pour les offres ouvertes. Pour autant qu'il s'agisse de demandes de prix, des personnes expérimentées connaissant de près la situation locale devraient dresser la liste des entreprises invitées à participer.

Une planification obligatoire concernant les délais d'exécution attendus sera élaborée avant la signature du contrat. Des exigences claires concernant les délais et la responsabilité qui incombent à chacun des participants seront décrites avec précision. Les écarts à l'égard des plans d'exécution acceptés feront l'objet d'amendes quotidiennes spécifiées. L'exécution sera liée non seulement à une date finale d'achèvement, mais aussi à des étapes clairement définies en cours d'exécution.

Les paiements dus pour le travail ne devraient à aucun moment excéder 85% de la valeur du travail exécuté. Comme alternative, l'entrepreneur peut présenter une garantie bancaire d'un montant équivalent.

5. Gestion du projet

On a déjà insisté sur l'importance du choix d'un entrepreneur en construction local et bien informé, mais une communication franche entre cette personne et le directeur de construction du projet est elle aussi importante. Pour le suivi de l'exécution, on rédige des rapports écrits réguliers sur tout ce qui a été achevé pendant la période ; le niveau d'achèvement est précisé sous forme de pourcentage. Les rapports seront complétés par des photo-

graphies prises au moins une fois par mois. Il est également conseillé que le directeur de construction du projet fasse plusieurs inspections pendant la période de construction. Des contacts téléphoniques directs informels avec le directeur de construction/projet peuvent également être très utiles.

Des réunions de toutes les parties impliquées dans le projet doivent être tenues tous les 15 jours afin de vérifier l'avancement sur le site de la construction et de discuter les problèmes. Il est important que les minutes de ces réunions comportent des conclusions et que des copies soient distribuées à toutes les parties.

Le constructeur local conservera un registre simple et signé des paiements faits au fur et à mesure de l'avancement de la construction. Ceci sera suivi par des rapports périodiques.

Les décisions importantes ou les problèmes majeurs seront immédiatement soumis au directeur de construction du projet.

Tout travail complémentaire ou toute modification seront exposés au constructeur avant commande et un accord préalable sera conclu sur les prix.

6. Achèvement et réception

Lorsque la date de réception approche, l'entrepreneur organisera en temps utile le processus de réception. Il faut organiser une réception provisoire au cours de laquelle tous les défauts et erreurs sont signalés et enregistrés. Ensuite, on se met d'accord sur une date limite pour la correction des défauts (par exemple une quinzaine de jours). Puis la réception définitive du bâtiment a lieu à condition qu'on ait corrigé toutes les erreurs et insuffisances. Il est important que le bâtiment ne soit pas utilisé avant la réception officielle. Les défauts auxquels pour une raison quelconque il ne peut être porté remède feront l'objet d'une compensation financière.

Le constructeur prendra une assurance sur le bâtiment à partir de la date de la prise de possession.

Dans le contrat avec l'entrepreneur, il y a lieu d'inclure une période de garantie si les lois du pays ne la prévoient pas d'office. Une telle période de garantie devrait être au minimum d'un an.

Alors que les coûts de construction varient considérablement d'un pays à l'autre, le Tableau V.5 donne une idée de l'importance des coûts pour un laboratoire de référence indépendant et deux bâtiments administratifs construits à Dakar, Sénégal en 1994. Les coûts pour le seul laboratoire peuvent être estimés à environ 33% des prix mentionnés dans le tableau.

Tableau V.5 Coûts de construction du laboratoire de référence et de deux bâtiments administratifs à Dakar, Sénégal en 1994. Les coûts du laboratoire à lui seul sont estimés à environ un tiers du coût total

Catégorie de travail	Euro	Euro/m²
Travail de construction	147.500	218
Chambre d'incubation	5.430	
Installations électriques	65.200	97
Installations de conditionnement d'air et de refroidissement	15.500	
Sanitaires et plomberie	4.660	7
Travaux externes : clôtures, portes et murs	12.420	
Travaux externes : routes, aires en dur, services	63.630	
Connexions téléphoniques et électriques	5.660	
Ingénierie structurale	10.090	15
Coût global	330.090	487

D. Gestion des fournitures pour l'examen microscopique des frottis de crachats en périphérie

Le laboratoire national de référence de la tuberculose doit coopérer étroitement avec la gestion du programme national, notamment en fournissant des données pour permettre un approvisionnement en consommables régulier et sans rupture des laboratoires périphériques. Les fournitures provenant de l'étranger sont habituellement envoyées par mer après que la commande ait été acceptée, rassemblée et préparée pour l'expédition. Le temps entre l'envoi d'une commande et la réception des produits peut être supérieur à 6 mois ; il faut s'en souvenir quand on passe les commandes. Il faut être sûr que non seulement les besoins courants seront couverts mais aussi qu'une réserve suffisante sera toujours disponible à tous les niveaux.

En plus du matériel de laboratoire pour les services périphériques de microscopie, le laboratoire national de référence de la tuberculose a besoin de produits spécifiques pour la culture et les tests de sensibilité aux médicaments. Pour ces éléments, en particulier, il faut souvent l'intervention d'un expert pour préciser les spécifications correctes.

1. Fournitures pour l'examen microscopique des frottis de crachats en périphérie

Pour disposer d'un flux continu de matériel, les programmes doivent budgéter rationnellement leurs besoins. Sauf lorsque les données sur le nombre d'examens de frottis de crachats pratiqués sont complètes et disponibles, la seule base quantifiable pour la détermination des besoins est le nombre de patients. Le système d'enregistrement et les rapports doivent fournir cette information en temps utile.

Si des données récentes sur le nombre d'examens de frottis de crachats à la recherche de BAAR sont disponibles, on les utilisera directement comme base de calcul pour les besoins. Sinon, l'évaluation des produits nécessaires reposera sur les données empiriques de proportion de cas trouvés parmi les suspects de tuberculose. Cette proportion peut varier considérablement de pays à pays ; on la calcule assez facilement à partir des Registres du laboratoire de tuberculose. Si cette proportion n'est pas connue, l'Union recommande de l'estimer par approximation à 15%. Des études au Bénin (32%), au Malawi (17%), au Nicaragua (5%), au Sénégal (19%) et en Tanzanie (19%) montrent que la règle d'approximation proposée doit être utilisée avec prudence car elle pourrait sous-estimer sérieusement les besoins, par exemple au Nicaragua.

Pour donner un exemple des procédés de calcul des besoins en matériels et en réactifs de laboratoire, on supposera que la proportion des cas à bacilloscopie positive des frottis de crachats parmi les suspects de tuberculose examinés au laboratoire de microscopie est de 15%. On suppose aussi que chaque suspect exige trois examens de crachats et que chaque cas parmi eux doit avoir en plus trois examens de suivi au cours du traitement. Le nombre de lames qu'il faut examiner par cas à bacilloscopie positive des frottis de crachats est donc de $(1/0,15) \times 3 + 3 = 23$ lames. La quantité de matériel et de réactifs nécessaires pour chaque cas déclaré de tuberculose à bacilloscopie positive est donc égale à la quantité de matériel requis pour une lame multipliée par 23. Les besoins en équipement comme les microscopes, les lampes à alcool, les manches pour anses en fil métallique ainsi que le fil métallique et les boîtes à lames sont mieux estimés en faisant le décompte du nombre de centres de microscopie fonctionnels, en considérant leur durée de vie et le fait qu'ils sont également utilisés pour d'autres objectifs. Pour la même raison, la quantité d'huile à immersion de bonne qualité à commander devrait être deux à trois fois supérieure à celle qui est strictement nécessaire pour la tuberculose. Cela permettra d'utiliser toujours une huile de bonne qualité pour les microscopes du programme tuberculose et prolongera leur durée de vie. Il faut

insister à nouveau ici sur le fait que les bâtonnets applicateurs en bois ou de préférence en bambou disponibles localement sont préférables aux anses avec boucle en fil métallique.

Dans l'exemple ci-dessus, pour chaque cas déclaré à bacilloscopie positive, il faut commander 23 lames et 23 crachoirs. La quantité de fuchsine basique, de bleu de méthylène, de méthanol et de phénol sera calculée à partir de la quantité effectivement utilisée dans la méthode de coloration, en supposant que 5 ml de chacune des diverses solutions sont nécessaires pour chaque lame. Pour l'acide sulfurique et l'alcool, une pureté de niveau technique est suffisante ; toutefois, la fuchsine basique et le phénol doivent être de qualité supérieure.

Pour les laboratoires très périphériques, il est plus efficient de demander un simple rapport sur le stock et le nombre de frottis réalisés. Cette information peut être utilisée par les responsables de l'envoi des produits pour calculer les quantités nécessaires en utilisant une feuille standard de calcul. Si ces calculs sont faits par ceux qui demandent les fournitures, ils devront de toute manière être contrôlés par ceux qui envoient les produits, car les formulaires de réquisition comportant des calculs sont fréquemment mal remplis. Annexe 3, on trouvera un formulaire de rapport pour les laboratoires périphériques incluant en plus du nombre de lames examinées, les quantités de colorants prêts à l'emploi et d'autres éléments essentiels à avoir en stock. Au niveau intermédiaire, où les colorants sont préparés, il faut disposer d'un formulaire de réquisition plus élaboré indiquant les différents produits chimiques nécessaires à la préparation des colorants. Un exemple de formulaire de réquisition de fournitures par le niveau intermédiaire est fourni en Annexe 13. Il est préférable d'utiliser ce formulaire sous forme d'une feuille de calcul standard d'ordinateur préparée et distribuée par le programme national. Pour garantir des stocks de réserve à tous les niveaux, il est important de n'inscrire comme stock restant que les quantités comptées physiquement dans la réserve du niveau régional, sans y ajouter les quantités déclarées comme stocks à des niveaux plus périphériques.

E. Approvisionnement du laboratoire national de référence de la tuberculose

Le laboratoire de référence peut être considéré comme étant constitué de cinq secteurs principaux. Ces secteurs ne doivent pas nécessairement être physiquement séparés dans des locaux distincts, mais la planification des tâches du laboratoire de référence devrait être basée sur ce concept.

Le laboratoire de référence ne peut fonctionner que s'il dispose d'un minimum d'équipements. On trouvera au Tableau V.6 une liste complète des exigences minimales d'équipement et leur coût approximatif.

1. Secteur des examens microscopiques

On disposera d'au moins trois microscopes binoculaires pour examen microscopique à fond clair. Ils doivent être de la même marque que ceux utilisés dans le réseau national des laboratoires de microscopie. Cela est important pour familiariser les stagiaires avec l'équipement qu'ils utiliseront sur le terrain et pour permettre aux techniciens du laboratoire de référence d'être habitués à cet équipement. Sur le plan psychologique, il est également important que les étudiants se rendent compte que le laboratoire national utilise le même équipement que n'importe quel autre laboratoire.

Les microscopes d'enseignement avec bras latéraux ont une utilité limitée. Ils ne sont pas nécessaires pour montrer des BAAR sur une lame fortement positive, technique moins consommatrice de temps que l'utilisation d'un mélange de lames positives et négatives.

Une méthode pratique consiste à exiger la confirmation immédiate par l'enseignant de tout échantillon positif identifié par le stagiaire et la vérification des résultats négatifs en recourant à une liste de résultats connus. On disposera également d'un microscope à fluorescence pour examiner de manière efficace de grands nombres de lames provenant des demandes de routine au laboratoire.

2. Secteur de préparation des milieux

Pour réduire les risques de contamination des milieux, ceux-ci peuvent être préparés dans un poste de travail à flux laminaire (qui n'est pas un cabinet de sécurité biologique pour la protection de l'opérateur).

On peut employer un mixer pour homogénéiser la base de milieu comportant les œufs complets mais en raison de la production de bulles et de mousse, il est plus pratique de préparer le mélange en l'agitant avec de grosses billes de verre ou de marbre.

Une balance électronique chargée par le haut (capacité 300 g, sensibilité 1 mg) est nécessaire pour peser les produits qui sont utilisés en très petite quantité.

Un équipement en seringues pour pipetage en continu est recommandé pour répartir des quantités déterminées de milieu dans les flacons

Tableau V.6 Equipement d'un laboratoire national de référence de la tuberculose

Quoique les coûts de l'équipement varient d'un fournisseur à l'autre et au fil du temps, le tableau suivant fournit une approximation de ce qui peut devoir être dépensé dans un laboratoire national de référence de la tuberculose en matière d'investissement (tous les coûts sont en Euro).				
Secteur	Items	Unités	Coût / unité	Coût total
Microscopie	Microscope à fluorescence	1	5.714	5.714
	Microscopes d'enseignement	1	2.571	2.571
	Microscopes à fond clair	3	1.905	5.714
	Becs Bunsen, allume-gaz	3	12	37
	Etuve de séchage, 60 l	2	1.219	2.438
	Lampe à vapeur de mercure	2	114	229
Préparation des milieux	Mixer à deux vitesses	1	381	381
	Coagulateur (option)	2	3.048	6.095
	Hotte à flux laminaire	1	6.571	6.571
	Balance électronique chargée par le haut	1	286	286
	Plaque chauffante à agitation magnétique	1	286	286
	Mélangeur Vortex	1	190	190
	Distillateur d'eau, 8 l/heure	1	3.810	3.810
	Seringues à pipeter	5	194	969
	Tubes-siphons avec collier de serrage pour répartir les milieux	3	5	14
Entreposage	Congélateur (2.0 m*0.6 m*0.6 m)	2	3.619	7.238
	Réfrigérateur à 3 portes	1	2.571	2.571
	Plateau pour bouteilles de McCartney	20	29	571
	Plateau pour containers universels	30	29	857
	Table bien rangée pour anses métalliques et marqueurs	3	50	150
	Dessiccateur	2	139	278
	Thermomètres	2	5	10
Traitement des cultures	Cabinet biologique de sécurité classe IIB, type B, Filtres HEPA de rechange, débitmètres	2	10.476	20.952
	Centrifugeuse réfrigérée	2	4.762	9.524
	4 godets, chacun avec couvercle	3	12	37
	Bec Bunsen	1	171	171
	Balance à fléau, 210 g	1	1.219	1.219
	Etuve de séchage, 60 l	2	190	381
	Mélangeur Vortex	2	20	40
	Minuterie	2	190	381
	Distributeur	3	381	1.143
	Table roulante			
Stérilisation	Autoclave à charger verticalement	2	23.810	47.619
	Four	1	1.714	1.714
	Godets en acier inoxydable	10	67	667
	Boîte de pipettes	5	20	100
	Pot à déchets en acier inoxydable surmonté d'un entonnoir	4	5	19
	Mixer Vortex	1	190	190
	Machine pour brosser la verrerie	1	11.429	11.429
	Four à air chaud 110 l	1	1.181	1.181
Total			88.585	143.750

universels. Pour augmenter la durée de vie de ce type de système, il est nécessaire de le nettoyer avec un soin extrême après usage. Pour répartir le milieu, certains laboratoires utilisent des éprouvettes de large calibre, faciles à nettoyer, graduées par 5 ml avec une tubulure flexible et un collier de serrage Mohr. Si le laboratoire produit de grandes quantités de milieux, il est préférable d'utiliser un répartiteur électrique.

Une plaque chauffante avec agitateur magnétique et des barres d'agitation magnétiques de différentes tailles sont nécessaires pour la préparation des réactifs pour le milieu de culture.

Il est de loin préférable de produire l'eau distillée, essentielle pour le laboratoire, par un distillateur à eau qui produit par heure 4 à 8 litres d'eau distillée. Deux ou trois réservoirs d'eau en polyéthylène (tourilles) d'une capacité de 50 à 60 litres devraient être disponibles pour la conservation de l'eau distillée à utiliser en cas d'arrêt de la distribution d'eau ou de rupture de courant. L'eau désionisée ne sera jamais utilisée puisque les mycobactéries saprophytes ont tendance à coloniser ces installations.

Un dessiccateur pour la coagulation des milieux répartis en pente dans des flacons universels complète la liste de l'équipement nécessaire pour la production des milieux.

Au moment de la commande du coagulateur, le type de flacons de culture pour lequel il est destiné sera spécifié puisque certains modèles ne peuvent être utilisés qu'avec des flacons universels ou de McCartney et d'autres qu'avec des tubes pour cultures.

Comme alternative à un coagulateur, on peut utiliser un four à air chaud avec ventilateur comportant un contrôle précis de température, mais les lots pourraient être moins homogènes.

3. Secteur de stockage

L'équipement nécessaire comportera des réfrigérateurs, un surgélateur, des plateaux et des statifs en fil de fer. La plupart des produits chimiques sont conservés sans réfrigération, mais les milieux fraîchement préparés seront gardés au réfrigérateur et les souches à ensemercer ou les souches standard seront conservées surgelées à - 40°C au moins.

Il faudrait disposer de statifs qui conviennent pour les flacons McCartney (7 ml et 14 ml) et pour les flacons universels (28 ml).

Certains produits chimiques et agents antimicrobiens seront conservés avec des dessiccateurs, où le gel de silice est utilisé comme agent desséchant recyclable.

4. Secteur de traitement des cultures

Au laboratoire de référence, le risque de transmission des bacilles tuberculeux augmente lorsqu'on manipule des cultures de *M. tuberculosis*, particulièrement en solutions aqueuses, en fonction du potentiel d'aérosolisation de ces bacilles au cours de la manipulation. L'exécution des cultures devrait toujours se faire dans un cabinet de sécurité biologique (voir ses spécifications plus loin).

Une centrifugeuse de qualité supérieure est essentielle pour la préparation des échantillons pour culture. Les godets de la centrifugeuse devraient être du type sécurité avec couvercles individuels qui ne s'ouvrent qu'à l'intérieur du cabinet de sécurité.

Une balance mécanique à branches jumelées est nécessaire pour la pesée des ingrédients pour la préparation des milieux. Comme on utilise de grandes quantités, la balance aura une capacité d'au moins 200 g, mais une sensibilité de 0.1 g peut suffire.

Pour l'incubation des cultures, deux approches sont possibles. Une d'elles consiste à utiliser des batteries d'étuves. Cela est utile lorsque l'on souhaite différentes températures d'incubation. Puisque l'intérêt premier du laboratoire national de référence de la tuberculose est l'isolement du complexe de *M. tuberculosis*, il suffit d'incuber à une température constante de 37°C. Si l'on s'intéresse particulièrement à l'identification des mycobactéries qui se développent de façon préférentielle à des températures autres que 37°C, il faut disposer d'une étuve à basse température et d'une autre à haute température, chacune d'une capacité d'environ 200 litres. La solution la plus commode et la plus pratique pour l'incubation à température constante est d'y consacrer une chambre où des rayonnages occupent la longueur des trois murs, à distance de l'entrée, ce qui facilite énormément le travail car les cultures peuvent être déplacées aisément en fonction du nombre de semaines pendant lesquelles elles ont été incubées. Comme alternative à ces rayonnages, des tables roulantes peuvent être construites pour s'adapter à la taille des statifs dont la capacité doit être suffisante pour l'ensemble des flacons ensemencés durant une semaine ; ces tables constituent une alternative pratique pour les laboratoires à gros volume d'activité.

5. Secteur de stérilisation

Avant le nettoyage des tubes et l'évacuation des milieux, il est essentiel que les mycobactéries, les bactéries et les levures qui s'y sont développées soient détruites à l'autoclave. L'idéal est de disposer d'au moins deux

autoclaves car il s'agit d'équipement essentiel. Cela permet la stérilisation séparée du matériel « sale » et du matériel « propre ». Le matériel sale comporte les cultures de mycobactéries qui doivent être détruites. Le matériel propre comporte les réactifs et le matériel qui n'est pas fortement contaminé. On peut contrôler régulièrement l'efficacité des autoclaves en utilisant des spores qui sont passées à l'autoclave et incubées ensuite sur les milieux de cultures appropriés. Comme équipement de réserve utilisable en cas de panne de l'autoclave ou de rupture de courant, on recommande des autoclaves type grande casserole à haute pression, chauffés au dessus d'un brûleur à gaz ou à kérosène.

Une machine à broser la verrerie et des brosses appropriées facilitent grandement le travail de nettoyage de la verrerie. L'immersion dans un puissant détergent pendant trois à quatre jours est utilisée pour retirer de façon efficace le milieu de Löwenstein-Jensen des flacons universels avant de les laver.

Un four à air chaud s'avère très utile à la stérilisation de la verrerie propre.

Verrerie du laboratoire de référence

La verrerie est largement utilisée dans les laboratoires médicaux. Il est dès lors essentiel de se familiariser avec les verreries habituelles et essentielles utilisées au laboratoire national de référence de la tuberculose.

La verrerie de laboratoire, en verre borosilicaté (verre dur) est recommandée pour le travail de routine car elle résiste aux produits chimiques, à la chaleur et à des passages répétés à l'autoclave.

La verrerie est parfois disponible dans les magasins médicaux locaux, mais elle est souvent achetée à l'étranger à des entreprises de fournitures de laboratoire. Dans ces circonstances, la personne en charge de la commande des fournitures de laboratoire doit :

- planifier et commander correctement le matériel ;
- préparer des commandes régulières tous les six mois ; c'est essentiel pour maintenir la fiabilité et le fonctionnement régulier du laboratoire ;
- utiliser le numéro correct du catalogue et indiquer les spécifications et les descriptions des items commandés ;
- s'assurer que la verrerie commandée convient effectivement et qu'elle peut être utilisée dans un laboratoire de référence de la tuberculose ;
- s'assurer que le coût d'achat de ces items reste dans les limites des budgets disponibles.

On trouvera une liste résumant les verreries essentielles du laboratoire au Tableau V.7.

Tableau V.7. Verreries et matériel à usage unique recommandés, description et utilisation au laboratoire national de référence de la tuberculose

Flacons universels : ce sont des flacons en verre, très solides avec large goulot, munis d'un capuchon à vis en aluminium avec joint en caoutchouc, d'une capacité 28 ml. Ces flacons universels sont employés pour le transport des échantillons de crachats et pour la préparation des milieux.

Flacons McCartney : en verre avec un capuchon à vis muni d'un joint en caoutchouc de 3 mm, d'une capacité de 7 ml ou 14 ml. Ces flacons raffinés sont utiles pour l'homogénéisation des suspensions bactériennes et, lorsque le flacon contient du milieu de Löwenstein-Jensen, pour la conservation des cultures de mycobactéries: ils sont pratiques et peu encombrants en cas d'entreposages de longue durée.

Billes de verre : bille de verre de 3 mm en sacs de 1 kg, utiles pour l'homogénéisation des suspensions bactériennes.

Flacons Winchester : en verre, à goulot étroit, avec un capuchon à vis en aluminium muni d'un joint en caoutchouc pour les colorants et les produits chimiques, d'une capacité allant de 150 ml à 2.500 ml. Les flacons Winchester sont utilisés principalement pour les sels minéraux du Löwenstein-Jensen et pour d'autres produits chimiques; ils sont utiles pour conserver à 4°C le NaOH employé pour la décontamination des échantillons cliniques.

Bécher, en borosilicate, de qualité supérieure : béchers en verre borosilicaté de qualité supérieure avec un bec et un bord très renforcé pour utilisation générale au laboratoire.

Cylindres gradués, avec bec : verre borosilicaté, capacités graduées 10 ml à 5.200 ml pour utilisation générale au laboratoire.

Flacons, borosilicatés, de très bonne qualité : flacons de très bonne qualité, du type Erlenmeyer, avec col étroit, capacités 50 ml à 5.000 ml pour utilisation générale au laboratoire.

Flacons, volumétriques : gradués 25 ml, 100 ml, 500 ml pour utilisation générale au laboratoire.

Tubes à essai : en verre, capacité 5 à 10 ml pour réaliser les tests biochimiques d'identification. Stériles, à usage unique, capacité 10 ml pour titrer des suspensions bactériennes pour les tests de sensibilité aux médicaments.

Entonnoirs : entonnoirs pour la filtration, gradués de 50 ml à 2.000 ml ; ils sont utilisés pour filtrer les colorants comme l'auramine O, la carbol-fuchsine et le bleu de méthylène.

Pipettes, volumétriques : pipettes de 1 ml, graduées à 1/100 ml, de 5 ml graduées à 1/10 ml et de 10 ml graduées à 1/10 ml. Ces pipettes sont utiles pour titrer les solutions contenant les médicaments lors de la préparation des tests de sensibilité aux médicaments ainsi que pour l'inoculation des suspensions bacillaires.

Pipettes à usage unique : pipettes de 1 ml, en plastique, à usage unique pour la répartition des produits chimiques pour les tests biochimiques et pour l'inoculation dans les milieux de Löwenstein-Jensen. Les pipettes Eppendorf et les embouts 1 ml - 5 ml sont utiles pour titrer avec précision les solutions de médicaments antituberculeux lors de la préparation des milieux contenant les médicaments.

Tableau V.7 (suite)

Anses à usage unique : anses de 10 µl, en plastique, à usage unique pour le transfert d'échantillons, pour la réalisation des frottis et pour l'inoculation dans le milieu de Löwenstein-Jensen.

Lames pour examen microscopique : dépolies, rendues rugueuses à une extrémité sur les deux faces, 27 x 75 mm, épaisseur 1,0 mm à 1,2 mm. Emballage tropical. Alors que d'autres lames existent (et peuvent être moins coûteuses) on préfère celles-ci parce qu'on peut employer un crayon au graphite pour marquer les lames au lieu des marqueurs au diamant qui coûtent très chers. L'emballage tropical (une feuille de papier entre chaque lame) évite que les lames ne collent les unes aux autres.

Item	Conditionnement	Coût en Euros
Flacons universels	144/paquet	110
Flacons, McCartney :		
7 ml	144/paquet	101
14 ml	44/paquet	103
Billes de verre	1 kg	21
Flacons Winchester		
Béchers	1 unité	10
Cylindres	1 unité	20
Flacons, qualité supérieure	1 unité	10
Flacons volumétriques	1 unité	5
Tubes à essai	500/paquet	48
Entonnoirs	1 unité	3
Pipettes volumétriques :		
1 ml	50/paquet	16
5 ml	50/paquet	25
10 ml	50/paquet	26
Pipettes à usage unique	500/paquet	12
Anses à usage unique	4.000/paquet	63
Lames pour examen microscopique	72/boîte	7
Total		579

Fournitures pour la culture et les tests de sensibilité aux médicaments du laboratoire de référence

On ne peut pas calculer les besoins du laboratoire de référence en se basant simplement sur le nombre de cas déclarés, car le nombre d'échantillons traités varie considérablement d'un laboratoire à l'autre. De la même façon, les besoins en fournitures pour les tests de sensibilité aux médicaments ne peuvent pas être calculés directement à partir de ce nombre de cas déclarés. Un résumé du matériel et des réactifs ainsi que leur coût approximatif sont donnés dans le Tableau V.8.

Tableau V.8 Réactifs utilisés au laboratoire de référence

Item	Quantité par l'unité	Coût en Euros
Microscopie à fluorescence		
Auramine	50 g	11
Cristaux de phénol	1.000 ml	38
Ethanol 95%	1.000 ml	2
Permanganate de potassium	100 g	33
Acide chlorhydrique (concentration 37%)	1.000 ml	10
Chlorure de sodium	5.000 g	42
Coloration de BAAR – Ziehl-Neelsen		
Fuchsine basique	500 g	267
Ethanol 95%	1.000 ml	2
Cristaux de phénol	1.000 ml	38
Acide sulfurique, au moins à 95%	2.500 ml	55
Bleu de méthylène	500 g	225
Test de la catalase		
Peroxyde d'hydrogène 30% p.a.	1.000 ml	50
Tween 80	500 ml	30
Décontamination – Méthode de Petroff		
Soude caustique	2.000 g	18
Tampon phosphate 0.067 M pH 6.8 ou 7.0		
Phosphate disodique anhydre	2.500 g	90
Phosphate monopotassique	1.000 g	60
Base IUTM		
Dihydrogénophosphate de potassium	2.500 g	43
Sulfate de magnésium	1.000 g	23
L-asparagine	1.000 g	167
Citrate de magnésium	100 g	15
Vert de malachite	2.500 g	786
Glycérol	100 ml	2
Addition dans le milieu tamponné à l'acide		
Phosphate monopotassique	250 g	Variable
Glutamate de sodium	1.000 g	Variable
Addition dans le milieu de Stonebrink		
Pyruvate de sodium	250 g	131
Addition dans le milieu paranitrobenzoïque		
Acide paranitrobenzoïque	500 g	38
Solution d'acide chlorhydrique 1N	1.000 ml	1
Solution de NaOH 1N	1.000 ml	1

Tableau V.8 (suite)

Item	Quantité par l'unité	Coût en Euros
Médicaments pour les tests de sensibilité		
Rifampicine	5 g	217
Sesquisulfate de dihydrostreptomycine	25 g	19
Isoniazide	100 g	33
Dichlorhydrate d'éthambutol	25 g	33
Diméthylsulfoxyde	1.000 ml	40
Test de réduction des nitrates		
Dihydrogénophosphate de sodium	500 g	8
Dihydrogénophosphate de potassium	1.000 g	19
Nitrate de sodium	500 g	29
Acide chlorhydrique conc 37%	1.000 ml	6
Sulfanilamide	100 g	14
Dichlorhydrate de N-(1-naphthyl)-éthylènediamine	5 g	15
Poussière de zinc		
Détergent pour le lavage des bouteilles	100 g	17
Désinfectant pour <i>M. tuberculosis</i>	200 kg	71
Hycolin à 5% (désinfectant phénolique)	5 litres	15

F. Considérations spéciales de biosécurité au laboratoire

La transmission de *M. tuberculosis* provient essentiellement de micro-aérosols constitués de noyaux de gouttelettes contenant des bacilles tuberculeux, d'une taille supérieure à 1 µm et inférieure à 10 µm de diamètre, c'est à dire suffisamment petites pour atteindre les alvéoles et suffisamment grandes pour être capables d'adhérer au revêtement cellulaire alvéolaire plutôt que de rester en suspension dans l'air alvéolaire sans se fixer.

La lutte contre l'infection au laboratoire vise à réduire la transmission aérogène. Différentes procédures entraînent des risques très différents en fonction du degré d'aérosolisation et du nombre de particules infectieuses pouvant être produites par la procédure.

1. Recueil des échantillons

Dans beaucoup de pays, on réfère directement au laboratoire les patients suspects de tuberculose pour les informer sur la façon de produire les crachats et recueillir ces derniers. Il s'agit d'une approche rationnelle et efficace car elle limite le nombre de personnes donnant des instruc-

tions à celles qui connaissent le mieux le type d'échantillon nécessaire. Toutefois, les techniciens de laboratoire sont ainsi exposés à un risque plus élevé d'infection par la tuberculose que beaucoup d'autres agents de santé puisqu'ils doivent être en contact direct, souvent quotidien, avec des cas contagieux de tuberculose non traités. Néanmoins, comme les techniciens de laboratoire savent que la probabilité pour un suspect de tuberculose d'être atteint effectivement d'une tuberculose à bacilloscopie positive est très élevée (les valeurs réelles peuvent être calculées à partir du registre du laboratoire), ils peuvent prendre les précautions susceptibles de réduire ces risques de manière substantielle. En premier lieu, les techniciens doivent donner aux patients comme instruction de se couvrir la bouche quand ils toussent, avant de leur enseigner comment produire le crachat. Deuxièmement, la production de l'échantillon de crachats se fait bien en dehors du bâtiment pour que les aérosols soient dilués et exposés directement aux rayons ultraviolets de la lumière solaire.

2. Préparation des frottis

Quoique l'ouverture des crachoirs et la confection d'un frottis puissent produire des micro-aérosols, le risque de transmission provenant de ces procédures est négligeable (en raison de la faible force physique appliquée à un matériel très visqueux) par comparaison avec celui résultant des aérosols produits par une seule secousse de toux non protégée. Les études épidémiologiques n'ont pas démontré que le seul fait de préparer des frottis soit associé à un quelconque excès de risque mesurable d'infection tuberculeuse. Par voie de conséquence, les cabinets de sécurité biologique ne sont pas nécessaires dans les laboratoires périphériques qui ne pratiquent que l'examen microscopique des frottis.

3. Comment traiter les suspensions aqueuses de *M. tuberculosis*

Le laboratoire de référence manipule des suspensions aqueuses de *M. tuberculosis* pour l'identification de *M. tuberculosis* provenant des cultures et pour les tests de sensibilité aux médicaments. Le nombre d'organismes de *M. tuberculosis* poussant en culture pure est énorme et n'importe quel aérosol formé pendant la manipulation de ces suspensions est susceptible de contenir des quantités considérables de bacilles tuberculeux. Dès lors, ce travail doit être fait à l'intérieur d'un cabinet de sécurité biologique. On classe les cabinets de sécurité biologique en trois classes : I, II et III.

Les cabinets de sécurité biologique de Classe I assurent la protection du personnel et de l'environnement mais pas celle des produits. L'air non

filtré de la chambre est aspiré au-dessus de la surface de travail. La protection du personnel est assurée par ce courant d'air vers l'intérieur du cabinet, pour autant qu'une vitesse minimum de 25 m linéaires par minute soit maintenue au niveau de l'ouverture antérieure. Le cabinet de sécurité biologique de Classe I est relié en dur au système d'évacuation du bâtiment et le ventilateur d'évacuation du bâtiment produit la pression négative nécessaire à aspirer l'air du cabinet. Cet air est évacué au travers d'un filtre HEPA (filtre de haute efficacité pour particules aériennes) au moment où il entre dans le tuyau d'évacuation. Les filtres HEPA sont efficaces pour retenir les particules et les agents infectieux mais non les produits chimiques volatils ou les gaz. Un deuxième filtre HEPA peut être installé à l'extrémité terminale du tuyau d'évacuation. Fondamentalement, les cabinets de sécurité biologique de Classe I sont adéquats pour ceux qui manipulent des suspensions aqueuses de *M. tuberculosis* au laboratoire de référence.

Si on recherche la protection des produits en plus de la protection de l'environnement et du personnel, on doit utiliser les appareils de Classe II. Les cabinets de sécurité biologique du Type B de la Classe II assurant l'évacuation hors du bâtiment sont à préférer dans cette catégorie.

Dans les pays à faibles revenus, l'homologation et l'entretien ainsi que le remplacement des filtres en temps utile, représentent un défi majeur. Si ces précautions ne sont pas prises, les filtres sont obstrués et tôt ou tard, les bacilles tuberculeux peuvent être projetés vers le visage de l'utilisateur. Pour cette raison, lorsqu'un bon entretien ne peut pas être garanti, les cabinets de Classe I sans filtre et dont l'évacuation vers l'extérieur se situe très haut au-dessus du sol représentent l'option la plus sûre.

4. Evacuation des produits de déchets infectieux

Chaque laboratoire, qu'il soit périphérique ou national, doit incinérer les produits de déchets infectés (récipients de crachats sales, bâtonnets applicateurs, etc.). Au laboratoire de référence, les flacons de culture seront passés à l'autoclave avant nettoyage. Les déchets infectés provenant du laboratoire de référence devraient toujours être passés à l'autoclave avant incinération.

G. Exigences internationales pour l'envoi sécurisé de cultures du complexe de *M. tuberculosis*

Pour permettre un contrôle externe de qualité des tests de sensibilité aux médicaments réalisés au laboratoire de référence de la tuberculose, des

échanges de cultures avec un laboratoire supranational de référence sont organisés. Les cultures de *M. tuberculosis* sont des produits très contagieux, contenant de grands nombres d'organismes viables qui peuvent provoquer la maladie chez l'homme. Le risque est encore plus grand en cas de transfert de cultures de souches résistantes.

Certaines organisations internationales comme l'Union Postale Universelle, l'Organisation Internationale de l'Aviation Civile et l'Association Internationale du Transport Aérien ont élaboré des directives et des procédures visant à faciliter l'envoi sécurisé et rapide de produits contagieux tout en garantissant simultanément la sécurité du personnel des transports et celle du public en général. Ces organisations ont également élaboré des définitions communément admises ainsi que des exigences d'emballage et d'étiquetage. L'information sur les exigences de documents sera obtenue auprès des autorités nationales appropriées, à la fois dans les pays d'envoi et de destination.

Pour les produits contagieux et les échantillons de diagnostic susceptibles de contenir des substances infectieuses, il faut un emballage triple en accord avec les recommandations des Nations Unies ainsi que l'utilisation d'un matériel d'emballage standard UN type 6-2/02. Il ne faut pas transporter les cultures sur boîtes de Pétri. Les cultures de mycobactéries peuvent être envoyées sur milieu solide dans des tubes à couvercles à vis ou après congélation et dessiccation par le vide dans des récipients comme les containers primaires étanches à l'eau. La solution alternative la plus commode est d'envoyer les 1,5 ml de suspensions mycobactériennes en milieu liquide, conservées dans des tubes à congélation de 2 ml. Le container primaire doit être totalement entouré par au moins 2 cm de matériel absorbant et introduit dans un container externe solide et étanche (Figure V.1.) Le papier tissu ou l'ouate de cellulose du container secondaire doit suffire à absorber la totalité du liquide de l'échantillon en cas de défaut d'étanchéité du container interne. On peut placer plusieurs containers primaires dans un seul container secondaire si le volume total de l'ensemble des containers primaires n'excède pas 50 ml et s'ils ne sont pas du tout en contact les uns avec les autres. Chaque série de containers primaires et secondaires seront emballés dans un container d'envoi extérieur constitué d'une feuille de fibres gaufrées, de carton, de bois ou d'autres matériaux de résistance équivalente.

Une copie des formulaires de réquisition, des lettres ou d'autres informations identifiant ou décrivant l'échantillon sera fixée par une bande adhésive à l'extérieur du container secondaire. Une autre copie sera envoyée par avion au laboratoire de destination de l'échantillon et une troisième conservée par l'expéditeur. En plus des adresses de l'expéditeur

Bibliographie

1. Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. Primary containment for biohazards: selection, installation and use of biological safety cabinets. U.S. Department of Health and Human Services, ed. Washington, DC, USA: US Government Printing Office, 2000.
2. Collins C H, Grange J M, Yates M D. Tuberculosis bacteriology. Organization and practice. Second edition. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1997.
3. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Technical guide. Sputum examination for tuberculosis by direct microscopy in low income countries. Paris, France: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2000.
4. World Health Organization. Guidelines for the surveillance of drug resistance in tuberculosis. WHO/TB/2003.320:1-21. Geneva, Switzerland: WHO, 2003.

CHAPITRE VI

Annexes

- Annexe 1 Formulaire de demande et de transmission des résultats des examens des frottis de crachats
- Annexe 2 Registre du laboratoire d'examen microscopique des frottis de crachats
- Annexe 3 Formulaire de rapport sur les performances du laboratoire périphérique pour les frottis de crachats et sur l'état des stocks
- Annexe 4 Formulaire pour les tests en série d'examen microscopique des frottis de crachats au moyen de lames envoyées par le laboratoire de référence vers la périphérie
- Annexe 5 Formulaire pour le contrôle des lames envoyées de la périphérie vers le laboratoire de référence
- Annexe 6 Formulaire de rapport sur les résumés des résultats régionaux des évaluations de qualité par contrôle
- Annexe 7 Registre de laboratoire pour les cultures primaires
- Annexe 8 Registre de laboratoire pour l'identification des bactéries et pour les tests de sensibilité
- Annexe 9 Formulaire de demande et de transmission des résultats des cultures de crachats
- Annexe 10 Schéma pour la transmission du résumé des résultats des tests de sensibilité aux médicaments
- Annexe 11 Configuration du laboratoire périphérique de microscopie
- Annexe 12 Configuration et plans d'un laboratoire national de référence de la tuberculose
 - Figure 1 : Plan A Emplacement et plan de disposition
 - Figure 2 : Plan B Coupes nord, ouest, sud et est du laboratoire de référence de la tuberculose
 - Figure 3 : Plan C Détails du laboratoire de référence de la tuberculose
 - Figure 4 : Croquis d'un laboratoire à écoulement contrôlé de l'air
- Annexe 13 Formulaire de demande d'approvisionnement du laboratoire régional des frottis des crachats

Annexe 1. Formulaire de demande et de transmission des résultats des examens de frottis de crachats

Demande d'examen de crachats

Le formulaire complété comportant les résultats sera envoyé rapidement au service qui l'a envoyé (service d'origine)

Service demandeur (service d'origine) : *

Centre de diagnostic et de traitement (CDT) :

Date : Service d'envoi (récepteur) :

Nom du patient : Age : Sexe : M ☐ F ☐

Adresse complète du patient :

Raisons de l'examen :

DIAGNOSTIC ☐ ou SUIVI ☐

Nombre de mois de traitement : N° du Registre du CDT : †

Site de la maladie : Pulmonaire ☐ Extrapulmonaire ☐ (spécifiez) :

Nombre d'échantillons de crachats envoyés avec ce formulaire :

Date de recueil du premier échantillon :

Nom et signature de la personne ayant reçu l'échantillon :

* y compris tous les services ou pourvoyeurs de soins publics et privés

† inscrire le N° du Registre CDT du patient sous chimiothérapie envoyé pour suivi en cours de traitement

RESULTATS (à compléter par le laboratoire)

N° de série du laboratoire :

DATE du recueil	ECHANTILLON	Aspect macroscopique [‡]	RESULTATS				
			Nég.	(1-9)	(+)	(++)	(+++)
	1						
	2						
	3						

[‡] (H) : hémoptoïque ; (M) : muco-purulent ; (S) : salivaire

Date : Examiné par : Signature :

Annexe 3. Formulaire de rapport sur les performances du laboratoire périphérique pour les frottis de crachats et sur l'état des stocks

Rapport trimestriel

Trimestre / Année _____

Performance du laboratoire BAAR et stocks

Labo/CDT : _____ District : _____ Région : _____

Frottis examinés	Positifs	Négatifs	1-9 BAAR/100 champs	Total
Nombre de frottis de suspects examinés pendant le trimestre				
Nombre de frottis de suivi examinés pendant le trimestre				
Total de frottis examinés				

Stocks à la fin du trimestre	
Solution de carbol-fuchsine _____ millilitres	Solution de décoloration _____ millilitres
Solution de bleu de méthylène _____ millilitres	Alcool à brûler _____ millilitres
Huile à immersion _____ millilitres	Lames _____ unités
_____	Crachoirs _____ unités
_____	_____

Annexe 4. Formulaire pour les tests en série d'examen microscopique des frottis de crachats au moyen de lames envoyées par le laboratoire de référence vers la périphérie

Région : _____ District : _____ Code du laboratoire : _____

Nom du technicien de laboratoire examinant les lames : _____

Date de l'envoi des lames par le laboratoire de référence : ____/____/____

Date d'examen des lames au laboratoire périphérique : ____/____/____

Résultats de l'examen :

Code de la lame	Résultat au laboratoire de référence	Résultat au laboratoire périphérique
A		
B		
C		
D		
E		
F		
G		
H		
I		
K		

Comment exprimer les résultats :

Examinez les lames à la recherche des BAAR et exprimez le résultat comme suit :

Observation

Pas de BAAR pour 100 champs à l'immersion

1 à 9 BAAR pour 100 champs à l'immersion

10 à 99 BAAR pour 100 champs à l'immersion

1 à 10 BAAR par champ sur 50 champs

> 10 BAAR par champ sur 20 champs

Résultat

Nég.

donnez le chiffre exact
(par ex. 4/100)

1 +

2 +

3 +

Annexe 5. Formulaire pour le contrôle des lames envoyées de la périphérie vers le laboratoire de référence

Contrôle des examens de frottis à la recherche de BAAR

Laboratoire périphérique : _____ Technicien du 2^e niveau : _____

Technicien(s) local : _____ Laboratoire : _____

Date de l'échantillonnage : _____ Technicien du 3^e niveau : _____

Période contrôlée du registre labo : _____ Laboratoire : _____

Laboratoire périphérique		Résultats		Echantillon	Dimension	Épaisseur	Coloration	Commentaires
Lame N°	Résultat	Deuxième niveau	Troisième niveau					

Echantillon, dimension, épaisseur et coloration : A = approprié ; L = limite ; M = médiocre

Résultats en périphérie	Résultats du contre-contrôle final					
	Négatif	1-9 BAAR	1+	2+	3+	Total
Négatif						
1-9 BAAR						
1+						
2+						
3+						
Total						

Résumé des erreurs identifiées (nombre)				
Erreurs graves		Erreurs légères		
FPE	FNE	FPF	FNF	EQ
Total erreurs graves		Total erreurs légères		

Résultats du deuxième niveau	Résultats du contre-contrôle final					
	Négatif	1-9 BAAR	1+	2+	3+	Total
Négatif						
1-9 BAAR						
1+						
2+						
3+						
Total						

Résumé des erreurs identifiées (nombre)				
Erreurs graves		Erreurs légères		
FPE	FNE	FPF	FNF	EQ
Total erreurs graves		Total erreurs légères		

FPE = faux positifs élevés ; FNE = faux négatifs élevés ; FPF = faux positifs faibles ;
FNF = faux négatifs faibles ; EQ = erreur de quantification

Objectif atteint : OUI ☐ NON ☐

Recommandations : _____

Annexe 7. Registre du laboratoire pour les cultures primaires

Numéro de série de la culture primaire	Echantillon					Patient		Frottis BAAR		Quantification des lectures de croissance									
	Date de réception	Date du recueil	Type	Numéro ID de l'échantillon	Centre d'origine	Identification du patient	Nouveau / Suivi	Résultat local	Résultat laboratoire de culture	Milieux inoculés	Semaine 1	Semaine 2	Semaine 3	Semaine 4	Semaine 5	Semaine 6	Semaine 7	Semaine 8	Résultat provisoire
										L-J 1									
										L-J 2									
										Pyruvate									
										L-J 1									
										L-J 2									
										Pyruvate									
										L-J 1									
										L-J 2									
										Pyruvate									
										L-J 1									
										L-J 2									
										Pyruvate									

Modalités de quantification : 1-9 colonies : décompte exact

10-100 colonies : 1+

> 100-200 colonies : 2+

> 200 colonies : 3+

Annexe 8. Registre du laboratoire pour l'identification des bactéries et pour les tests de sensibilité

Numéro de série du test de sensibilité aux médicaments	Numéro de série de la culture primaire	Date où la culture est déclarée positive	Date de mise en route des tests	Quantification des résultats de la croissance / Réactions														Résultats finaux	
				Contrôle - 2	Contrôle - 4	Isoniazide - 2	Isoniazide - 4	Rifampicine - 2	Rifampicine - 4	Streptomycine - 2	Streptomycine - 4	Ethambutol - 2	Ethambutol - 4	PNB *	Catalase			Identification	Profil de résistance
				Moment de la lecture															
				4 semaines															
				6 semaines															
				4 semaines															
				6 semaines															
				4 semaines															
				6 semaines															
				4 semaines															
				6 semaines															
				4 semaines															
				6 semaines															
				4 semaines															
				6 semaines															
				4 semaines															
				6 semaines															
				4 semaines															
				6 semaines															
				4 semaines															
				6 semaines															

* acide paranitrobenzoïque.

Annexe 9. Formulaire de demande et de transmission des résultats des cultures de crachats

Origine de la demande :

District : _____ Région : _____ Identification du labo local : _____

Date du recueil de l'échantillon : ____ / ____ / 20__ N° de série du laboratoire local : _____

Personne demandant l'examen : Nom : _____ Grade : _____

Identification du patient :

Nom et prénom du patient : _____ Age (ans) : _____ Sexe : _____

Numéro du patient dans le registre TB : _____

Type de patient et site de la maladie :

☐ Nouveau (jamais traité précédemment pendant ≥ 1 mois) Site : ☐ Pulmonaire ☐ Extrapulmonaire (spécifiez) : _____

☐ Rechute

☐ Echec

☐ Reprise de traitement

☐ Bacillaire chronique

Type d'échantillon : ☐ Crachats Résultat du frottis au laboratoire local :

1^{er} _____ 2^e _____ 3^e _____ échantillon

☐ Autre (spécifiez) : _____

Résultats du laboratoire de référence :

Numéro de série au laboratoire de référence : _____

Examen microscopique

Echantillon	Nég.	1-9	1+	2+	3+
1					
2					

Résultat de la culture

Echantillon	Contaminé	Nég.	1-9 colonies décompte exact	10-100 col	>100-200 col	>200 col
				1+	2+	3+
1						
2						

Résultats des tests de sensibilité aux médicaments

Isoniazide	Rifampicine	Ethambutol	Streptomycine

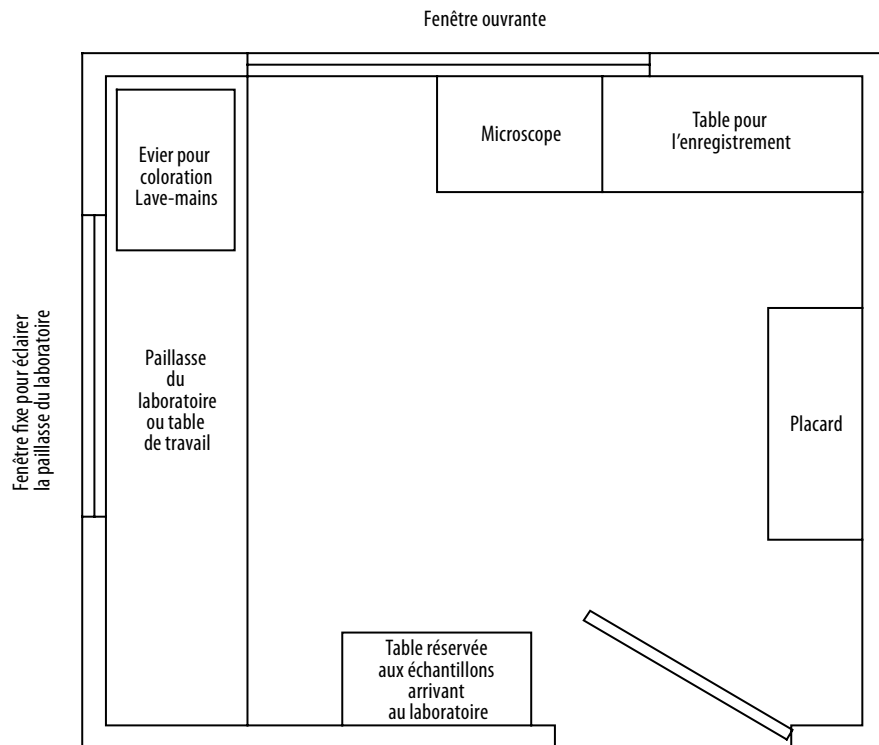
Date : ____ / ____ / 20__ Signature : _____

Annexe 10. Schéma pour la transmission du résumé des résultats des tests de sensibilité aux médicaments

Type de résistance / sensibilité	Type de patient						
	Pas de traitement antérieur (ou < 1 mois)	Traités précédemment (≥ 1 mois)				Statut de traitement non classé	Total
		Rechute	Echec	Reprise de traitement	Bacillaire chronique	Non classés	
Total testé							
Totalement sensible							
Tout type de résistance							
Monorésistance							
Isoniazide (H)							
Rifampicine (R)							
Ethambutol (E)							
Streptomycine (S)							
Résistance H + R							
HR							
HRE							
HRS							
HES							
Résistance H + autre résistance							
HE							
HS							
HES							
Résistance R + autre résistance							
RS							
RE							
RES							
Autres polyrésistances							
ES							
Tout type de résistance à R							
Tout type de résistance à H							
Tout type de résistance à HR							

Annexe 11. Configuration du laboratoire périphérique de microscopie

Adapté de : Collins C H, Grange J M, Yates M D. Tuberculosis bacteriology. Organization and practice. 2nd ed. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1977.



Annexe 12. Configuration et plans d'un laboratoire national de référence de la tuberculose

Annexe 12 **Figure 1 – Plan A**

Alors qu'un laboratoire de référence est généralement intégré dans un bâtiment et sur un espace existant et que les critères de planification peuvent varier considérablement en fonction de la situation spécifique, le cas du Centre national de Lutte contre la tuberculose et du Laboratoire national de référence de la Tuberculose à Dakar, Sénégal a donné l'occasion de construire des bâtiments indépendants sur un espace attribué par le Ministère de la Santé et des Affaires Sociales. Les bâtiments devaient comporter un laboratoire de référence, deux bâtiments administratifs pour l'unité centrale de la tuberculose et suffisamment d'espace pour l'entreposage des médicaments et du matériel de laboratoire puisqu'à ce moment là, cet espace n'était pas disponible ailleurs.

Le plafond de budget pour la construction du complexe entier avait été prédéterminé et ne devait pas dépasser 420.000 US\$. Le laboratoire de référence a été construit pour répondre aux exigences minimales requises après consultation avec des experts internationaux en mycobactériologie et en santé publique.

Figure 1 :

Plan A Emplacement et plan de disposition

Figure 2 :

Plan B Coupes nord, ouest, sud et est du laboratoire de référence de la tuberculose

Figure 3 :

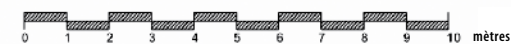
Plan C Détails du laboratoire de référence de la tuberculose

Figure 4 : Croquis d'un laboratoire à courant aérien contrôlé



- ① Interrupteur
- ② Prise de courant
- ③ Lampe d'applique murale
- Ⓢ Eau chaude
- ⚡ Fusibles électriques
- Ⓛ Fenêtre aluminium 40x40 cm
- Ⓛ Fenêtre aluminium 335x190 cm
- Ⓛ Fenêtre aluminium 215x190 cm
- Ⓛ Fenêtre aluminium 190x60 cm

- Ⓛ Porte en acier 90x210 cm
- Ⓛ Porte en acier 100x210 cm
- Ⓛ Porte en acier 160x210 cm
- Ⓛ Porte isoplane 90x210 cm
- Ⓛ Porte isoplane 80x210 cm
- Ⓛ Porte isoplane 100x210 cm



LABORATOIRE NATIONAL DE REFERENCE SENEGAL		
Plan du laboratoire	Echelle	Date 1994
		Tirages H. M.
		Architecte H. M.
Fait par LHL pour L'Union	Rev.	Plan n°

Figure 2 :

Plan B Coupes nord, ouest, sud et est du laboratoire de référence de la tuberculose



5	ACROTERE ET CANNELETAS 20 CM. FENETRE FACADE SUD ET EST	08.11.83
6	FENETRES, TOUTES, SUPPORTEURS, PORTES	05.08.83
PRO	MODIFICATIONS	DATE:
LABORATOIRE CENTRAL DE LA TUBERCULOSE AU SENEGAL		11.05.83
FACADES		PROJ: H.M.
LUL		ARCHITECTE: H.M.
E.H.B. BOLOSSEKAPET AS		PLAN No: 325.122
R.P. 4710 N. 0001 0010 NORVILLE Tel: +47 22 22 24 50 Téléfax: +47 22 22 28 33		PROJ: B

Figure 3 :

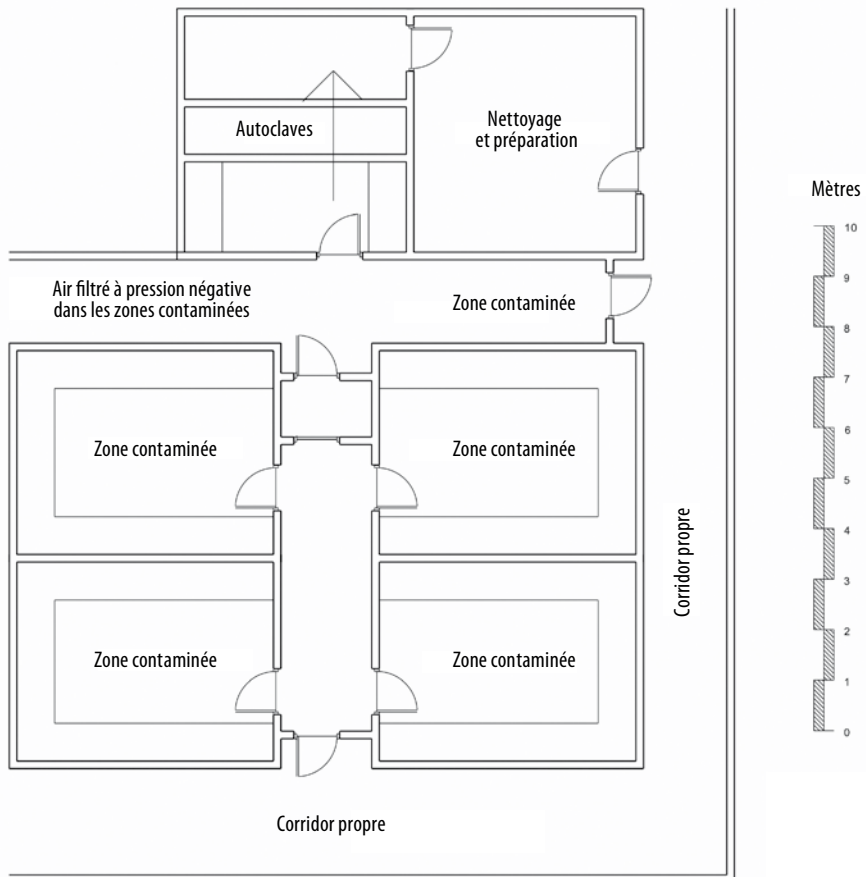
Plan C Détails du laboratoire de référence de la tuberculose

Figure 4. En fonction des ressources disponibles, un laboratoire de référence de la tuberculose peut être construit de telle sorte que la circulation de l'air soit contrôlée dans l'entièreté du laboratoire. Obtenir une direction d'écoulement de l'air exige une planification et une construction soigneuses.

L'esquisse d'un laboratoire muni d'une circulation d'air dirigée illustre deux concepts de base du contrôle biologique des organismes de classe III, c'est-à-dire l'écoulement dirigé de l'air et les portes à blocage alterné. Ces portes ne peuvent pas être ouvertes simultanément. Lorsqu'une porte (porte 1) est ouverte, l'autre porte (porte 2) ne peut pas être ouverte grâce à un mécanisme de blocage.

L'esquisse pour ce laboratoire a été aimablement fournie par Isabel N de Kantor, ScD, Buenos Aires, Argentine.

Figure 4 : Croquis d'un laboratoire à écoulement d'air contrôlé



Annexe 13. Formulaire de demande d'approvisionnement du laboratoire régional des frottis de crachats

Commande de matériel pour l'examen microscopique à la recherche des BAAR

Région : _____ Semestre : _____ Année : _____

A Nombre de frottis faits dans la région au cours du semestre précédent _____ *

Item	Quantité de colorant ou d'autre item utilisée par frottis	Facteurs de formule du colorant (quantité de produits chimiques par litre de colorant [†])	Commande pour une consommation de 6 mois (= A x B x C)	Réserve de 3 mois (= D/2)	Consommation plus réserve (= D+E)	Quantités restant en stock [‡]	Calcul de quantité requise (= F-G)	Commande arrondie au nombre d'unités complètes d'empaquetage	Unité d'empaquetage
Crachoirs	1		D	E	F	G	H	I	Carton de ____ pièces
Lames	1								Carton de ____ pièces
Poudre de fuchsine basique	0,003 litre	10							Flacon de ____ grammes
Cristaux de phénol	0,003 litre	50							Flacon de ____ litres
Acide sulfurique concentré	0,003 litre	0,25							Flacon de ____ grammes
Poudre de bleu de méthylène	0,003 litre	3							Flacon de ____ litres
Alcool dénaturé	0,003 litre	0,1							Flacon de ____ litres
Alcool à brûler	0,001 litre								Flacon de ____ litres
Huile à immersion	0,0001 litre								Flacon de ____ litres

* Introduire ici le nombre de frottis examinés dans l'ensemble des centres si le chiffre est disponible ; sinon utiliser un facteur basé sur le nombre de cas détectés à bacilloscopie positive et sur la prévalence moyenne des positifs parmi les cas venus pour diagnostic dans les registres de laboratoire

† Adapter les facteurs si la formule utilisée pour le colorant est différente (ici la carbol-fuchsine contient 1% de fuchsine basique et 5% de phénol ; le bleu de méthylène est à 0,3% ; l'acide sulfurique à 25%)

‡ N'introduire ici que le solde laissé en stock dans les principaux magasins régionaux, sans compter ce que les laboratoires ont gardé en stock

