

SOMMAIRE

Introduction	1
Première partie : Généralités	4
Chapitre I : Rappels sur les Mycobactéries	5
1- Introduction	6
2- Caractères bactériologiques	7
3- Epidémiologie	23
4- Pouvoir pathogène	26
5- Diagnostic biologique des infections à mycobactéries	30
6- Eléments de thérapeutique	40
Chapitre II : Assurance qualité dans un laboratoire de Mycobactéries	42
1- Introduction	43
2- Les locaux	43
3- Le personnel	44
4- Les procédures	45
5- La sécurité	45
6- L'équipement et le matériel de laboratoire	47
7- L'assurance qualité dans la réalisation des analyses	48
Deuxième partie : Mise en place de l'unité des Mycobactéries	53
Chapitre 1 : Cadre de l'étude	54
1- Présentation de l'hôpital Aristide le Dantec	55
2- Le laboratoire de Bactériologie-Virologie	56
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	62
1- Matériel	63
2- Méthodologie	63
Chapitre 3 : Résultats	67
1- Les locaux	68
2- L'équipement du laboratoire	69
3- Le personnel	72
4- Réactifs, consommables et milieux de culture	72
5- Préparation des milieux et réactifs	75
6- Manuel des procédures et contrôle de qualité	80
7- Réception des premiers prélèvements	98
Chapitre 4 : Commentaires	100
Conclusion	105
Bibliographie	111
Annexes	118

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

**FACULTE DE MEDCINE DE PHARMACIE
ET D'ODONTO – STOMATOLOGIE**

DECANAT & DIRECTION

DOYEN

M. DOUDOU THIAM

PREMIER ASSESSEUR

M. CHEIKH S. B. BOYE

DEUXIEME ASSESSEUR

M. MALICK SEMBENE

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

M. ASSANE CISSE

Dakar, le 10 novembre

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
BARR	Bacilles acido-alcool-résistants
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BK	Bacille de Koch
CFA	Citrate de fer ammoniacal
CS	Cyclosérine
ELISPOT	Enzyme-linked-immunosorbent spot
FHI	Family Health International
IDR	Intradermoréaction
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
JICA	Japan International Cooperation Agency
LJ	Lowenstein-Jensen
MAC	<i>Mycobacterium avium complex</i>
MGIT	Mycobacteria growth indicator tube
NAP	Para-nitro- α -acétylamino hydroxypropiophénone
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAS	Acide para amino salicylique

AU NOM DE DIEU, LE CLEMENT,

LE MISERICORDIEUX

GLOIRE A ALLAH !

J'ATTESTE QU'IL N'Y A DE DIEU QUE TOI

L'UNIQUE, LE TOUT PUISSANT,

L'OMNIPOTENT, L'OMNISCIENT

ET QUE MOHAMED (PSL) EST

TON ESCLAVE ET TON MESSAGER

INTRODUCTION

Ces dernières années ont vu une résurgence considérable des infections à mycobactéries à travers le monde entier.

Cet accroissement est en grande partie attribuable à l'infection à VIH/SIDA même si les conditions socio-économiques défavorables sont toujours impliquées surtout dans les pays en développement.

A cela s'associe une augmentation notoire des cas de résistance des mycobactéries aux agents antimycobactériens.

Cette situation nécessite un diagnostic précoce et correct pour une prise en charge thérapeutique adéquate des infections à mycobactéries.

Cette prise en charge n'est possible que grâce à l'instauration d'un système sanitaire performant. D'où la nécessité de la mise en place d'un système de qualité pour une maîtrise de cette prise en charge.

Dans le souci de la qualité, les activités de l'unité des Mycobactéries du laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec avaient été suspendues depuis l'année 2001 du fait de l'état de l'équipement.

Bénéficiant d'une subvention de l'Agence Japonaise de Coopération Internationale (JICA) pour l'équipement, de Harvard School of Public Health de Boston pour la réfection des locaux, de l'Union Européenne et de l'Hôpital Aristide le Dantec pour les réactifs et milieux de culture, sa réouverture a été envisagée depuis le début de l'année 2003 et ce travail devrait contribuer à la mise sur pied d'une unité des Mycobactéries respectant les règles relatives à l'assurance qualité et les exigences d'un laboratoire de type III.

Nos objectifs étaient alors :

- de faire l'inventaire des règles relatives à l'assurance qualité ;
- de répertorier les exigences qu'il faut respecter pour atteindre le niveau III de laboratoire de mycobactériologie.
- de mettre sur pied une unité des mycobactéries fonctionnelle

Dans la première partie, nous décrirons les techniques bactériologiques utilisées pour le diagnostic des infections à Mycobactéries et nous énoncerons les principes de l'assurance qualité.

Dans la deuxième partie, nous appliquerons les règles de l'assurance qualité au laboratoire des mycobactéries tout en exposant la structure organisationnelle et fonctionnelle.

Pour finir, nous donnerons les résultats de cette application c'est-à-dire les résultats des premières analyses effectuées dans cette unité nouvelle formule.

PREMIERE PARTIE :

GENERALITES

CHAPITRE I :

Rappels sur les mycobactéries

1- INTRODUCTION

Les mycobactéries sont des espèces bactériennes appartenant à la famille des *Mycobacteriaceae*. Celle-ci renferme un seul genre qui est le genre *Mycobacterium*.

Ce sont des bacilles immobiles, aérobies strictes, non capsulées, asporulées et du fait de la structure de leur paroi, ne prennent pas les colorants usuels comme ceux utilisés pour la coloration de Gram. Elles font partie malgré cela, de par leur organisation structurale, des bactéries dites à Gram positif. Elles sont capables en revanche d'être colorées par la fuschine ou l'auramine et de conserver ces colorants malgré l'action conjointe de l'acide et de l'alcool.

Elles sont dites acido-alcoolorésistantes, appelées de fait bacilles acido-alcool-résistants ou BAAR.

Leur culture nécessite des milieux spéciaux.

Les mycobactéries appartiennent à la famille des *Mycobacteriaceae* qui est constituée par des Actinomycetales dont le pseudomycelium rudimentaire se présente habituellement sous la forme de petits bacilles, immobiles, ayant parfois des éléments renflés, cunéiformes ou ramifiés.

Plusieurs dizaines d'espèces sont maintenant identifiées.

Du point de vue médical, les mycobactéries peuvent être classées en trois grandes catégories :

- la première catégorie comprend les mycobactéries responsables de la tuberculose humaine :

- * *Mycobacterium tuberculosis* qui est l'espèce type ;

- * *M. bovis* ;

- * *M. africanum*.

La deuxième catégorie regroupe les mycobactéries non tuberculeuses cultivables in vitro. Ces espèces sont aussi désignées sous le nom de Mycobactéries atypiques. Elles sont des mycobactéries pathogènes opportunistes.

La troisième catégorie est représentée par *M. Leprae* et *M. Lepraemurium* responsables respectivement de la lèpre de l'homme et du rat. Ces dernières ne sont pas ou sont difficilement cultivables in vitro.

M. tuberculosis, *M. bovis*, *M. africanum* et *M. leprae* sont toujours pathogènes pour l'homme.

A l'exception de *M. leprae*, elles sont responsables de tuberculose et avec *M. microti*, elles forment le complexe *tuberculosis*.

2- CARACTERES BACTERIOLOGIQUES (2, 14, 16)

2-1- Les mycobactéries du complexe *tuberculosis* (3)

Mycobacterium tuberculosis est l'espèce type de mycobactérie, il est aussi appelé bacille tuberculeux humain ou bacille de Koch (BK).

*** Morphologie**

C'est un bacille fin, légèrement incurvé de 2 à 5 µm de long et 0,2 à 0,3 µm de large. Ses extrémités sont arrondies.

Il est immobile, acapsulé et asporulé. A Gram positif, *M. tuberculosis* est difficilement colorable par les colorants usuels mais coloré par la fuchsine ou l'auramine, malgré l'action conjointe de l'acide et de l'alcool.

Dans les produits pathologiques, il se présente isolé ou en petits amas, parfois sous forme d'ébauches de cordes ou de torsades.

*** Structure**

De toutes les bactéries, les mycobactéries sont celles dont on peut extraire la plus grande quantité de lipides : 20 à 45 %. Ceux-ci représentent 60 % des constituants de la paroi.

Leur structure de base est un peptidoglycane lié de manière covalente à un mycolate d'arabinogalactane.

*** Le peptidoglycane**

C'est la structure de base de la paroi de toutes les bactéries.

Il est constitué de deux sucres aminés et de quatre acides aminés formant de véritables chaînes par des liaisons d'amidation et l'existence de points interpeptidiques.

*** Le mycolate d'arabinogalactane**

C'est un liposaccharide constitué de disaccharides (arabinose et galactose) liés par des liaisons esters à des lipides spéciaux, les acides mycoliques.

*** L'arabinogalactane**

Il est formé d'une alternance de molécules d'arabinose et de galactose. Il est caractéristique des bactéries des genres *Mycobacterium*, *Corynebacterium* et *Nocardia*.

Biologiquement l'arabinogalactane représente la part active des polysaccharides extraits par fractionnement et qui sont les haptènes et non les antigènes.

*** Les acides mycoliques**

Ce sont des acides gras ramifiés et hydroxylés formés de 60 à 90 atomes de carbone. Ils confèrent l'acido-résistance aux Mycobactéries.

*** Les protéines**

Elles sont le support de l'activité tuberculinique et sont extraites du corps bactérien.

*** Outre ces composants**, la paroi des mycobactéries contient trois autres glycolipides qui peuvent être extraits par des solvants organiques. Ce sont les cires D, le cord-factor et les mycosides.

*** Action des agents physiques et chimiques**

Action des agents physiques

M. tuberculosis est très sensible à la chaleur, à la lumière solaire, aux rayons X et UV.

Il résiste au froid : au réfrigérateur à +4°C, le BK n'est pas affecté dans sa viabilité pendant plusieurs années ; à -70°C, il se conserve indéfiniment.

Il résiste également à la dessiccation et la lyophilisation (association dessiccation-refroidissement) en est un excellent moyen de conservation.

Action des agents chimiques

M. tuberculosis est plus résistant que les bactéries usuelles aux désinfectants chimiques (H₂SO₄, NaOH). Cette propriété est utilisée pour sélectionner par divers procédés de décontamination, les bacilles tuberculeux des autres bactéries dans les produits pathologiques contaminés.

En revanche, il est sensible à l'alcool ; une suspension de BK étant stérilisée en 5 minutes par l'alcool à 90°.

*** Culture**

M. tuberculosis se caractérise par ses exigences de culture et sa lenteur de croissance. Son temps de génération est de 20 heures en moyenne. Les cultures ne sont donc positives qu'après une ou plusieurs semaines d'incubation à 37° C. Différents types de milieux sont utilisés.

Milieux à l'œuf

Parmi ces milieux, celui proposé par Lowenstein et modifié par Jensen appelé Lowenstein-Jensen ou LJ est le plus couramment employé.

Le BK cultive sur ce milieu en donnant des colonies avec un aspect caractéristique en chou-fleur, sec et verruqueux avec une

surface franchement rugueuse et une teinte qui vire du crème-beige au chamois.

Lorsqu'on les prélève, les colonies se détachent facilement, par contre elles se dissocient très mal en suspension dans l'eau.

Milieux gélosés

Ce sont des milieux semi-synthétiques mis au point par Middlebrook. Ils sont désignés selon leur degré d'enrichissement sous les noms de 7H10 et 7H11.

Parfaitement transparents, ils facilitent le repérage précoce des colonies de *M. tuberculosis*. Celles-ci sont plates, sèches, muqueuses, friables et d'aspect moins typique que sur milieu de Lowenstein-Jensen.

Milieux liquides

*** Le plus connu et le plus employé est le milieu de Sauton**

Il est employé pour la production du BCG et la préparation de la tuberculine.

*** Le milieu de Youmans, dérivé du milieu de Sauton**

La culture commence à apparaître en 5 à 7 jours et atteint son maximum en trois semaines avec un aspect granuleux après agitation.

La précocité et la netteté de la culture font de ce milieu, un milieu de choix pour une mesure rapide de la sensibilité aux antibiotiques.

*** Le milieu de Dubos et le milieu 7H9**

La culture apparaît en 5 à 7 jours, sous forme d'un dépôt blanchâtre, qui se disperse par agitation en donnant un aspect homogène.

Ces caractères font du milieu de Dubos ou de son dérivé moderne, le milieu 7H9, le milieu de choix pour la préparation de suspensions homogènes de *M. tuberculosis*.

D'autres milieux, soit liquide monophasique : Bactec 12B, MGIT (Mycobacteria Growth indicator tube), BIO-FM[®] ..., soit liquide et solide (biphasique) : septi-check AFB, MB check, ont été développés ces dernières années. Ils permettent la mesure de la croissance bactérienne par différentes techniques grâce à une source radioactive, une source fluorimétrique ou colorimétrique, un dégagement ou une consommation de gaz.

*** Caractères biochimiques**

Production d'acide nicotinique

De tous les bacilles du genre *Mycobacterium*, le bacille tuberculeux humain est le seul à accumuler, sans l'utiliser une quantité importante d'acide nicotinique ou niacine.

La positivité de ce test, connu sous le nom de niacin-test, est quasi spécifique de *M. tuberculosis*.

Toutefois, environ 1% des souches de *M. tuberculosis* ont un niacin-test négatif tandis que d'autres espèces ont parfois (*M. africanum*) ou régulièrement (*M. simiae*, *M. chelonae* var niacinogène, *M. microti*) un niacin-test positif.

Réduction des nitrates en nitrites

M. tuberculosis, comme beaucoup d'autres mycobactéries, mais à la différence de *M. bovis* et *M. africanum*, réduit les nitrates en nitrites selon la technique de Virtanen.

Activité catalasique

Toutes les mycobactéries ont une activité catalasique. Celle de *M. tuberculosis* et, encore plus celle de *M. bovis* et *M. africanum*, est d'intensité moyenne si on le compare à la forte activité catalasique d'un grand nombre de Mycobactéries atypiques.

Elle est thermolabile alors qu'elle est thermostable pour presque toutes les mycobactéries atypiques.

Les souches de *M. tuberculosis* devenues résistantes à l'isoniazide ont une activité catalasique réduite.

Amidases : uréase, nicotinamidase, pyrazinamidase

M. tuberculosis possède les amidases qui lui permettent d'hydrolyser l'urée, la nicotinamide et le pyrazinamide.

Croissance en présence d'inhibiteurs : PAS, TCH, TB1

Au sein des mycobactéries du complexe *tuberculosis*, le comportement des espèces vis à vis de certaines substances antibacillaires peut présenter un intérêt diagnostique certain.

Seul *M. tuberculosis* est résistant au TCH.

Par contre toutes les trois espèces sont sensibles au PAS.

*** Génétique**

La génétique de *M. tuberculosis* est dominée par plusieurs notions.

La première et la plus importante en pratique est celle des mutants résistants aux antibiotiques. Il y a également l'existence de variations génétiques naturelles et provoquées, mais aussi l'existence de nombreux bactériophages.

*** Mutants résistants aux antibiotiques**

Tous les faits connus jusqu'à présent indiquent que la résistance de *M. tuberculosis* aux antibiotiques est la conséquence d'une mutation.

La sélection de mutants résistants aux antibiotiques est observable aussi bien in vivo qu'in vitro. Pour *M. tuberculosis* la proportion des mutants résistants aux antibiotiques est différente d'une molécule à l'autre.

*** Variations génétiques de *M. tuberculosis***

Deux types de variations peuvent être décrites.

Variations géographiques :

Les souches de *M. tuberculosis* ont des caractères culturels, biochimiques et de virulence qui varient selon leur origine géographique.

En Europe et en Amérique, elles donnent sur milieu LJ des colonies habituellement eugoniques, rugueuses, de teinte crème-beige qui possèdent une catalase, ont un Niacin-test positif et présentent une grande virulence pour le cobaye.

Mais il a été signalé en 1869, à Szabo (Hongrie) (**in 14**), des souches de *M. tuberculosis* authentique donnant sur milieu LJ des colonies pigmentées en vert. Cette variété de *M. tuberculosis* est sensible au TCH.

En Extrême-Orient, les colonies du BK sont parfois dysgoniques et lisses comme celle de *M. bovis* mais elles sont de teinte crème-beige et possèdent les caractères biochimiques et de virulence classiques.

*** Variations induites**

Les répiquages successifs sur milieux artificiels peuvent induire des variations des caractères de *M. tuberculosis*.

L'exemple est celui de la souche de référence « H37 » de *M. tuberculosis*.

De cette souche isolée en 1905 de l'expectoration d'un tuberculeux pulmonaire, Stecken et coll. ont isolé et caractérisé en 1934 deux mutants :

- le premier appelé H37Rv qui donne des colonies rugueuses (R) et qui a gardé sa virulence (V).
- le second appelé H37Ra qui donne aussi des colonies rugueuses (R) mais qui est avirulent (a).

Le Bacille de Calmette et Guérin (BCG) est un autre exemple historique de ces variations induites par les repiquages successifs de *M. bovis*.

*** Mycobactériophages**

Depuis 1947, de nombreux bactériophages, appelés mycobactériophages, se sont montrés actifs sur les mycobactéries en général et sur *M. tuberculosis* en particulier (**in 14**).

Actuellement, douze bactériophages ont été identifiés et qui permettent de distinguer cinq lysotypes de *M. tuberculosis* (**in 14**) :

- trois types principaux : A, B, C
- deux types secondaires : Ax et A2.

* *Mycobacterium bovis*

Morphologie

M. bovis est habituellement plus court et plus trapu que *M. tuberculosis* et se colore plus faiblement par la méthode de Ziehl-Neelsen.

Caractères cultureux

M. bovis cultive lentement sur milieu LJ et donne des colonies typiques. Celles-ci sont blanches, lisses, dysgoniques et contrairement à *M. tuberculosis*, se dissocient bien dans l'eau.

La glycérine a un effet défavorable sur sa croissance, à l'inverse du pyruvate qui le stimule.

Ce qui est à la base du milieu de Coletsos, dérivé du milieu de LJ et contenant 0,3 à 0,4% de pyruvate de sodium.

* **Caractères biochimiques**

Comme *M. tuberculosis*, *M. bovis* a une activité catalasique thermolabile, mais il ne produit pas de niacine et ne réduit pas les nitrates en nitrites. Il est sensible au TCH et parmi les amidases il ne possède que l'uréase. Il est microaérophile.

* **Le BCG**

Le BCG est une souche avirulente de *M. bovis* obtenue par repiquages successifs sur milieu à la pomme de terre.

Sur milieu de LJ, les colonies de BCG cultivent rapidement et sont eugoniques et rugueuses comme celles de *M. tuberculosis*.

En revanche, leurs caractères biochimiques sont ceux de *M. bovis* mais avec 2 caractères supplémentaires : la résistance à la thiosémicarbazone et à la cyclosérine tout en étant sensible aux autres antibiotiques antituberculeux.

*** *Mycobacterium africanum***

Morphologie

Encore appelé bacille tuberculeux africain, *M. africanum* a les mêmes caractéristiques morphologiques que *M. tuberculosis*.

*** Caractères culturels**

A l'isolement, sur milieu de Lowenstein-Jensen, la culture n'est pas habituellement positive qu'en 4 à 8 semaines, parfois plus tardivement encore. Les colonies de *M. africanum* sont dysgoniques.

Elles sont petites, mais plates avec un bourgeon central, une surface rugueuse et une teinte mate. Elles s'enlèvent mal du milieu de culture et se dissocient mal dans l'eau.

Il n'est pas rare que la culture ne donne naissance qu'à un nombre limité de colonies, malgré la présence à l'examen microscopique de nombreux BAAR.

Comme *M. bovis*, sa croissance est fortement stimulée par le pyruvate.

*** Caractères biochimiques**

M. africanum a une activité catalasique thermolabile, qui devient faible ou nulle en cas de résistance à l'isoniazide. Par ailleurs, il a des caractères qui le rapprocheraient plus de *M. bovis* que de *M. tuberculosis*.

En effet comme *M. bovis*, il est microaérophile, ne réduit pas les nitrates en nitrites, produit peu de niacine, et est sensible au TCH.

Comme *M. tuberculosis*, il possède les trois amidases : uréase, nicotinamidase et pyrazinamidase.

Toutefois, au sein de l'espèce *M. africanum*, les caractères biochimiques de toutes les souches isolées sont variables notamment en fonction de l'origine géographique des malades.

C'est ainsi qu'on distingue plusieurs types de *M. africanum*.

Le type Dakar, isolé chez 25 à 40 % des tuberculeux du Sénégal, du Mali et de la Mauritanie, a les caractères qui ont été décrits précédemment pour *M. africanum*.

Le type Yaoundé, isolé chez 60 à 80 % des tuberculeux du Sud Cameroun et du Gabon, est voisin du type Dakar. Il s'en distingue cependant par la réaction de la nitrate-réductase qui est négative par la technique de Virtanen (bacilles en suspension dans une solution tamponnée nitratée) et positive par la technique de Tacquet (bacilles cultivés en présence de nitrates) alors qu'elle est négative par l'une et l'autre technique pour le type Dakar.

Le type Rwanda, isolé chez 90 % des tuberculeux de ce pays.

Ses caractères culturels le rapprochent de *M. bovis* (dysgonie des colonies sur LJ, microaérophilie et action stimulante du pyruvate). En revanche, ses caractères biochimiques sont ceux de *M. tuberculosis* (production abondante de niacine, nitrate-réductase positive par la technique de Tacquet...).

Deux sous types sont distingués : Rwanda I et Rwanda II qui diffèrent par la nitrate-réductase.

Pour Rwanda I, elle est négative par la technique de Virtanen et positive par la technique de Tacquet alors que pour le sous-type Rwanda II, elle est positive par l'une ou l'autre technique.

Tableau I : Caractères différentiels entre mycobactéries du complexe *tuberculosis* (12)

	Vitesse de croissance	Aspect des colonies	Catalase	Nitrate Réductase	Niacine	Croissance sur			
						TCH	PAS	CS	TB1
<i>M. tub.</i>	lente	Eugoniques Rugueuses Crème beige	thermolabile	+	+	R	S	S	R
<i>M. bov.</i>	lente	dysgoniques lisses blanches	thermolabile	-	-	S	S	S	R
<i>M. bov.</i> BCG	lente	Eugoniques Rugueuses Crème beige	thermolabile	-	-	S	S	R	R
<i>M. afri.</i>	lente	dysgoniques rugueuses mates	thermolabile	_*	_*	S	S	S	R

* sauf exceptions

2-2- Les mycobactéries atypiques (2, 10).

On regroupe sous le nom de Mycobactéries atypiques les bacilles tuberculeux aviaires et les anciens bacilles paratuberculeux, qui comprennent de nombreuses espèces présentes dans l'environnement et chez les animaux.

Certaines d'entre elles peuvent parfois déterminer chez l'homme des affections d'allure tuberculeuse, « les mycobactérioses ».

En 1959, Runyon a proposé une classification basée sur la rapidité de croissance et la pigmentation des colonies.

*** La vitesse de croissance**

L'obtention de cultures matures macroscopiquement visibles en plus de sept jours correspond à une croissance lente et en moins de 7 jours à une croissance rapide.

*** La pigmentation des colonies**

Certaines mycobactéries synthétisent des pigments caroténoïdes en quantité et type variables selon les espèces. En utilisant ces variations dans la production de pigments, les mycobactéries atypiques peuvent être classées en trois groupes : photochromogènes, scotochromogènes et non chromogènes.

Si les Mycobactéries photochromogènes produisent des colonies pigmentées seulement après exposition à la lumière, les scotochromogènes donnent des colonies pigmentées que leur croissance ait lieu à la lumière ou à l'obscurité, les non chromogènes ne produisent pas de pigment.

**Tableau II : Liste des espèces de Mycobactéries atypiques approuvées
dans le genre Mycobacterium.(12)**

Groupes, Espèces	Groupes, Espèces
Groupe I = Mycobactéries photochromogènes	Groupe II= Mycobactéries scotochromogènes
<i>M. Kansassi</i>	<i>M. gordonae</i>
<i>M.marinum</i>	<i>M.szulgai</i>
<i>M.simiae</i>	<i>M. scrofulaceum</i>
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. flavescens</i>
	<i>M. xenopi</i>
Groupe III : Mycobactéries atypiques non chromogènes, à croissance lente	Groupe IV : Mycobactéries à croissance rapide
MAC	Non pigmentées
<i>M. avium</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chelonae</i>
<i>Complexe terrae</i>	<i>M. diernhoferi</i>
<i>M. terrae</i>	<i>M. chitae</i>
<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. senegalense</i>
<i>M. triviale</i>	<i>M. fallax</i>
<i>M. malmoeense</i>	Pigmentées
Autres espèces	<i>M. vaccae</i>
<i>M. ulcerans</i>	groupe <i>M. vaccae</i> – aurum
<i>M. haemophilum</i>	<i>M. engbaeckii</i>
<i>M. shimoidi</i>	Thermophiles
<i>M. paratuberculosis</i>	<i>M. phlei</i>
<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. thermoresistibile</i>
	<i>M. smegmatis</i>

Tests pour l'identification des mycobactéries atypiques (5, 22).

Une fois une mycobactérie classée dans un des groupes de Runyon sur la base de la pigmentation et de la vitesse de croissance, divers tests biochimiques sont effectués pour arriver à son identification complète.

Ce sont essentiellement la détermination des températures de croissance, la recherche d'une arylsulfatase, l'hydrolyse du tween 80, la tolérance au chlorure de sodium (NaCl), la croissance sur

gélose MacConkey sans cristal violet, l'épreuve de la capture du fer, la recherche de la bêta-glucosidase et la réduction du tellurite.

Ces tests sont utilisés à côté de ceux déjà décrits pour les mycobactéries du complexe *tuberculosis*.

Identification précise des espèces (2, 18)

Tableau III : Principaux caractères d'identification des espèces de mycobactéries du groupe I.

		<i>M. Kansasii</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. simiae</i>
Température	30°C	+	+	+
Croissance	37°C	+	-	+
Hydrolyse Tween 80	5 jours	+	+	-
Hydrolyse Tween 80	10 jours	+	+	-
Croissance en présence de TB1		-	+	+
Niacine		-	-/+	+
Nitrate réductase		+	+	-

Tableau IV : Principaux caractères d'identification des espèces de mycobactéries du groupe II.

	<i>M.flavescens</i>	<i>M.gordonae</i>	<i>M.sgulgai</i>	<i>M.scrofulaceum</i>	<i>M.xenopi</i>
Nitrate réductase	+	-	+	-	-
Uréase	V	-	+	+	-
Hydrolyse du Tween 80 (5 jours)	+	+	-	-	-
Hydrolyse du Tween 80 (10 jours)	+	+	+	-	-
Croissance sur TB1	+	+	+	V	+
Arylsulfatase	V	-	+	-	+
Bêta-glucosidase	V	-	+	-	V

V = variable

Tableau V : Principaux caractères d'identification des espèces de Mycobactéries du groupe III

	MAC	<i>M.malmoense</i>	<i>M.ulcerans</i>	<i>M.non-chromogenicum</i>	<i>M.terrae</i>	<i>M.triviale</i>
Hydrolyse de 5 jours	-	+/-	-	+	+	+
Tween 80 de 10 jours	-	+	-	+	+	+
Nitrate réductase	-	-	-	-	V	+
Catalase thermostable	+	-	+	+	+	+
Arylsulfatase	-	-	-	+	-	+

Croissance sur TB1	+	V	+	+	+	+
Croissance à 43°C	V	-	-	-	-	-
Uréase	-	+	-	-	-	-
Réduction tellurite (9 jours)	+	+	-	-	-	-

Tableau VI : Principaux caractères d'identification des espèces de mycobactéries du groupe IV

	M. fortuitum	M. chelonae	Autres
Croissance sur MacConkey sans cristal violet	+	+	-
Arylsulfatase 3 jours	+	+	-
Bêta glucosidase	+	-	V
Capture du fer	+	-	V
Nitrate réductase	+	-	V

3- EPIDEMIOLOGIE (14, 27)

3-1- Réservoir des germes

M. tuberculosis est un parasite strict de l'homme mais il est capable d'infecter certaines espèces animales vivant à ses côtés.

On ne le retrouve donc pas dans la nature en dehors des produits contaminés par l'homme infecté.

M. bovis, agent de la tuberculose bovine est capable d'infecter l'homme et certaines espèces animales, notamment le chat, le chien et la chèvre.

Strictement parasite des bovins et éventuellement de l'homme et de quelques animaux, *M. bovis* n'est retrouvé dans l'environnement que s'il a été contaminé par des produits animaux ou humains.

M. africanum est un parasite strict de l'homme en Afrique occidentale et centrale.

Les mycobactéries atypiques sont présentes chez les animaux et dans l'environnement.

Elles sont retrouvées aussi bien dans le sol, la végétation ou les poussières.

M. kansasii et *M. xenopi* ne sont jamais retrouvés dans le sol et l'eau de ruissellement, mais sont des contaminants de l'eau potable et de l'eau distillée.

M. gordonae est l'espèce la plus répandue dans la nature et au laboratoire, elle peut déclencher de véritables invasions, souvent d'origine atmosphérique. Elle est retrouvée dans l'eau de robinet.

Fréquemment isolé de l'environnement, *M. fortuitum* est un commensal habituel de l'homme.

M. avium présente grossièrement le même habitat que *M. fortuitum* et les mycobactéries du complexe *terrae*.

3-2- Transmission

3-2-1- Modes de transmission

M. tuberculosis étant un parasite strict de l'homme, l'homme est à la fois le réservoir et l'agent de transmission du bacille.

Les malades possédant une caverne pulmonaire sont les principaux disséminateurs du BK par l'intermédiaire des gouttelettes rejetées à l'occasion de la parole, de la toux ou de l'éternuement. Les animaux infectés au contact avec l'homme (chien, chat) interviennent peu dans la dissémination de la maladie.

L'infection humaine à *M. bovis* s'effectue surtout par l'ingestion de produits laitiers contaminés. La pasteurisation du lait et le contrôle du bétail sont pratiquement arrivés à sa disparition

dans les pays industrialisés, ce qui est loin d'être le cas dans les pays en développement.

Pour les mycobactéries atypiques, aucune contagion interhumaine n'a pu être établie. Selon toute vraisemblance, les malades s'infectent au contact des animaux ou de l'environnement.

3-2-2- Facteurs favorisants

La transmission de la tuberculose est surtout le fait de malades bacillifères, c'est à dire qui éliminent dans leurs expectorations des BK. Elle est d'autant plus aisée que les malades contagieux toussent plus fréquemment sans prendre de précautions, que le contact avec leur entourage est plus direct, que les locaux où ils se trouvent sont peu ou pas ventilés.

D'autres facteurs sont impliqués. Ce sont notamment la diminution, jusqu'à récemment, de l'intérêt et des fonds consacrés à la lutte, l'afflux d'immigrants de pays à haute prévalence, la précarité économique accrue.

L'infection à VIH constitue un autre facteur favorisant à cause de l'immunodépression qu'elle engendre.

En effet, la tuberculose frappe entre 2 % et 44 % des sujets infectés par le VIH selon la prévalence de la maladie dans les pays d'origine (in 24).

3-3- Données épidémiologiques

Dans le monde, la tuberculose est responsable de 2,7 millions de morts par an (4).

Le nombre de sujets infectés est estimé à 1,7 milliard soit 1/3 de la population mondiale (27).

La disparité est énorme entre les pays industrialisés et les pays en développement.

Le monde en développement voit apparaître chaque année 8 millions de nouveaux cas de tuberculose dont un peu moins de la moitié sont contagieux et représente 95 à 98 % de la mortalité et de la morbidité de cette infection.

Selon l'OMS la répartition est la suivante (26) :

- Asie du Sud-Est : 49 %
- Région Pacifique-Ouest : 21 %
- Afrique : 10 %
- Amérique : 6 %
- Méditerranée : 7 %
- Europe : 7 %.

Dans les pays industrialisés, on a noté une augmentation des cas de tuberculose depuis la moitié des années 80.

Cette augmentation est en grande partie attribuable à l'atteinte des défenses immunes des sujets infectés par le VIH.

Dans les pays en développement, l'intrication avec l'infection à VIH est réelle mais peu importante à l'égard des facteurs socio-économiques.

4- POUVOIR PATHOGENE

4-1- Physiopathologie (11, 14)

M. tuberculosis ne libérant au cours de sa multiplication aucune substance toxique, son pouvoir pathogène est fonction de sa seule virulence.

Celle-ci est d'abord liée à la capacité du bacille à survivre et à se multiplier à l'intérieur des macrophages de l'organisme –hôte.

Ultérieurement, la libération des constituants bactériens secondaire à la lyse d'une partie des bacilles va jouer, par l'intermédiaire de l'hypersensibilité tuberculinique, un rôle capital dans la pathogénie des lésions tuberculeuses.

La multiplication des bacilles et leur diffusion sont limitées par le développement d'une immunité qui s'acquiert en quelques semaines et se traduit par la positivité des réactions à la tuberculine.

Cette immunité qui met en jeu l'hypersensibilité retardée avec l'activation des lymphocytes TCD4, est l'exemple type de réponse immunitaire cellulaire.

4-2- Infection humaine (17)

4-2-1- La tuberculose (8, 23, 27)

La tuberculose est avant tout une maladie pulmonaire. Sa contagiosité est relativement faible et se fait par voie aérienne, par contacts répétés avec un sujet bacillifère.

A partir de bacilles inhalés et parvenus jusqu'aux alvéoles pulmonaires, se constitue la lésion initiale où se multiplient les bacilles.

Ensuite, ils essaient par voie lymphatique vers les ganglions du voisinage et par voie sanguine à distance dans différents organes.

La maladie évolue en deux phases :

***La primo-infection tuberculeuse = PIT**

Elle est habituellement silencieuse cliniquement. Pour un petit nombre de sujets seulement, elle peut mener directement à la tuberculose maladie.

Pour un autre petit groupe de sujets, la tuberculose maladie apparaîtra à partir de foyers tuberculeux quiescents, contemporains de la PIT, après un délai plus ou moins long.

Chez l'enfant, la tuberculose développe habituellement une PIT typique (complexe ganglio-pulmonaire).

La tuberculose-maladie

*** Tuberculose pulmonaire**

Les symptômes en sont connus. Certains sont assez évocateurs : toux prolongée, expectoration, hémoptysie ; d'autres le sont moins : amaigrissement, fièvre, douleur thoracique, transpiration nocturne. Le signe le plus caractéristique est la toux avec ou sans hémoptysie.

Chez l'adulte, les formes pulmonaires souvent excavées et bacillifères, sont les plus communes. Par contre 5 à 10 % des enfants de moins de deux ans développent des formes à dissémination hématogène exposant à des tuberculoses miliaires et à la méningite tuberculeuse.

*** Tuberculoses extra pulmonaires**

Ces localisations représentent 10 à 20 % des cas de tuberculose répertoriés.

Elles ne jouent pas un rôle important dans la transmission de la maladie.

Il y a des atteintes ganglionnaires, hépatiques, spléniques, osseuses, des atteintes des séreuses (pleurésies, péricardite, péritonites...).

Ces atteintes sont souvent plurifocales, définissant une tuberculose disséminée.

4-2-2- Les mycobactérioses (11)

Les infections humaines provoquées par les mycobactéries atypiques potentiellement pathogènes ont des localisations diverses.

Les infections cutanées sont dominées par l'ulcère de Buruli dû à *M. ulcerans* décrit en Afrique Noire, en Australie, en Asie du Sud-Est et en Guyane.

Les infections ganglionnaires sont essentiellement dues à *M. scrofulaceum*, et observées surtout chez l'enfant.

Les infections pulmonaires dues à des mycobactéries variées (*M. kansasii*, *M. avium*, *M. xenopi*...), elles simulent la tuberculose pulmonaire, et sont rencontrées chez des adultes aux voies respiratoires lésées (silicose, bronchite chronique) et au cours du SIDA.

Les formes disséminées dues surtout à *M. avium*, *M. intracellulare*, elles atteignent le foie, la rate, les ganglions, la moelle, le squelette, les méninges, le cerveau, la peau, les poumons, les reins.

Elles se rencontrent surtout au cours du SIDA.

5- DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES INFECTIONS A MYCOBACTERIES

5-1- Diagnostic bactériologique (13, 16)

Ce diagnostic est commun à l'ensemble des mycobactéries.

Seule différera l'approche technique concernant l'identification de chaque mycobactérie isolée d'un prélèvement.

L'un des soucis principaux que pose le diagnostic bactériologique des infections à Mycobactéries est le délai de positivité des cultures et, par voie de conséquence, le rendu des résultats de l'identification et de l'antibiogramme.

Ce handicap est dû à la lenteur de croissance de ces bactéries et actuellement, il existe des moyens diagnostiques permettant de raccourcir ces délais.

5-1-1- Les prélèvements

Il est impératif d'effectuer le prélèvement si possible avant tout traitement antibactérien. Il faut éviter la contamination par l'eau de robinet ou tout autre liquide pouvant être à l'origine d'examen faussement positif.

Prélèvements d'origine pulmonaire

L'émission des bacilles étant discontinue, les expectorations seront répétées pour augmenter les chances.

Devant la difficulté pour les patients d'émettre des crachats de qualité, des crachats induits, émis après inhalation d'aérosols

d'eau physiologique stérile, sont recueillis. On peut également procéder à des tubages gastriques en prélevant directement dans l'estomac, les sécrétions bronchiques, dégluties inconsciemment pendant le sommeil.

Chez les malades intubés, les produits d'aspiration trachéale ou trachéobronchique sont recueillis à l'aide d'une sonde d'aspiration.

La biopsie pulmonaire peut être réalisée si nécessaire ; elle se fait sous fibroscopie.

Autres prélèvements

- *liquides de ponction (liquide pleural, liquide d'ascite, liquide articulaire...)

- *le sang, en vue d'une hémoculture, dans les formes disséminées, fréquentes surtout chez les immunodéprimés.

- *les urines dans le cadre de la tuberculose rénale.

- *le liquide céphalo-rachidien, pour le diagnostic des méningites tuberculeuses.

- *les pus, obtenus par aspiration d'abcès froid, cliniquement accessible.

- * un écouvillonnage pour les lésions cutanées.

- *les prélèvements tissulaires (ganglions, foie, poumons, rein, os...) qui feront l'objet d'un examen bactériologique et anatomopathologique.

5-1-2- Méthodes de diagnostic classique

5-1-2-1- Microscopie (28)

Les mycobactéries, de par la structure de leur paroi, ne prennent pas les colorants usuels, comme ceux utilisés pour la coloration de Gram.

En revanche, elles sont colorées par la fuchsine phéniquée et l'auramine respectivement selon la technique de Ziehl-Neelsen et selon la technique de Degommier.

A la technique de Ziehl-Neelsen qui est la méthode de référence, l'observation se fait au grossissement X 100 à immersion, et une observation d'au moins 300 champs est nécessaire avant de rendre un résultat négatif soit 20 minutes/lame.

La coloration à l'auramine permet une observation sur un microscope à fluorescence, à l'objectif X 25.

La totalité du frottis peut alors être lue en cinq minutes d'où l'utilisation de cette technique.

Les résultats sont rendus de manière quantitative en nombre de BAAR/champ et pour la méthode de référence, l'échelle de positivité est consignée dans le tableau suivant.

Tableau VII : Echelle de positivité des résultats de bacilloscopie des expectorations recommandée par l'Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires (UICTMR) (28).

Nombre de BAAR	Enregistrement /Communication
Pas de BAAR sur au moins 100 champs	0/négatif
1 à 9 BAAR sur 100 champs *	Nombre réel de BAAR
10 à 99 BAAR sur 100 champs	+
1 à 10 BAAR par champs sur au moins 50 champs	++
> 10 BAAR par champ sur au moins 20 champs	+++

*** La découverte de 1 à 3 BAAR sur 100 champs n'est pas en bonne corrélation avec la positivité de la culture. Dans ce cas, il est recommandé de préparer un nouveau frottis provenant du même échantillon et de le réexaminer.**

5-1-2-2- Culture

Le diagnostic de certitude de la tuberculose et des mycobactérioses en général, repose sur l'isolement et l'identification de l'agent étiologique. Mais connaissant la lenteur de croissance de ces mycobactéries ainsi que leurs exigences nutritives, il est important d'éliminer toute flore commensale préalablement à l'ensemencement des prélèvements. Pour cela, on procède à une décontamination des prélèvements.

*** Décontamination –concentration**

On considère que tout prélèvement provenant de lésions ouvertes (respiratoires, urinaires, fistules...) subit une décontamination contrairement aux prélèvements provenant de sites fermés (LCR, liquides de séreuses...) qui sont ensemencés directement.

Quatre méthodes de décontamination sont actuellement préconisées.

On distingue une décontamination à la soude à 4 % (méthode Petroff), une décontamination à l'acétylcystéine et à la soude (méthode de Kubica), une décontamination au lauryl sulfate de sodium (méthode de Tacquet et Tison) et enfin, une décontamination à l'acide sulfurique à 4 % (méthode de Lowenstein).

*** Milieux de culture**

M. tuberculosis, ainsi que la majorité des mycobactéries atypiques pathogènes, ne cultivent pas sur les milieux usuels de bactériologie.

Par conséquent des milieux riches et adaptés à leur culture ont été définis.

On distingue des milieux à l'œuf, des milieux gélosés et des milieux liquides.

Parmi ces milieux, le plus utilisé est le milieu de Lowenstein-Jensen qui est adapté à l'isolement de la plupart des mycobactéries.

Pour les mycobactéries comme *M. africanum* et *M. bovis* dont la croissance est stimulée par le pyruvate l'isolement est meilleur avec le milieu de Coletsos qui peut être utilisé simple ou additionné d'osséine.

Les milieux gélosés et les milieux liquides sont utilisés dans le but de raccourcir les délais de positivité des cultures observées avec les milieux à l'œuf.

*** Mise en culture**

Habituellement, l'ensemencement se fait sur milieux à l'œuf (Lowenstein-Jensen, Coletsos). Certains préconisent d'ensemencer en outre un milieu gélosé et/ou en milieu liquide permettant un diagnostic précoce.

*** Lecture des cultures**

Les bacilles de la tuberculose poussent en trois semaines, ou bien d'avantage.

C'est pourquoi, ces cultures sont gardées trois mois à 37°C.

Pour les prélèvements d'origine superficielle pour la recherche de certaines mycobactéries atypiques (*M. marinum*, *M. ulcerans*), l'incubation se fera à 30°C et 37°C pendant quatre mois.

Les cultures sont contrôlées régulièrement.

5-1-2-3- Identification des mycobactéries (5, 22)

L'étape initiale d'identification d'une mycobactérie est sa classification dans le complexe *tuberculosis* ou dans un des groupes de Runyon.

Cette différenciation est réalisée par des tests biochimiques usuels (Niacine, catalase, PAS) mais ces derniers ne sont pas appropriés pour les milieux liquides. D'où la mise au point depuis quelques années, d'un test rapide d'identification en milieu liquide.

Ce test utilise la sensibilité des mycobactéries au p-nitro- α -acétylamino-hydroxypropiophénone (NAP).

Les mycobactéries appartenant au complexe *tuberculosis* sont sensibles à ce composé, alors que les mycobactéries atypiques sont résistantes.

En outre, au sein du complexe *tuberculosis*, la différenciation s'effectue d'une part sur l'aspect des colonies, sur les exigences nutritives, sur la production de niacine et la réduction des nitrates et, enfin sur la sensibilité vis-à-vis de certains composés.

Pour les mycobactéries atypiques, l'identification est facilitée par la classification de Runyon. Au sein de chaque groupe, l'aspect microscopique, l'aspect et le délai d'apparition des colonies sur milieu solide et les différentes activités enzymatiques permettront d'identifier spécifiquement chaque mycobactérie atypique.

5-1-2-4- Etude de la sensibilité aux antibiotiques (25)

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques est le complément habituel de l'isolement d'une espèce bactérienne pathogène, si elle n'en est pas souvent la raison principale.

La méthode traditionnelle des proportions de Canetti, Rist et Grosset est la plus couramment utilisée pour tester la sensibilité des mycobactéries aux antituberculeux. Elle consiste à déterminer la proportion de bacilles résistants présents dans une population bactérienne étudiée.

Les antibiotiques à tester sont incorporés à des milieux de Lowenstein-Jensen à des concentrations données.

Les bactéries à tester sont fournies soit par des colonies récoltées sur milieux solides (antibiogramme indirect), soit par le culot de centrifugation d'un produit pathologique suffisamment riche en bacilles pour permettre un examen microscopique positif (antibiogramme direct).

L'utilisation du système BACTEC permet de réduire le temps nécessaire à l'obtention des résultats, mais l'emploi d'éléments radioactifs, inhérent à ce système en limite l'implantation. Les techniques de biologie moléculaire actuellement en développement constitueront peut-être dans l'avenir un moyen rapide de détection de la résistance des mycobactéries aux antibiotiques, permettant ainsi une meilleure maîtrise de la thérapeutique antimycobactérienne.

5-1-3- Méthodes de diagnostic rapide (5, 16)

5-1-3-1- Méthodes radiométriques

Le système BACTEC 12B de Becton Dickinson permet de détecter la majorité des mycobactéries pathogènes et opportunistes dans des délais plus courts. Ce milieu contient comme source de carbone de l'acide palmitique marqué au ^{14}C qui, après consommation, donnera du $^{14}\text{CO}_2$ dont le dégagement est traduit en index de croissance.

Toutefois, la présence d'éléments radioactifs limite leur emploi.

5-1-3-2- Méthodes fluorimétriques

Pour pallier cet inconvénient lié à la présence d'éléments radioactifs, un nouveau milieu a été développé. C'est le Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT[®]) de Becton Dickinson qui utilise une source fluorimétrique pour la détection de la croissance. Comme le BACTEC 12B, le MGIT offre de bonnes caractéristiques : la rapidité et la sensibilité. Si on ajoute à cela sa simplicité d'utilisation, le MGIT contribue à l'amélioration du diagnostic de la tuberculose, s'il est associé au milieu de Lowenstein-Jensen (21).

Toutefois, l'utilisation du BACTEC 960TB pour la lecture automatisée des cultures en limite l'emploi. Pour cela, un nouveau milieu liquide, le BIO-FM[®] a été développé récemment par le laboratoire Bio-Rad. C'est un milieu 7H9 de Middlebrook enrichi en OADC (acide oléique, albumine, dextrose, catalase), optimisé pour la culture des Mycobactéries et permet une lecture visuelle des cultures.

5-1-3-3- Techniques de Biologie moléculaire

*** Sondes à ADN**

La méthode la plus récente pour la détection des mycobactéries utilise des sondes à ADN.

Ces sondes permettent une identification rapide de la plupart des mycobactéries rencontrées.

Cependant, la faiblesse de leur sensibilité, surtout pour les prélèvements à examen microscopique négatif, limite leur utilisation pour la détection directe des mycobactéries dans les prélèvements.

- **Amplification génomique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

On dispose actuellement de séquences génomiques spécifiques du bacille tuberculeux que l'on peut amplifier par PCR et révéler par hybridation avec des sondes spécifiques.

L'amplification par PCR permet actuellement de détecter en 24 à 48 heures de 10 à 100 bacilles tuberculeux dans un produit pathologique et devrait permettre à l'avenir de détecter un simple bacille. Il y a toutefois des progrès à faire pour que la méthode, extrêmement prometteuse, puisse être appliquée dans le diagnostic de la routine.

5-1-3-4- Méthodes chimiques

Comme nous l'expliquions précédemment, les esters d'acides mycoliques sont spécifiques d'espèces. Ainsi, à partir d'une culture pure contenant 10^7 mycobactéries/ml, une identification après extraction de ces composés lipides peut être réalisée.

Plusieurs auteurs ont développé des techniques de chromatographie, soit en couche mince, soit en phase gazeuse, soit HPLC, pour permettre une identification rapide des mycobactéries.

Malheureusement, du fait du coût de l'appareillage, ces techniques sont réservées aux laboratoires de référence.

5-2- Diagnostic immunologique

5-2-1- L'intradermoréaction à la tuberculine (8, 11)

Le virage de l'IDR à la tuberculine est un argument majeur du diagnostic de la tuberculose, en l'absence d'une vaccination B.C.G. récente.

A la « vieille tuberculine » ou substitue de plus en plus les tuberculines purifiées (Purified Protein Derivate ou PPD).

La réaction est positive s'il existe au troisième jour une induration palpable d'au moins 7 mm de diamètre au point d'inoculation.

Cependant, l'interprétation de ces tests exige une grande prudence pour éviter les erreurs par excès (IDR positive avec certaines mycobactéries atypiques) ou par défaut (anergie observée au cours du SIDA, de la malnutrition).

Par ailleurs, les recherches concernant la réponse cellulaire ont donné les premiers résultats avec la mise au point de l'Enzyme-Linked-Immunosorbent Spot (ELISPOT) (6, 19). Cette méthode permet d'évaluer in vitro, les réponses cellulaires T par la détection des cytokines qui en sont les éléments effecteurs.

5-2-2- Le diagnostic sérologique (24)

Bien qu'ayant fait et faisant encore l'objet de recherches intensives, le sérodiagnostic spécifique et sensible de la tuberculose n'est pas encore disponible. La raison est que les antigènes de *M. tuberculosis*, contiennent tous des épitopes présents chez les mycobactéries atypiques.

Dans le cadre du diagnostic des infections à Mycobactéries, les laboratoires de Mycobactériologie sont classés en trois niveaux. Selon le degré de service nous avons :

Le niveau I

Les laboratoires de ce niveau peuvent faire :

- La collecte adéquate d'échantillons cliniques ;
- La préparation et l'examen microscopique de frottis pour le diagnostic et comme moyen de contrôle des patients sous traitement et
- Le transport des prélèvements à un niveau supérieur pour isolement et culture.

Le niveau II

Les laboratoires du niveau II peuvent :

- Accomplir toutes les fonctions des laboratoires du niveau I et aussi traiter des produits pathologiques pour la culture sur milieux à l'œuf et sur milieux gélosés
- Identifier *M. tuberculosis*
- Faire le test de sensibilité de *M. tuberculosis* aux antituberculeux de première ligne

- Conserver les cultures de Mycobactéries pendant un délai raisonnable

Le niveau III

Les conditions suivantes permettent de définir les laboratoires de niveau III

- Ils peuvent remplir toutes les fonctions des niveaux inférieurs et aussi faire l'identification de toutes les espèces de Mycobactéries isolées d'échantillons cliniques ;
- Ils peuvent faire le test de sensibilité des Mycobactéries pendant un délai raisonnable ;
- Ils peuvent conduire des recherches et assurer une formation dans le domaine de la mycobactériologie.

6- ELEMENTS DE THERAPEUTIQUE

6-1- Molécules utilisées dans le traitement de la tuberculose (7)

*** Antituberculeux de première intention**

Ils sont représentés par six molécules :

- l'isoniazide et la rifampicine bactéricides sur les bacilles intra et extracellulaires ;
- l'Ethambutol, bactériostatique ;
- le pyrazinamide, bactéricide sur les bacilles intracellulaires et
- la streptomycine, avec une activité bactéricide.

*** Antituberculeux de seconde intention (11)**

Le nombre de médicaments antituberculeux de réserve vraiment efficaces est limité. Ils sont utilisés dans le cas de tuberculose à bacilles multirésistants. Ce sont :

- les aminoglycosides (kanamycine, amikacine, viomycine, capréomycine) ;
- les macrolides comme l'azythromycine, la clarithromycine ;
- les quinolones comme la sparfloxacine ;
- l'éthionamide, la cyclosérine, la thiacétazone et le PAS.

6-2- Molécules utilisées dans le traitement des Mycobactérioses.

Les antituberculeux ont une efficacité variable.

L'isoniazide, la streptomycine, le pyrazinamide, la thiacétazone sont presque toujours inactifs ;

La Rifampicine, l'ansamycine, l'éthambutol, la cyclosérine, l'éthionamide donnent de meilleurs résultats.

D'autres antibiotiques (sulfamides, amikacine, cyclines, céphalosporines de 3^{ème} génération, péfloxacin) ainsi qu'un antilépreux (clofazimine) peuvent être utilisés.

6-3- Surveillance de l'efficacité du traitement (26)

Elle se fait par la répétition des examens et la négativation progressive des prélèvements à l'examen direct et en culture.

L'efficacité s'apprécie également sur l'amélioration des images radiologiques, sur la reprise du poids et l'apyrexie entre autres.

La persistance de la positivité des cultures au bout de trois mois signe un échec. Cet échec sera documenté par un antibiogramme car il peut être dû à une résistance primaire, sinon à une mauvaise observance.

CHAPITRE II :
L'ASSURANCE DE
QUALITE DANS UN
LABORATOIRE DE
MYCOBACTERIES

INTRODUCTION

Comme tout laboratoire de biologie médicale, un laboratoire de mycobactériologie doit se doter d'un système d'assurance de qualité **(1, 15)**.

Ce système permet de maîtriser la qualité des prestations fournies par le laboratoire en donnant la confiance au personnel et doit s'appliquer à l'organisation du laboratoire et au suivi des analyses qui y sont réalisées **(5, 18)**.

2- LES LOCAUX

La disposition des locaux abritant un laboratoire de mycobactéries doit obéir à certaines normes. En effet, toute manipulation de mycobactéries doit être effectuée dans une enceinte pouvant contenir tout l'équipement et tout le matériel nécessaire à la réalisation des analyses depuis la réception des prélèvements jusqu'au rendu des résultats.

Les locaux doivent être construits avec un système de ventilation à sens unique permettant de maintenir le flux d'air des zones stériles ou moins contaminées aux zones contaminées. Toutefois, l'aménagement détaillé du laboratoire peut varier considérablement selon les situations locales.

3- LE PERSONNEL

Le personnel travaillant dans un laboratoire de mycobactéries doit être sélectionné avec précaution. Il doit être en bonne santé physique et mentale.

Le recrutement de toute nouvelle personne doit être justifié par la négativité d'un test cutané à la tuberculine, par une radiographie pulmonaire normale et par l'absence de symptômes d'infections à Mycobactéries.

Par ailleurs, toute personne devant travailler dans un laboratoire de mycobactéries doit subir une formation aux techniques et aux procédures de sécurité pour le laboratoire de mycobactériologie.

Dans les grands laboratoires comportant plusieurs sections, le personnel fait une rotation dans les différentes sections. Cette rotation se fait dans un délai déterminé par la direction.

Cependant, pour le laboratoire ou la section de mycobactériologie, il est recommandé que le personnel soit assigné de manière permanente à la section. Mais si la rotation est nécessaire, il doit rester dans la section pendant au moins trois à six mois.

Une fois dans le laboratoire ou la section des mycobactéries, le personnel doit être contrôlé régulièrement, en général tous les trois, ou six mois.

Ce contrôle est effectué en faisant des tests cutanés à la tuberculine et la radiographie pulmonaire chez le personnel. Tout membre de l'équipe ayant une intradermoréaction positive à la tuberculine ou présentant des signes d'infections à mycobactéries et

principalement la tuberculose doit être adressé à un médecin pour son suivi.

4- LES PROCEDURES

Les procédures doivent être écrites pour la conformité entre « ce qui est fait » et « ce qui est dit qui est fait » c'est-à-dire, « on écrit ce qu'on doit faire » et on fait « ce qui est écrit ».

Une fois établies, les procédures écrites doivent être suivies par tout le personnel qui doit avoir un accès facile au manuel des procédures. Tout changement dans les procédures doit être évalué, approuvé par la direction du laboratoire et notifié à tout le personnel.

Les procédures doivent donner des lignes directrices sur le plan organisationnel et sur le plan pratique. Dans ce dernier, par exemple, elles donneront des indications quant aux techniques de prélèvements, à leur identification adéquate et à leurs analyses. Elles doivent fournir en même temps les précautions à prendre pour chaque étape depuis les prélèvements jusqu'au rendu des résultats.

5- LA SECURITE

Le risque d'infection tuberculeuse est trois à cinq fois plus élevé pour le personnel d'un laboratoire de mycobactéries que pour les personnes travaillant dans d'autres sections du laboratoire. Par conséquent, tout laboratoire de mycobactéries doit répondre à certaines règles relatives à la sécurité.

Outre les règles élémentaires concernant l'interdiction de manger, de boire et de fumer au laboratoire, d'autres règles s'imposent :

- l'utilisation d'une enceinte de sécurité biologique ou cabinet de biosécurité ou encore poste de sécurité microbiologique (PSM).

C'est la règle la plus importante pour le laboratoire de mycobactéries. Le cabinet de biosécurité doit être fonctionnel et maintenu de façon régulière.

Seuls les laboratoires possédant des enceintes de sécurité biologique de classe II ou III peuvent effectuer des analyses de mycobactéries.

*** Les tenues de laboratoire**

Puisque aucun cabinet de biosécurité n'est pas efficace à 100 % et que des défaillances techniques et mécaniques peuvent survenir à tout instant, le port de vêtements protecteurs est fortement recommandé. Ainsi au cours des prestations, le personnel portera des vêtements protecteurs comme des blouses de laboratoires. Il les enlèvera avant de quitter le laboratoire.

Le port de masques chirurgicaux au cours des manipulations, offre une protection additionnelle au personnel.

Par ailleurs, la lutte contre l'infection au laboratoire doit viser à réduire la production d'aérosols. Le risque de créer des aérosols varie considérablement selon les procédés de laboratoire considérés mais à chaque étape un moyen de décontamination est proposé :

- * Pour faciliter la décontamination du matériel souillé et des vêtements contaminés, un autoclave doit être dans le laboratoire.

* Après la digestion-décontamination, le surnageant doit être transvasé dans un récipient contenant un désinfectant. Ceci permet de minimiser la production d'aérosols et la contamination de la surface de travail dans l'enceinte de biosécurité.

* Pour l'ensemencement, il faut nettoyer le matériel utilisé dans une fiole contenant un mélange d'alcool et de sable avant de le stériliser à la flamme.

En cas de contamination de la surface de travail, la stérilisation est réalisée par l'utilisation de la lumière UV incorporée à la hotte ou par l'utilisation de désinfectants efficaces contre les mycobactéries.

La stérilisation par la lumière UV peut être étendue à tout le laboratoire.

6- L'EQUIPEMENT ET LE MATERIEL DU LABORATOIRE

L'équipement et le matériel du laboratoire doivent répondre aux spécifications et aux indications des fabricants. Ils doivent être contrôlés de manière régulière par le personnel qui doit assurer la traçabilité des contrôles.

Ces contrôles de performance ont pour but d'assurer une exactitude et une précision constante de la qualité des prestations du laboratoire.

Ce contrôle s'applique aussi bien au matériel comme les pipettes que pour l'équipement comme les congélateurs, les cabinets de biosécurité, les réfrigérateurs, les étuves.

7- L'ASSURANCE QUALITE DANS LA REALISATION DES ANALYSES

En plus du contrôle interne de l'espace, du personnel, de la sécurité du matériel et de l'équipement, il est important que d'autres contrôles soient effectués. Ces contrôles s'appliquent à toutes les étapes de la réalisation des analyses depuis le prélèvement jusqu'au rendu des résultats.

7-1- Les prélèvements

Il est important de noter la qualité des prélèvements.

Pour une expectoration par exemple, il faut donner l'aspect macroscopique. Ceci est important comme preuve de résultats de la microscopie et même de la culture surtout pour les prélèvements salivaires.

Il est aussi important de noter la quantité du prélèvement.

En cas d'examen microscopique négatif avec un prélèvement de volume insuffisant (< 5 ml), il faut en informer le médecin prescripteur.

7-2- Transport

Les meilleurs résultats sont obtenus avec les prélèvements transmis dans de courts délais (< 7 jours). Par conséquent, tout retard dans la transmission du prélèvement devra être noté sur le bulletin d'analyse.

7-3- L'identification des échantillons

*** Tubes ou récipients primaires**

L'identification des récipients contenant l'échantillon biologique doit être fait au moment du prélèvement par la personne ayant réalisé celui-ci. L'étiquetage doit être conçu pour éviter toute erreur sur l'identité de la personne. Il doit mentionner, outre l'identité du patient, la date et, si nécessaire, l'heure du prélèvement et la nature de l'échantillon.

Une fiche de renseignements cliniques doit être demandée au médecin prescripteur chaque fois qu'elle est utile à la réalisation correcte de l'analyse et à son interprétation.

*** Tubes ou récipients secondaires**

Lors de la préparation de quantités aliquotes ou de mises en culture, l'étiquetage des tubes ou récipients secondaires doit se faire selon des procédures rigoureuses permettant l'identification sans ambiguïté de l'échantillon au sein du poste de travail, du site de stockage, ou du lieu d'incubation.

7-4- La microscopie

Concernant la microscopie, un grand nombre de contrôles doivent être effectués. Le plus important est le contrôle de qualité de la coloration.

Pour cela, les nouveaux lots de solutions de colorants doivent être testés systématiquement. Ceci implique habituellement la coloration de frottis non colorés, connus comme positifs et négatifs avec une série de lames à colorer au Ziehl-Neelsen.

Les contrôles positifs garantissent la capacité de coloration des nouvelles solutions de colorants alors que l'utilisation des contrôles négatifs confirme l'absence de BAAR contaminants dans les solutions.

En outre, il est recommandé de confirmer les lames positives par un second lecteur et de garder ces frottis pendant des semaines voire des mois pour un éventuel contrôle.

7-5- La digestion-décontamination

Pour déterminer les capacités de décontamination d'un nouveau lot de réactifs, il faut réaliser la digestion de 3 à 5 expectorations.

La concentration est ensuite effectuée par centrifugation.

Après concentration, l'inoculum estensemencé aussi bien sur des milieux pour l'isolement des mycobactéries (Lowenstein-Jensen, Coletsos...) que sur des milieux pour la bactériologie classique (bouillon cœur-cerveille, gélose MacConkey...). Sur ces derniers, le nombre de contaminants qui poussent après 24 à 48 heures à 37° C doit être minimal ou absent.

7-6- Les milieux de culture

Pour les milieux reconstitués au laboratoire, certains renseignements doivent être notés. Ces données concernent la source et le numéro de série des poudres et réactifs utilisés pour la préparation des milieux, le temps et la température de coagulation pour les milieux à l'œuf.

Ces données intéressent également l'aspect macroscopique (couleur, consistance...).

Par ailleurs, tous les milieux préparés sur place ou acquis dans le commerce doivent faire l'objet de tests de stérilité et de sensibilité. Ces tests doivent être réalisés sur tout nouveau lot de milieu.

7-7- Les réactifs pour les tests biochimiques

Le contrôle de qualité des réactifs pour les tests biochimiques comprend trois volets : le contrôle de stérilité, le contrôle de croissance et le contrôle des réponses biochimiques.

Ces contrôles s'imposent à chaque fois qu'un nouveau lot de réactifs est utilisé.

Le contrôle de stérilité doit être réalisé en inoculant des substrats stériles en même temps et de la même manière que les tests.

Pour valider les réponses biochimiques, il est recommandé d'utiliser des contrôles positifs et négatifs.

Le contrôle de croissance, quant à elle, utilise des souches de référence et permet de vérifier si les réactifs supportent la croissance des mycobactéries.

7-8- L'eau

L'eau intervient dans la préparation des milieux et réactifs et dans la coloration. Elle doit être testée périodiquement à la recherche de BAAR contaminants.

Cette recherche doit être la première à considérer quand des résultats fâcheux sont rencontrés dans le laboratoire :

- nombre élevé de prélèvements à bacilloscopie positive avec une culture négative ;
- isolement en grand nombre de mycobactéries saprophytes comme *M. gordonae*.

Le contrôle de l'eau doit se faire de façon régulière.

En plus du contrôle interne qualité, le laboratoire doit se soumettre au contrôle externe qualité pour une comparaison de la qualité de ses services par rapport à d'autres structures exerçant les mêmes activités (20).

DEUXIEME PARTIE :
MISE EN PLACE DE
L'UNITE DES
MYCOBACTERIES

CADRE DE L'ETUDE

INTRODUCTION

L'unité de mycobactériologie est une composante du laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec de Dakar. Elle a été ouverte en 1988 et avait atteint le niveau II jusqu'à la suspension de ses activités en l'an 2001.

En effet, une étude réalisée entre 1998 et 1999 dans cette unité avait fait état d'un certain nombre de problèmes aussi bien techniques qu'organisationnels. Ces difficultés ont abouti à l'arrêt des activités et leur reprise est envisagée sur la base des recommandations de cette même étude (9).

Les objectifs de cette unité sont :

- d'abord, comme tout laboratoire de biologie médicale, participer au diagnostic, à la prévention et au suivi thérapeutique des infections à mycobactéries.

Dans la prestation des services, elle vise le niveau III d'un laboratoire de mycobactéries.

- ensuite, atteindre un niveau de qualité satisfaisant pour se soumettre aux organismes d'accréditation pour une reconnaissance formelle de la structure.

1- Présentation de l'hôpital Aristide Le Dantec.

L'hôpital Aristide le DANTEC est, depuis la réforme de 1998, un hôpital de niveau 3 (hôpital national). Il a une capacité de 750 lits effectifs (1000 lits théoriques). De plus, il constitue un haut lieu de formation pour les étudiants en Médecine, Pharmacie, Odonto-Stomatologie et aussi pour les élèves des écoles paramédicales (infirmier, sage-femme d'état, technicien de laboratoire). C'est l'une des structures hospitalières les plus importantes de la sous région.

Nous y trouvons différents services cliniques de Médecine et de Spécialités Médicales, de Chirurgie et Spécialités chirurgicales, mais aussi les services communs (laboratoires et services de radiologie) dont le laboratoire de Bactériologie-Virologie cadre de notre étude.

2-Le Laboratoire de Bactériologie-Virologie

Ce laboratoire est un service hospitalo-universitaire qui a pour vocation le diagnostic biologique des infections bactériennes et virales, la recherche et la formation dans les domaines de la Bactériologie et de la Virologie. C'est un centre de référence en matière d'infections sexuellement transmissibles et un centre collaborateur ONU/SIDA. C'est le siège du Réseau Africain de Recherche sur le Sida (Afrique de l'Ouest et du Centre) ; le laboratoire abrite aussi l'observatoire des résistances aux anti-

rétroviraux et le programme de recherche sur les vaccins anti-VIH en Afrique.

Le personnel du laboratoire est constitué de :

- personnel médical :
 - 13 pharmaciens biologistes dont 3 professeurs d'université (parmi lesquels le chef de service), 2 assistants de faculté, 5 biologistes des hôpitaux et 4 internes ;
 - 1 médecin-biologiste et 3 médecins cliniciens.
- personnel paramédical et technique :
 - 1 ingénieur-biologiste
 - 6 techniciens supérieurs, 7 techniciens et 5 aides techniques, 1 infirmière d'état, 5 garçons et filles de laboratoire ;
 - personnel de maintenance pour l'entretien de l'équipement (5 techniciens spécialisés).

Comme le montre l'organigramme de la page ci-après, ce laboratoire comprend principalement trois unités : l'unité de Bactériologie, l'unité d'Immunologie-Sérologie et l'unité de Biologie Moléculaire. Et nous avons aussi un service administratif, financier et social puisqu'à lui seul le service compte 75 personnes qui ne sont pas tous du service publique.

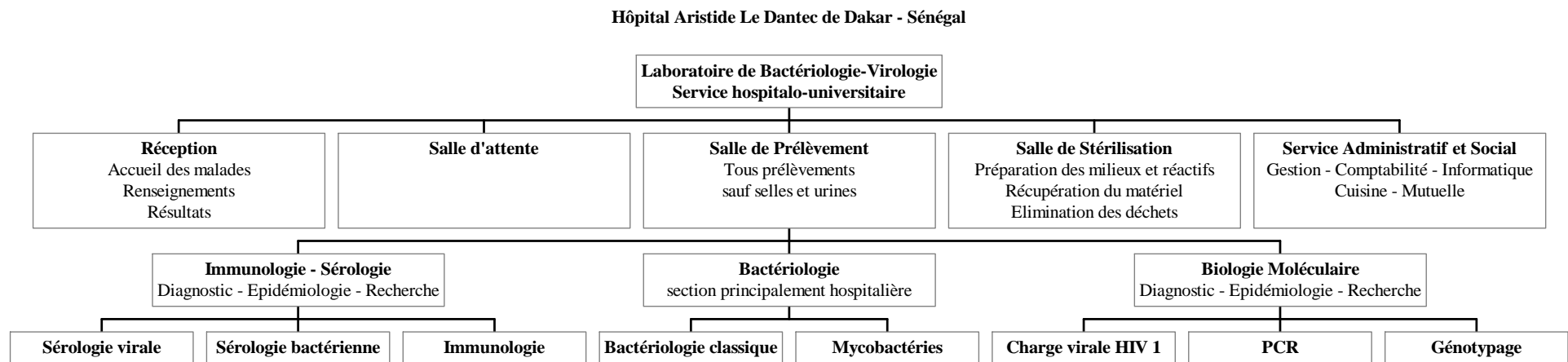


Figure 1 : Organigramme du laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'hôpital Aristide le Dantec

Nous allons pour des raisons pratiques, présenter uniquement les sections dans lesquelles nous avons travaillé :

- accueil ;
- unité de bactériologie ;
- unité de stérilisation ;

2-1- L'accueil

Nous y trouvons un guichet, un bureau et des placards où sont rangés les feuilles de travail, les feuilles de « listing » et un ordinateur qui fonctionne en réseau avec les autres ordinateurs de l'Unité de Bactériologie.

C'est à ce niveau que s'établit le premier contact avec le malade : il y trouvera les renseignements sur les analyses, les conditions d'analyse et la tarification. Le patient est enregistré avec un numéro de code manuellement (listing) et sur l'ordinateur (fichier « Accueil »). Ce local sert aussi de secrétariat car on y remplit les feuilles de travail pour les différentes analyses à effectuer. On y délivre les résultats sous pli fermé aux malades externes ; les agents des services cliniques viennent y chercher les résultats des patients hospitalisés.

Après l'enquête le malade patiente au niveau de la salle d'attente avant d'être reçu au niveau de la salle de prélèvement.

La salle de prélèvement comprend 3 boxes : un premier où l'on effectue les prélèvements de sang et deux autres contigus, munis d'une fenêtre donnant directement sur le laboratoire de

Bactériologie, où sont réalisés tous les autres prélèvements à l'exception des selles et des urines pour lesquels des toilettes, situées dans la cour du service, sont spécialement conçues.

2-2- L'unité de Bactériologie

Elle est divisée en plusieurs paillasse destinées au traitement de tous les produits pathologiques. Nous avons la paillasse des prélèvements génitaux, celle de l'examen cytot bactériologique des urines (ECBU), la paillasse des liquides céphalorachidiens, des selles et des hémocultures, et celle des « Divers » où se fait le traitement de tous les autres produits pathologiques (pus, ascite, liquides d'épanchement, expectoration ...) et enfin la paillasse des antibiogrammes qui permet de tester la sensibilité aux antibiotiques de toutes les souches bactériennes isolées et identifiées.

2-3-La salle de stérilisation

C'est une unité incontournable. A ce niveau s'effectuent :

- la préparation des milieux de culture et des réactifs, leur conditionnement et leur stérilisation ;
- la décontamination du matériel et des produits biologiques avant leur récupération ou élimination selon le cas ;
- le nettoyage du matériel avant le recyclage.

MATERIEL
ET
METHODES

1- MATÉRIEL

Pour la mise en place, nous sommes pratiquement partis de néant dans la mesure où même les locaux ont été refaits.

Pour la réalisation de ce travail, nous avons utilisé les fiches et fichiers d'inventaire ainsi que les bons de commande qui nous ont permis d'acquérir le matériel et les réactifs qui serviront à l'activité au sein de l'unité (voir Annexes).

2- MÉTHODOLOGIE

2-1 Réfection des locaux

Les anciens locaux étaient constitués de 2 pièces communicant par une porte.

La première, où se trouvaient le congélateur -86°C, l'armoire frigorifique et le microscope, servait à la fois de secrétariat, réception des prélèvements, de salle de coloration et de lecture de l'examen microscopique.

La deuxième qui était la salle de culture avait comme équipement une hotte microbiologique, une centrifugeuse et 2 étuves à CO₂ de 100 litres.

Il est à signaler que le carrelage de ces pièces était très ancien et comportant des porosités qui retenaient saletés et poussières.

Il nous a donc fallu faire quelques travaux de maçonnerie (pour agrandir et séparer les locaux et refaire le carrelage), du carrelage, de la menuiserie bois et métallique et reprendre les circuits électriques et du téléphone.

2-2 Équipement du laboratoire

Cela n'a été possible que par la demande de subvention qui a été accordée par l'agence japonaise de coopération internationale (JICA) en plus du budget d'investissement de l'hôpital. Mais nous avons aussi récupéré du matériel des différents partenaires au développement du laboratoire.

2-3 Recrutement du personnel

La suspension des activités de l'ancienne unité a coïncidé avec le départ des membres de son personnel, un biologiste et un technicien pour motif de démission et un pharmacien pour motif de mutation ; donc il nous a fallu doter la nouvelle unité de nouveau personnel et nous avons procédé à une mutation de personnel et un recrutement par l'hôpital.

2-4 Acquisition de consommables, réactifs et milieux de culture.

Ici aussi, nous avons eu recours au partenariat extérieur pour la majorité des produits mais l'hôpital et le Programme National de Lutte contre la Tuberculose ont participé à l'approvisionnement.

2-5 Préparation des manuels de procédures

Nous avons utilisés les techniques en vigueur au laboratoire améliorées par les résultats de nos recherches dans Internet et les discussions avec des spécialistes des Mycobactéries.

2-6 Préparation des réactifs

Ils ont été conçus selon les techniques décrites dans le manuel de procédures.

2-7 Élaboration des résultats

Toutes les étapes de l'analyse sont consignées sur une feuille de travail (voir en Annexes) qui est saisie dans un fichier de base de données (File Maker Pro 6.0). Ce fichier permet aussi l'élaboration des résultats qui sont séquentiels (bacilloscopie, 1^{er} résultat de culture, 2^{ème} résultat de culture puis antibiogramme).

2-8 Réception des premiers prélèvements

Nous avons profité du démarrage d'un programme sur la tuberculose dans le service des Maladies Infectieuses de l'hôpital de Fann pour tester notre système puisque ce programme nous permettait de recevoir régulièrement des prélèvements en petit nombre.

RESULTATS

1- LES LOCAUX

La réfection intervenue à ce niveau a abouti à un laboratoire agrandi. En effet les locaux abritant l'unité des mycobactéries sont constitués, aujourd'hui de quatre pièces qui sont séparées entre elles par des portes qui peuvent être fermées à clé. On y retrouve :

- une pièce servant de secrétariat qui se trouve à l'entrée du laboratoire

- ensuite, une pièce dite « salle des machines » adjacente au secrétariat

- une salle réservée à la préparation des échantillons (étalement, mise en culture) et à l'identification des mycobactéries. C'est la « salle de culture ». Cette salle est divisée en deux boxes dont les dimensions sont telles qu'ils peuvent abriter les hottes ; pour le moment une seule hotte est en place dans le box du fond.

- une pièce (qui se trouve de l'autre côté du secrétariat) pour la préparation des milieux de culture et réactifs, pour la coloration des frottis mais également le stockage des produits chimiques. Elle est encore appelée « salle de préparation ». C'est aussi là que nous avons installé le bureau du responsable de l'unité des mycobactéries.

Les paillasses de toutes les pièces sont carrelées en faïence blanche, facilitant ainsi leur entretien. De même, nous trouvons dans chaque salle un évier pour la source et l'évacuation de l'eau.

Toutes les pièces sont climatisées grâce à des climatiseurs individuels.

2- L'ÉQUIPEMENT DU LABORATOIRE

Nous avons au total :

- un poste de sécurité biologique de type II ;
- une étuve bactériologique d'une capacité de 1000 litres ;
- une étuve bactériologique d'une capacité de 100 litres ;
- deux microscopes à fluorescence ;
- deux microscopes optiques simples ;
- 2 réfrigérateurs (6°C) ;
- un congélateur (-80°C) ;
- un congélateur (-20°C) ;
- 2 centrifugeuses pouvant tourner jusqu'à 5000 tours/min.

Cet équipement est réparti dans les différentes pièces :

- dans la « salle des machines », les deux congélateurs (-80°C) et (-20°C), et un réfrigérateur.

Le réfrigérateur sert au stockage des échantillons avant et après leur traitement dans l'attente d'une suite à donner.

Les congélateurs servent à la conservation de certains réactifs (-20°C) mais aussi à celle des souches isolées dans le laboratoire (-80°C).

C'est dans cette pièce que l'on retrouve les microscopes.

- dans « la salle de culture », le poste de sécurité microbiologique, l'étuve bactériologique et les centrifugeuses.

Toutes les manipulations sont effectuées dans le poste de sécurité microbiologique.

Par ailleurs le laboratoire dispose d'autres équipements.

- Le secrétariat est équipé d'un bureau avec un ordinateur pour le traitement informatique des données relatives à l'unité de bactériologie. Cet ordinateur est branché sur le réseau interne du laboratoire.

- L'équipement de la « salle de préparation » est constitué d'un réfrigérateur, d'un petit autoclave de paillasse et d'un coagulateur.

Le réfrigérateur sert à la conservation des milieux de culture déjà préparés et des réactifs dont la conservation nécessite le froid. L'autoclave permet la stérilisation des milieux de culture et des réactifs. Le coagulateur est utilisé pour la préparation des milieux de culture à base d'œufs comme le milieu de Lowenstein-Jensen.

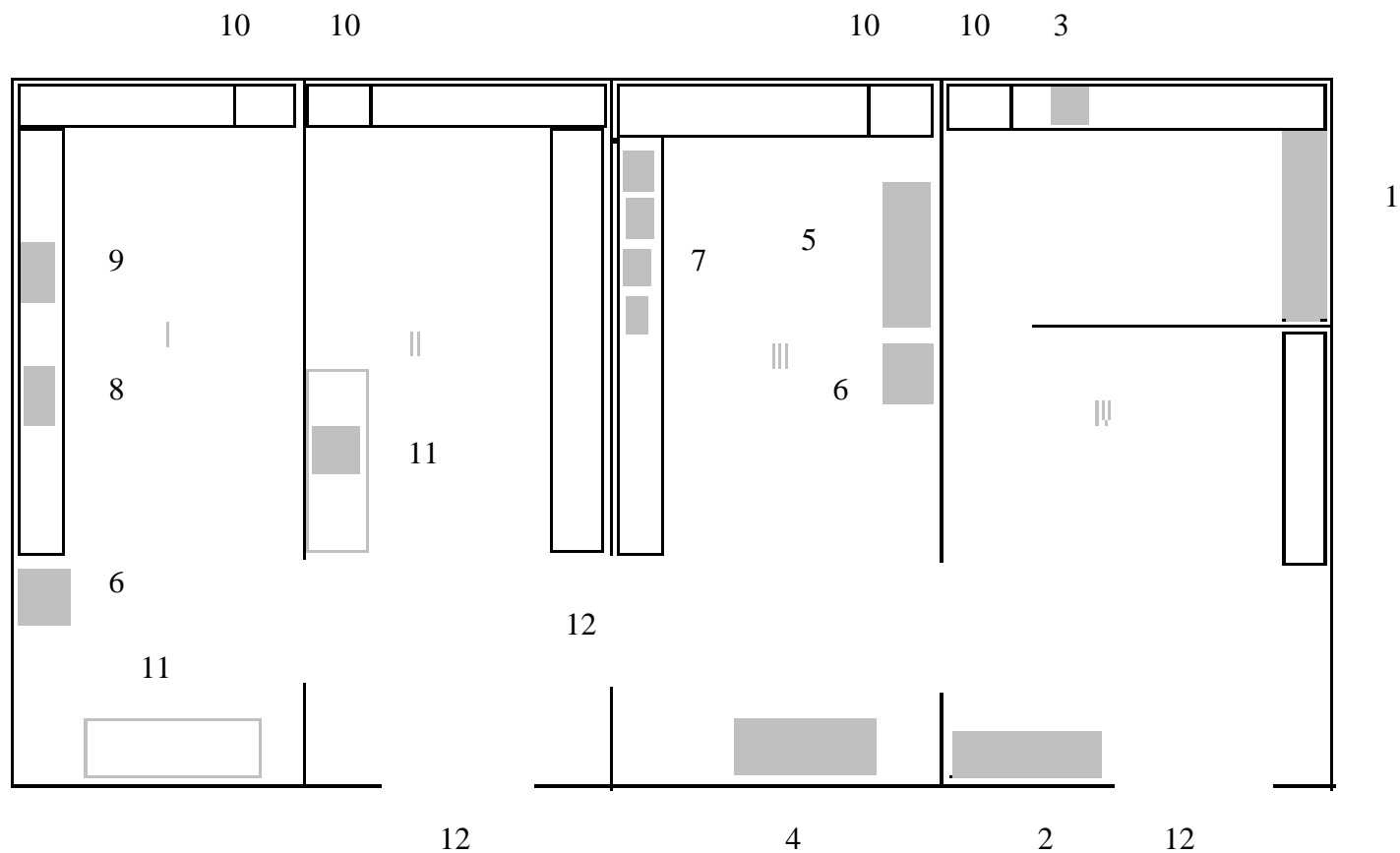


Figure 2 : Plan de l'unité des Mycobactéries

Légende

1 = Hotte	4 = Congélateur -80°	7 = Microscopes	10 = Éviers
2 = Étuve	5 = congélateur -20°	8 = Coagulateur	11 = Bureaux
3 = Centrifugeuse	6 = Réfrigérateurs	9 = Autoclave	12 = Portes

I = Salle de Préparation ; II = Secrétariat ; III = Salle des Machines ; IV = Salle de culture

3 - LE PERSONNEL

Le personnel de l'unité des mycobactéries est limité à un pharmacien-biologiste et un technicien supérieur qui y travaillent à temps plein. Ils sont assignés de manière permanente à l'unité et n'interviennent pas dans le système de rotation du service. Ils sont sous la supervision directe d'un professeur responsable du laboratoire de Bactériologie-Virologie.

4- RÉACTIFS, CONSOMMABLES ET MILIEUX DE CULTURE

Comme précédemment décrit, ils ont été acquis par commande auprès de fournisseurs de la place et dans les tableaux suivants, nous avons énuméré les différents produits selon leur source de financement.

Nous avons donc pu disposer d'une gamme de réactifs pour les tests biochimiques mais aussi de milieux de culture. Ces derniers étant disponibles aussi bien sous forme prête à l'emploi que sous forme déshydratée.

Nous signalerons que certains produits et petits matériels étaient déjà disponibles dans le service.

Tableau VIII : Commande du PNT

Désignation	Quantité
Lames porte-objet (avec plage d'identification) B/50	1 20
Boîte de rangement de lames	30
Manche de Kolle (ensemenceur)	10
Anse pour manche de Kolle (fil de platine) rouleau	2
Crachoir (carton de 1000)	6
Flacon de fuchsine basique	15
Flacon de bleu de méthylène	15
Acide sulfurique (flacon 2,5 litres)	2
Méthanol (flacon 2,5 litres)	2
Phénol cristallisé (1 kg)	2
Huile à immersion (flacon)	10
Formulaires pour laboratoire	200

Tableau IX : Commande « Union Européenne et HALD »

Désignation	Unité	Quantité
Milieu de culture		
Milieu de Lowenstein-Jensen	Flacon 500 g	2
Milieu de Dubos	Flacon 500 g	1
Milieu de Coletsos base	Coffret 50 tubes	60
Milieu de Coletsos base + osséine	Coffret 5 tubes	300
Antibiogramme		
Kit Antibiogramme BK	Coffret 30 tubes	50
Kit Pyrazinamide 200 µg	Coffret 8 tubes	20
Réactifs		
Acétate de sodium	Flacon 250 g	1
Aniline	Flacon 500 ml	1
Auramine O	Flacon 25 g	2
Bromure de cyanogène	Flacon 50 g	1
Carbonate de sodium	Flacon 250 g	1
Chlorure de magnésium	Flacon 250 g	1
Dichlorométhane	Flacon 1000 ml	1
Disulfate de phénophtaléine	Flacon 25 g	2
L-Asparagine	Flacon 100 g	1
N-Acétyl-L-Cystéine	Flacon 50 g	5
Phosphate disodique	Flacon 250 g	1
Phosphate monopotassique	Flacon 250 g	1
Phospho-N-phényl-β-D-glucoside	Flacon 250 g	1
Pyruvate de sodium	Flacon 100 g	1
Rouge neutre	Flacon 25 g	1
Rouge thiazine	Flacon 25 g	2
Tampon Tris	Flacon 1 kg	1
Vert malachite oxalate	Flacon 100 g	1
Matériel		
Barreau magnétique 4 cm	Unité	5
Barreau magnétique 6 cm	Unité	5
Boîte de rangement pour cryotubes	Unité	100
Cryotubes de 2 ml	B/500	10
Cryotubes de 5 ml	B/500	10
Flacon stock 1000 ml	Unité	10
Flacon stock 250 ml	Unité	10
Flacon stock 500 ml	Unité	10
Thermomètre digital aimanté	Unité	5
Tubes de 16 avec bouchon bakélite	Unité	3000
Tubes de 18 avec bouchon bakélite	Unité	500
Tubes de 20 avec bouchon bakélite	Unité	500
Tubes coniques stériles 15 ml	B/100	10
Tubes coniques stériles 50 ml	B/100	50
Agitateur Vortex	Unité	2
Bain-marie	Unité	1
Balance portée 1500 g précision 0,1 g	Unité	1

5- PRÉPARATION DES MILIEUX ET RÉACTIFS

5-1 Préparation du milieu de Lowenstein-Jensen

▪ Préparation des œufs

Utiliser des oeufs frais de moins d'une semaine.

Nettoyer à l'aide d'une brosse la coquille avec une solution de soude (NaOH) à 5 %.

Rincer à l'eau puis immerger pendant 15mn dans un bain d'alcool à 70°.

Essuyer avec un chiffon stérile, passer rapidement à la flamme et casser les œufs les uns après les autres dans un récipient stérile.

Homogénéiser au mixer, toujours dans des conditions aseptiques.

Remarques :

- Il faut éviter d'inclure des bulles d'air durant la casse et l'homogénéisation.
- Il faut prévoir suffisamment d'œufs pour obtenir un volume total de 1000ml d'œufs entiers, soit environ 24 œufs.

■ Préparation du milieu

Elle est réalisée à partir du milieu de base déshydraté dont la formule en g/l est la suivante :

Phosphate monopotassique	2,4
Sulfate de magnésium	0,24
Citrate de magnésium	0,6
Asparagine anhydre	3,6
Fécule de pomme de terre	30
Vert malachite	0,4

Mettre 37,2g de milieu déshydraté de Lowenstein –Jensen dans 600 ml d'eau distillée froide contenant 12 ml de glycérol.

Mélanger jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène.

Chauffer lentement en agitant constamment puis porter à ébullition pendant 1 à 2 minutes.

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Filtrer avec une bande de gaze stérile, les œufs déjà préparés, directement dans le récipient contenant le milieu.

Mélanger aseptiquement 600 ml de base stérile et refroidie à 45-50°C et 1000 ml d'œufs entiers, toujours en évitant d'inclure des bulles d'air.

Répartir stérilement le milieu complet en tubes bouchés à vis avec un volume de 7 ml.

Coaguler en position inclinée au four à 80°C pendant 45 minutes.

Remarque :

Les tubes doivent être stockés à + 4°C et à l'obscurité, en évitant toute dessiccation

5-2 Préparation des solutions pour la digestion / décontami-nation par la méthode de KUBICA

■ Solution de N- Acétyl L cystéine (NALC) / soude

Mélanger 100 ml de solution de soude (NaOH) à 4 % et
100 ml de solution de citrate de sodium à 2,9 % dans un flacon

Stériliser 20 minutes à 115°C

Ajouter 1g de NALC dans le mélange préalablement
préparé (200 ml de solution soude /citrate)

Dissoudre et distribuer stérilement 2 ml de la solution de
NALC/ soude dans des tubes

Conserver les aliquotes à -20°C

Remarques :

- La solution soude /citrate se conserve à température
ambiante et à l'obscurité
- Le mélange NALC/soude se conserve pendant 24
heures à 4°C

■ Solution neutralisante au tampon phosphate

Dissoudre 3,40 g de phosphate monopotassique (KH_2PO_4)
et 3,55g de phosphate disodique (Na_2HPO_4) dans 1000ml d'eau
distillée et ajuster le pH à 6,8

Distribuer 18 ml de tampon phosphate dans des tubes
stériles

Stériliser les tubes à 115°C pendant 20 minutes

5-3 Préparation des réactifs pour la coloration

5-3-1 Réactifs pour la coloration de Ziehl-Neelsen

* Réactifs

Tenir à l'abri de la lumière et à une température inférieure à 25°C pour les colorants 1 et 2).

1) FUCHSINE PHENIQUEE :

(Tenir à l'abri de la lumière et filtrer avant usage).

Eau distillée : 2000 ml

Fuchsine basique : 20 g

Phénol aqueux : 100 ml

Alcool à 95 ° : 200 ml

2) BLEU DE METHYLENE :

(Tenir à l'abri de la lumière et filtrer avant usage).

Eau distillée : 2000 ml

Bleu de méthylène médicinal : 40 g

Phénol aqueux : 40 ml

Alcool à 95 ° : 200 ml

3) ACIDE :

Eau distillée : 1500 ml

Acide sulfurique : 500 ml

4) ALCOOL :

Alcool à 100° (éthanol absolu)

5-3-2 Pour la coloration de Degommier

* Réactifs

Tenir à l'abri de la lumière et à une température inférieure à 25°C pour les colorants 1 et 2.

1) AURAMINE :

Eau distillée tiède : 2000 ml

Auramine : 2 g

Agiter en chauffant jusqu'à dissolution.

Solution aqueuse à 10 % de MgCl_2 : 4 ml

Phénol aqueux : 40 ml

Agiter et filtrer.

2) ROUGE DE THIAZINE :

Eau distillée tiède : 2000 ml

Rouge de thiazine : 2 g

Agiter en chauffant jusqu'à dissolution.

Solution aqueuse à 10 % de MgCl_2 : 4 ml

Phénol aqueux : 40 ml

Agiter et filtrer.

3) ALCOOL-ACIDE :

Alcool à 95° : 2000 ml

HCl : 10 ml

4) METHANOL

6- MANUEL DES PROCÉDURES ET CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les manuels de procédures du laboratoire font une description complète des techniques utilisées au laboratoire et du contrôle de qualité.

6-1 Les procédures

6-1-1 Recueil et acheminement des prélèvements

Les prélèvements sont très divers mais les produits d'expectorations en constituent la grande majorité.

Le recueil de ces expectorations se fait selon les nouvelles recommandations de l'UICMTMR :

- l'examen de trois échantillons d'expectorations : un premier échantillon « sur place » plus un échantillon « du matin » plus un deuxième échantillon « sur place » pour le diagnostic des formes pulmonaires ;

Ces échantillons sont recueillis en deux jours de suite.

- l'examen d'un échantillon unique d'expectoration « du matin » à trois reprises pour le suivi du traitement : une fois à la fin

de la phase intensive, une fois au cours de la phase de continuation et une fois à la fin du traitement.

6-1-2 L'identification des échantillons

Un numéro d'identification appelé « code patient » est attribué au prélèvement au niveau de l'accueil du service.

En effet, à ce niveau est tenu un registre du laboratoire où sont mentionnés l'identité du patient, l'examen demandé et tous les patients sont identifiés par des numéros d'ordre.

Ce numéro commence par 1 le 1^{er} Janvier de chaque année et augmente de 1 à chaque patient jusqu'au 31 Décembre de la même année et chaque patient garde le même numéro durant cette même année.

Pour chaque patient ce numéro d'ordre ou code patient est reporté sur la fiche de demande d'analyse, sur le bulletin de travail et sur les récipients de recueil.

Pour les expectorations, les crachoirs portent en plus du code patient le numéro d'identification de la séquence des échantillons, c'est à dire 1 pour le premier, 2 pour le deuxième et 3 pour le troisième prélèvement.

Pour éviter des erreurs par confusion, les codes patients suivis des numéros d'identification de la séquence sont mentionnés sur les lames et les tubes pour culture.

6-1-3 L'examen macroscopique

Les échantillons reçus font l'objet d'un examen macroscopique qui permet de les classer. Par exemple, un échantillon d'expectoration est classifié comme :

- « salivaire » lorsqu'il est constitué principalement de salive,
- « muqueux » si le mucus est dominant,

- « purulent » lorsqu'il est jaune,
- « mucopurulent » lorsque des particules jaunâtres sont visibles au sein du mucus,
- « sanglant » lorsqu'il contient du sang.

6-1-4 La digestion – décontamination

Parmi les quatre méthodes de décontamination actuellement préconisées, celle décrite par Kubica a été choisie.

Elle utilise la N-Acétyl-L cystéine pour l'homogénéisation et la fluidification et la soude comme décontaminant.

Cette étape est suivie d'une neutralisation par le tampon phosphate puis d'une centrifugation.

*** Technique de Kubica**

Prélèvement :

2 ml de l'échantillon

Homogénéisation et décontamination :

Ajouter 2 ml de la solution N-acétyl-L-cystéine/soude

Vortexer pendant 1 minute

Neutralisation :

Ajouter 18 ml de tampon phosphate

Concentration :

Centrifuger à 3500 tours/minute pendant 20 minutes.

C'est avec ces culots de centrifugation que les frottis sont confectionnés pour l'examen microscopique et ils constituent aussi l'inoculum des milieux de culture après leur reprise par 2 ml de

solution tampon phosphate. Il est à noter que pour tous les prélèvements, une partie du produit décontaminé est conservée.

6-1-5 L'examen microscopique

Elle est effectuée après coloration.

*** Coloration de Degommier :**

- auramine, 15 mm, puis rincer à l'eau distillée ;
- méthanol, 2 minutes, puis rincer à l'eau distillée ;
- alcool-acide, 5 minutes, puis rincer à l'eau distillée ;
- rouge de thiazine, 1 minute 30 secondes, puis rincer à l'eau distillée.

Au terme de cette coloration les BAAR apparaissent en vert jaune brillant sur fond rouge sombre.

NB : À la place rouge de thiazine, le permanganate de potassium (KMnO₄) ou l'acridine orange peuvent être utilisés comme contre colorants.

*** Coloration de Ziehl-Neelsen :**

- fuchsine phéniquée, 10 minutes (chauffer 3 fois jusqu'à émission de vapeur), puis rincer à l'eau ;
- acide sulfurique à 25 %, 3 minutes, puis rincer à l'eau ;
- alcool à 95°, 5 minutes, puis rincer à l'eau ;
- bleu de méthylène, 30 secondes (2 minutes, si recherche d'une contamination sur un milieu liquide).

Après coloration selon la technique de Ziehl-Neelsen, la lecture est effectuée au microscope optique à l'objectif X 100 avec huile à immersion.

Au bout de cette coloration, les mycobactéries apparaissent comme de fins bâtonnets plus ou moins réguliers, roses sur fond bleu.

Les lames sont d'abord colorées à l'auramine et la présence de BAAR est confirmée par la coloration de Ziehl-Neelsen.

Contrairement aux frottis colorés par la méthode de Ziehl-Neelsen dont la lecture peut être différée, ceux colorés à l'auramine doivent être lus le plus tôt possible.

Pour cette raison, ils ne seront colorés que quand leur lecture est effectuée le même jour. A défaut d'être lus le même jour, les lames colorées à l'auramine seront conservées à 37°C à l'étuve pendant 24 heures au maximum.

6-1-6 La mise en culture

Après la digestion-décontamination, les culots de centrifugation des échantillons sont mis en culture sur milieux à base d'œufs : LJ (2 tubes), Coletsos Base (1 tube) et Coletsos Base + osséine (1 tube) et sur milieu liquide BIO FM (1 tube).

L'ensemencement de ces milieux est effectué en inoculant 0, 2 ml du culot repris dans la solution tampon phosphate stérile.

Pour les milieux solides il est effectué de telle sorte que l'inoculum couvre toute la surface du milieu alors que le milieu liquide ne demande qu'une agitation.

L'incubation est faite à l'étuve à 37 °C pour tous les milieux.

Les tubes de milieux solides à l'œuf sont légèrement vissés pendant 48 heures avant d'être bouchés hermétiquement.

Les tubes ensemencés et incubés sont contrôlés régulièrement et c'est ce qui permet de dégager les résultats de culture au fur et à mesure.

6-1-7- L'incubation des cultures

L'incubation des cultures se poursuit chaque semaine pendant huit semaines. Au bout de ce délai, les cultures sont considérées comme négatives en l'absence de pousse, exception faite pour les échantillons à microscopie positive qui sont gardés trois mois.

Les cultures souillées seront éliminées, les échantillons correspondants décontaminés de nouveau et réensemencés.

6-1-8- L'identification des espèces de mycobactéries isolées

Les souches de mycobactéries isolées feront l'objet d'une identification complète.

Celle des espèces du complexe *tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) utilisera la production d'acide nicotinique, la réduction des nitrates en nitrites et l'activité catalasique. A ces tests, s'ajoutent la recherche d'amidases (uréase, nicotinamidase, pyrazinamidase) et la recherche de croissance en présence d'inhibiteurs (TCH, PAS, CS, TB1).

Pour les mycobactéries atypiques, en plus de ces tests, d'autres sont nécessaires pour arriver à leur identification complète.

Températures de croissance

La vitesse de croissance d'un isolat à différentes températures (24°, 32°, 37° et 42°C) peut être d'un grand intérêt dans l'identification préliminaire mais aussi dans le choix des tests biochimiques ultérieurs.

Si une croissance lente à lieu seulement à 37°C et non à 24° ou 42°C, l'isolat appartient très probablement au complexe *tuberculosis*.

Une croissance lente à 37°C et 42°C avec absence de croissance à 24°C, oriente vers le *MAC*.

La détermination des températures de croissance peut être réalisée, au besoin, sur les souches isolées.

Arylsulfatase

Certaines mycobactéries possèdent une arylsulfatase qui coupe les groupements sulfates du disulfate de phénophtaléine tripotassique.

Ce test présente un intérêt pour la différenciation des mycobactéries atypiques, les mycobactéries du complexe *tuberculosis* donnant toujours une réaction négative. D'autre part, comme beaucoup de mycobactéries atypiques possèdent cette enzyme, les conditions du test doivent être variées pour aider à l'identification.

Le test par la méthode rapide (test de 3 jours) facilite l'identification de *M. xenopi*, *M. triviale* et des mycobactéries du complexe *fortuitum*.

Par contre, la méthode classique (test de 14 jours) aide à l'identification de certaines mycobactéries à croissance lente telles que *M. marinum* et *M. szulgai*.

Hydrolyse du Tween 80

Certaines mycobactéries possèdent des hydrolases capables de libérer de l'acide oléique à partir du polysorbate 80 (Tween 80).

Ce test, utile à l'identification des mycobactéries atypiques non chromogènes (groupe III), sert aussi à distinguer *M. scrofulaceum* (test négatif) de *M. gordonae* et *M. flavescens* (tests positifs).

Tolérance au chlorure de Sodium (NaCl)

Les mycobactéries varient dans leur capacité à croître dans un milieu à 5 % de NaCl. Plusieurs mycobactéries atypiques à croissance rapide et *M. triviale* poussent en présence d'un milieu contenant 5 % de NaCl.

Quelques souches de *M. flavescens* peuvent également croître dans ce milieu.

L'absence de croissance de *M. chelonae* dans ce milieu facilite sa différenciation par rapport aux autres mycobactéries du complexe *fortuitum*.

Amidases

*** Uréase**

La recherche de l'uréase est utile dans l'identification des mycobactéries scotochromogènes mais aussi dans celle des mycobactéries non chromogènes.

M. scrofulaceum, *M. szulgai* et *M. flavescens* ont une uréase tandis que les mycobactéries du MAC, *M. xenopi*, *M. gordonae* et les mycobactéries du complexe *terrae* n'en possèdent pas.

*** Pyrazinamidase**

L'hydrolyse du pyrazinamide par la pyrazinamidase est utile pour séparer *M. marinum* (positif en 4 jours) de *M. kansasii* (négatif).

Les mycobactéries du MAC possèdent aussi une pyrazinamidase et la réaction est positive en 4 jours.

Croissance sur gélose MacConkey sans cristal violet

Le test sur la gélose de MacConkey est intéressant dans la séparation des mycobactéries à croissance rapide. Celles qui sont potentiellement pathogènes poussent sur le milieu alors que les espèces saprophytes sont inhibées par le milieu.

L'épreuve de la capture du fer

Le test de la capture du fer détermine la capacité d'une mycobactérie à convertir le citrate de fer ammoniacal (CFA) en oxyde de fer.

M. chelonae a un test de capture du fer négatif contrairement à *M. smegmatis* et les mycobactéries du complexe *fortuitum* qui convertissent le CFA en oxyde de fer.

Réduction du tellurite

Au cours de leur croissance en milieu liquide, les mycobactéries réduisent le tellurite de potassium en proportions variables.

La capacité des mycobactéries à réduire le tellurite en 3 jours est intéressante pour séparer les mycobactéries du MAC (positive) d'autres mycobactéries non chromogènes.

Bêta glucosidase

Ce test permet de rechercher la bêta glucosidase. Dans cette recherche, le substrat utilisé est une solution de phospho-nitrophényl-bêta-glucoside.

Cette molécule est scindée par l'enzyme présente chez certaines mycobactéries.

Ce test est intéressant dans l'identification des mycobactéries scotochromogènes.

Croissance en présence d'inhibiteurs

L'une des épreuves essentielles de différenciation entre Mycobactéries atypiques et mycobactéries du complexe *tuberculosis* est le PAS. Toutes les mycobactéries atypiques sont résistantes au PAS contrairement aux mycobactéries du complexe *tuberculosis* qui sont sensibles.

La croissance en présence de thiosemicarbazone est en revanche, importante dans la différenciation des espèces des groupes I, II et III.

L'identification des espèces de mycobactéries isolées se fait par des tests biochimiques. Les réactifs utilisés pour les tests biochimiques feront l'objet de contrôles de qualité. Comme pour les milieux de culture, ces réactifs sont contrôlés avec des souches de référence.

6-1-9- Etude de la sensibilité aux antituberculeux

L'étude de la sensibilité aux antituberculeux sera effectuée selon la méthode de proportions en milieu solide de Canetti, Rist et Grosset.

Pour cela le laboratoire dispose de coffrets prêts à l'emploi permettant de tester la sensibilité des espèces de mycobactéries aux quatre antituberculeux majeurs : l'isoniazide, la rifampicine, la streptomycine et l'éthambutol mais aussi à le pyrazinamide.

6-2 Contrôle de qualité interne (CQI)

Le contrôle de qualité interne permet de valider le travail technique en routine. Les procédures de contrôle de qualité visent à évaluer en permanence la qualité des résultats que produit le laboratoire.

Ainsi, les différentes étapes sont contrôlées selon les fiches suivantes :

Tableau X : Fiche de contrôle de qualité

CENTRE HOSPITALIER ARISTIDE LE DANTEC DE DAKAR LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE –VIROLOGIE UNITE DES MYCOBACTERIES		
CQI –P001		
Rédigé par :	Vérifié par :	Approuvé par :
Date :	Date :	Pour application le :
Signature :	Signature :	Signature :

- Contrôle de qualité des milieux de culture préparés au laboratoire

- Pour la préparation :

Tableau XI : Fiche de contrôle de qualité des milieux de culture

Poudre lot N° :	Milieu de culture Désignation :.....	Date de préparation --/--/20- -	Préparateur(s) Nom (s) :	Observations
Fabricant :....	Conditionnement :...	conditionnement :	Prénom(s) :	
Date de fabrication :.../ .../.....		Lot N° :.....	Fonction(s) :	
Date d'expiration : - -/--/20- -				

- Après conditionnement* :

Tableau XII : Fiche de contrôle de qualité des milieux après conditionnement

	Résultats	Normal
Aspect
Couleur
Stérilité : - 4 jours à 37°C - 4 jours à température ambiante	Stérile Stérile
Sensibilité : Souche de référence <i>M. tuberculosis</i>	Pousse

*ces contrôles intéressent également les milieux prêts à l'emploi

Contrôle de qualité des colorants

❖ **Tableau XIII : Fiche de contrôle de qualité des colorants de Ziehl-Neelsen**

	Contrôle (+)	Contrôle (-)	Observations
Réactifs :			
Fuchsine lot			
N° :.....
Bleu de
méthylène lot		
N° :.....		
Acide sulfurique			
lot N° :.....			

❖ **Tableau XIV : Fiche de contrôle de qualité des colorants de Degommier**

	Contrôle (+)	Contrôle (-)	Observations
Réactifs :			
Auramine lot			
N° :.....
Méthanol lot
N° :.....		
Rouge de thiazine		
lot N°:			
.....			
Alcool-acide lot			
N°:.....			

- Contrôle de qualité de l'examen microscopique

Pour la microscopie, le contrôle de qualité intéresse aussi bien les colorants, les techniques de coloration que la lecture microscopique.

Le contrôle de qualité des colorants se fait avec tout nouveau lot. Pour cela des frottis connus positifs et négatifs seront introduits dans les lots de frottis à tester. Ce test permet en même temps de contrôler les techniques de coloration.

Le contrôle de qualité de l'examen microscopique implique un entretien correct des microscopes.

Ce contrôle concerne également la relecture des frottis positifs.

Ainsi les lames positives feront l'objet d'une seconde lecture par un nouveau manipulateur.

Tableau XV : Fiche de contrôle de qualité de l'examen microscopique

Identification	1 ^{ère} lecture	2 ^{ème} lecture*	3 ^{ème} lecture **

* Une 2^{ème} lecture doit être effectuée en présence de BAAR à la 1^{ère} lecture

** En cas de discordance entre les deux premières lectures, une 3^{ème} lecture doit être réalisée

- Contrôle de qualité de la digestion-décontamination

Prendre 3 prélèvements d'expectorations et les ensemercer avant et après décontamination, sur milieu à l'œuf

Incuber pendant 24 à 48 heures à 37°C

Compter le nombre de colonies, en comparant pour chaque échantillon, les tubesensemencés avant et après décontamination

Déterminer N le rapport entre le nombre de colonies avec les tubesensemencés après décontamination et le nombre de colonies avec les tubesensemencés avant décontamination.

Tableau XVI : Résultats du contrôle de la digestion/décontamination

Résultats	Conclusion
N<3%	décontamination trop poussée
3%<N<5%	décontamination acceptable
N>5%	décontamination faible ou incomplète

- Le contrôle de qualité du matériel

En plus des contrôles effectués au cours de la réalisation des analyses, le matériel fait également l'objet d'un contrôle de qualité.

Le matériel est constitué entre autres par les étuves, les agitateurs magnétiques, les réfrigérateurs, les congélateurs, les microscopes, les balances. Ce matériel ne donne pas directement des résultats mais leur qualité intervient dans leur variabilité.

Pour ce matériel, la traçabilité tient une place importante.

Dans le cadre du contrôle de qualité de ce matériel, un inventaire complet de chaque appareil est tenu à jour.

Pour les réfrigérateurs, les congélateurs et l'étuve, le contrôle thermique a commencé depuis leur mise en marche.

Ce contrôle thermique est effectué en faisant un relevé quotidien des températures de ces machines.

Ce contrôle est facilité par l'existence de thermomètres à affichage numérique incorporés dans ces machines.

6-3- Le contrôle externe de la qualité

Comme toute structure impliquée dans le diagnostic de la tuberculose, l'unité des mycobactéries est soumise au programme national d'évaluation externe de la qualité.

Au Sénégal, ce contrôle externe de la qualité est assuré par le programme national de lutte contre la tuberculose (PNT).

Pour ce contrôle, le PNT procède à une collecte des lames au niveau des laboratoires périphériques. Cette collecte se fait par trimestre et selon une procédure déterminée.

Le PNT assure également le contrôle externe de la qualité des milieux de culture.

D'autre part, le laboratoire compte participer à des contrôles externes de qualité organisés par des sociétés scientifiques spécialisées en mycobactériologie.

6-4- L'évaluation du système de qualité

L'unité des mycobactéries compte mettre sur place un programme d'audit interne qualité. Cet audit se fera selon un calendrier déterminé et fera appel au personnel des autres unités du service comme l'Immunologie-Sérologie et la biologie moléculaire.

Cet audit interne qualité est facilement réalisable, contrairement à l'audit externe qualité. En effet, cet audit externe

qualité est du ressort d'organismes spécialisés et est basé sur des référentiels établis par ces derniers.

7- RÉCEPTION DES PREMIERS PRÉLÈVEMENTS

Comme précédemment énoncé le laboratoire a commencé à recevoir les premiers prélèvements. Ces prélèvements sont reçus pour une phase test du laboratoire qui a commencé depuis le début du mois de Novembre et prévu pour une durée de trois mois. C'est au bout de cette phase que la notification des activités du laboratoire sera faite auprès des cliniciens.

Ces prélèvements sont recueillis au niveau du service des Maladies Infectieuses de Fann et sont acheminés au laboratoire.

Pour cette phase test du laboratoire tous les échantillons sont envoyés dans le cadre de dépistage.

Toutefois la maîtrise du recueil et de l'acheminement des échantillons est délicate d'autant plus qu'elles font intervenir d'autres acteurs qui sont extérieurs au laboratoire.

Pour les expectorations, la qualité des échantillons dépend directement des patients et des indications leur seront données au moment de faire le recueil.

Les prélèvements sont acheminés au laboratoire accompagnés de bulletins de demande d'analyses qui comporte entre autres l'identité du patient (nom, prénom, âge, sexe), le motif de la prescription, la date et l'heure du prélèvement, son adresse et sa profession.

Au niveau du laboratoire, la date de réception des échantillons est toujours mentionnée et permet d'avoir des renseignements sur le délai de transmission.

Résultats des premiers prélèvements

Depuis le début de cette phase test, 24 échantillons d'expectorations provenant de 8 patients ont été reçus et traités.

Sur les 8 patients, 2 ont présenté des BAAR à l'examen microscopique et pour ces patients les trois échantillons sont tous positifs.

En effet les prélèvements de 6 patients (soit 18 échantillons) sont négatifs après 1 mois d'incubation à 37 ° C à l'étuve. Tous ces échantillons sont, par ailleurs, négatifs à la microscopie.

Parmi les patients positifs à la microscopie, seul un a donné pour le moment une culture positive avec le milieu liquide (BIO-FM[®]) à la deuxième semaine et cette culture n'est encore apparue qu'avec un seul des échantillons. Aucune culture n'est encore visible sur les milieux de Coletsos.

Pour l'autre patient positif à la bacilloscopie, les cultures sont négatives à la troisième semaine.

COMMENTAIRES

Aménagement des locaux

Cet aménagement découle des recommandations de DIOP H. (9) et a abouti à l'agrandissement de l'unité qui compte désormais quatre pièces à la place de deux.

Cependant les produits pathologiques traversent 2 fois le secrétariat (à l'entrée et pour aller à la coloration).

Par conséquent, il faudrait effectuer ces colorations dans la « salle des machines » ; ce qui permettrait de limiter les produits pathologiques aux deux pièces (Salle de culture et salle des machines).

Il permettra en même temps faire de la « salle de préparation » une salle « stérile ».

Le personnel

Il avait fait l'objet de recommandations de la part de DIOP H. En effet, il avait été noté son nombre insuffisant pour prendre en charge toutes les activités de l'unité des mycobactéries et cette situation demeure, même si les nouveaux membres du personnel sont nouvellement recrutés.

Examen microscopique

La coloration de Ziehl- Neelsen est la technique de référence pour les mycobactéries .Cependant la lecture des frottis se fait sur au moins 300 champs avant de rendre un résultat négatif, ce qui demande un minimum de 20 minutes par lame.

Cela représente l'inconvénient majeur de cette technique pour l'observation en série de nombreux frottis.

D'où l'utilisation de la technique de coloration à l'auramine phéniquée qui présente les mêmes propriétés que la fuchsine pour colorer les mycobactéries. Elle permet la mise en évidence d'un

plus grand nombre de BAAR et une exploration plus rapide du frottis (5 minutes ou moins).

Cette coloration, du fait d'une lecture à un plus faible grossissement a démontré une meilleure sensibilité que celle de Ziehl-Neelsen, exposant ainsi à un risque élevé de faux positifs.

C'est sur la base de ces considérations que le laboratoire compte utiliser d'abord la coloration à l'auramine (meilleure sensibilité) et les frottis positifs sont confirmés par technique de référence (meilleure spécificité) ce qui permet de diminuer les faux positifs.

Aujourd'hui la coloration est limitée à la seule technique de Ziehl-Neelsen et le laboratoire attend toujours de la part de ses fournisseurs la livraison des réactifs pour la coloration à l'auramine.

Digestion- décontamination

Le choix de la méthode de Kubica se justifie par plusieurs raisons :

- les méthodes de Petroff (Na OH à 4 %) et de Lowenstein (H₂SO₄ à 4 %) demandent un respect strict du temps de décontamination du fait de la toxicité de ces agents (soude et acide sulfurique) pour les mycobactéries ;
- la méthode au laurylsulfate de sodium est décrite comme incompatible avec certains milieux de culture (Bactec system) ;
- c'est la seule qui peut être utilisée pour l'ensemencement des milieux gélosés et des milieux liquides.

Toutefois le N- Acétyl- L- Cystéine perd rapidement son activité mycolytique et doit être utilisé au maximum 24 à 48 heures après sa mise en solution (Solution Citrate de sodium / soude).

Culture

Les prélèvements déjà traités au laboratoire n'ont pas étéensemencés sur milieux de Lowenstein-Jensen. Ils l'ont plutôt été sur milieu Coletsos base, Coletsos base + Osséine et sur BIO-FM[®].

Ces derniers sont disponibles au laboratoire sous formes prêtes à l'emploi contrairement au LJ qui est disponible sous forme de poudre déshydratée et nécessite une préparation.

Cependant cette préparation n'est pas encore possible au laboratoire du fait de l'encombrement de la salle prévue à cet effet.

Le contrôle de qualité des milieux de culture et des réactifs pour les tests biochimiques nécessite l'utilisation de souches de référence, et ces souches n'ont pas encore été acquises par le laboratoire.

La sécurité

La visite médicale semestrielle préconisée pour le personnel n'est pas encore effectuée malgré le démarrage des activités.

La hotte de sécurité est bien dotée d'une lampe à rayons UV, mais une autre baladeuse ou fixée au plafond serait la bienvenue pour rendre stérile, la salle de culture.

Conclusion

Le diagnostic des infections à Mycobactéries est important en Santé Publique. Il permet non seulement le dépistage des cas mais aussi le suivi thérapeutique des personnes infectées.

Seulement, il requiert un équipement lourd et cher, un personnel qualifié et expérimenté mais et surtout toutes les manipulations doivent être entourées d'une grande sécurité qui préservera des contaminations des produits biologiques mais aussi du personnel.

C'est pour cela que les activités de l'unité des Mycobactéries du laboratoire de Bactériologie-Virologie avaient été suspendues en 2001 pour des raisons techniques.

Depuis, notre objectif était de mettre sur pied une nouvelle unité en respectant au maximum les règles technique et de sécurité.

Ainsi, la première étape de cette mise en place fut la réfection des locaux procédant à une compartimentation et une sécurisation des revêtements les rendant étanches à la poussière et facilitant leur entretien.

Ensuite il a fallu équiper ces locaux ; le gros équipement est constitué de :

- 1 enceinte de sécurité microbiologique de classe II
- 2 congélateurs de -80°C et -20°C
- 2 réfrigérateurs
- 1 centrifugeuse
- 2 microscopes optiques simples
- 2 microscopes à fluorescence
- 2 étuves de 1000 litres et de 100 litres
- 1 coagulateur
- 1 autoclave de paillasse

L'expression exacte des besoins en petit matériel et consommables a permis de doter l'unité de la presque totalité de ces derniers ; nous citerons

- les différents agitateurs
- 1 balance
- les micropipettes de différents volumes ainsi que les embouts correspondants
- de la verrerie
- et de divers accessoires de laboratoire

L'étape suivante a été la commande des réactifs et milieux de culture.

Puis il a été procédé au recrutement du personnel qui est constitué d'un pharmacien-biologiste et d'un technicien supérieur de laboratoire.

C'est ainsi que le manuel des procédures a pu être rédigé. Ce manuel comporte la description de toutes les étapes du traitement des produits pathologiques depuis le prélèvement jusqu'à la réalisation de l'antibiogramme, de même que les techniques de conservation soit du produit pathologique, soit de la souche bactérienne isolée.

Dans ce manuel, nous avons aussi consigné les modalités du contrôle de qualité aussi bien interne qu'externe.

Nous avons débuté les activités de l'unité par l'analyse de prélèvements arrivant de manière régulière et surtout en petit nombre.

Après la réception et l'enregistrement des prélèvements, un examen macroscopique est effectué et le résultat est consigné sur la feuille de travail.

Pour l'examen microscopique, nous avons opté pour un dépistage par coloration fluorescente à l'auramine puis une confirmation par la coloration de référence de Ziehl-Neelsen.

La culture se fait sur différents milieux :

- 1 BIO-FM[®]
- 1 Coletsos base
- 1 Coletsos base + osséine

L'antibiogramme est réalisé grâce à un kit prêt à l'emploi et selon la méthode des proportions de Canetti, Rist et Grosset.

Toutes les étapes du traitement au laboratoire sont enregistrées sur une feuille de travail qui sera à son tour saisie dans l'ordinateur dans un fichier de base de données (File Maker Pro version 6.0). Et à partir de ce même fichier, nous établissons les résultats qui sont séquentiels (bacilloscopie, 1^{er} résultat de culture, 2^{ème} résultat de culture et antibiogramme).

Pour les 8 premiers patients, 24 prélèvements d'expectorations ont été traités. Deux parmi les patients ont eu une bacilloscopie positive et pour l'un, la culture sur BIO-FM[®] a été positive au bout de 15 jours.

La mise sur pied de cette unité n'aurait pu être réalisée n'eût été le multipartenariat.

En effet, nous avons bénéficié de subventions diverses :

- de l'Agence japonaise de la coopération internationale (JICA)
- de Harvard School of Public Health de Boston
- de l'Union Européenne
- de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Montpellier

- du Programme National de Lutte contre la Tuberculose (PNT)
- de Family Health International (FHI)
- du laboratoire BIO 24
- de l'hôpital Aristide le Dantec.

Un premier pas très important vient ainsi d'être franchi avec la mise en place de l'unité des Mycobactéries du laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'hôpital Aristide le Dantec.

L'avenir sera l'amélioration du rendement qui passe par la conformation aux normes techniques et de sécurité et cela pourra être facilité par une formation continue du personnel et une ouverture du laboratoire aux différents partenaires.

La présence d'une unité de Biologie Moléculaire au sein du laboratoire offre aussi d'autres perspectives notamment les recherches sur les résistances aux antituberculeux.

BIBLIOGRAPHIE

1- ANTONIATTI G., DAVIN-REGLI A.

L'assurance qualité au laboratoire de Bactériologie.

In: Freney J. Renaud F., Hansen W., Bollet C.

Précis de bactériologie clinique, Paris : Editions ESKA ;
2000 : 753-766.

2- AVRIL J.L., DABERNAT H.

Bactériologie clinique,

Paris : Ellipses 3^{eme} édition ; 2000 : 471-509.

3- BERCHE P., GAILLARD J.L.

Les mycobactéries de la tuberculose.

In : Bactériologie : Bactéries des infections humaines, Paris :
Médecine – Sciences Flammarion ; 1988 : 407-422.

4- BILLO N.E.

Tendances épidémiologiques de la tuberculose.

Rev. Prat. (Paris) 1996; 46: 1332-5.

**5- CERNOCH P.L., ENNS R.K., SAUBOLLE M.A.,
WALLACE Jr R.J.**

Laboratory diagnosis of the mycobacterioses.

Cumitech 16A, American society for microbiology,
Washington, 1994.

- 6- CHAPMAN A.L., MUNKATA M., WILKINSON K.A.,
PATHAN A.A., EWER K., AYLES H.**

Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV positive individuals by numeration of Mycobacterium tuberculosis – specific T- cells.

AIDS 2002; 16 (17) : 2285-2293.

- 7- DAUTZENBERG B.**

Traitement de la tuberculose.

Rev. Prat. (Paris) 1996 ; 46 : 1350-5.

- 8- DESMEULES M., LAFORGE J., CORNIER Y.,
SOLAL-CELIGNY P., PECHERE J.C.**

Tuberculose pulmonaire In : les infections, Maloine, Paris :
1985 : 148-163.

- 9- DIOP H.**

Identification et sensibilité des mycobactéries isolées dans le laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec.

Thèse Pharm., Dakar : 1999, N°94.

- 10- GAILLARD J.L.**

Les mycobactéries atypiques

In : Bactériologie : Bactéries des infections humaines, Paris :
Médecine – Sciences Flammarion, 1988 : 427-434.

11- GENTILINI M.

Tuberculose In : Médecine tropicale, Paris : Médecine Sciences Flammarion ; 1993 : 309-325.

12- GROSSET J.

Bactériologie de la tuberculose pulmonaire In : Godard Ph., Bousquet J., Michel F.B. Maladies respiratoires, Paris : Masson ; 1993 : 241-245.

13- GROSSET J.

Diagnostic bactériologique de la tuberculose.
Rev.Prat. (Paris) 1996 ; 46 : 1337-43.

14- GROSSET J., BOISVERT H., TRUFFOT-PERNOT C.

Les mycobactéries In : Le Minor L., Veron M.
Bactériologie médicale, Paris : Flammarion ; 1990 : 965-1017.

15- Guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA).

Arrêté du 26 Novembre 1999.
Journal officiel de la République Française du 14 Décembre 1994 ; 17 : 193-201.

16- Herrmann J.L., Lagrange P.

Bactériologie de la tuberculose et des infections à mycobactéries atypiques.
Encyl.Méd.Chir. (Elsevier, Paris) Pneumologie, 6-019-A-34, 1999, 14 p.

17- HUCHON G.

Tuberculose et mycobactérioses non tuberculeuses.
Encycl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Pneumologie,
6, 019-A-33, 1997.

18- KENT P.T., KUBICA G.P.

Public health mycobacteriology: a guide for the level III
laboratory.
U.S. department of health and human services, centers for
disease control, Atlanta: 1985.

**19- LALVANI A., BROOKES R., WILKINSON R.J.,
MALIN A.S., PATHAN A.A., ANDERSEN P.,
DOCKRELL H., PASVOL G., HILL A.V.S.**

Human cytolytic and interferon γ secreting CD8+T
lymphocytes specific for Mycobacterium tuberculosis.
Proc. Natl. Acad. sci. USA 95 (1998).

**20- LE MOEL B., FRANCOUAL J., LAROMIGUIERE M.,
JACOB N.**

Assurance de qualité : contrôle de qualité interne et
évaluation externe de la qualité.
Ann. Biol. Clin 2000 : 103-110.

- 21- MACONDO E.A., BA F., TOURE-KANE N.C.,
KAIRE O., GUEYE-NDIAYE A., GAYE DIALLO A.,
BOYE C.S., MBOUP S.**

Amélioration du diagnostic de la tuberculose par le mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) dans un laboratoire de pays en développement.

Bull. Soc. Pathol. Exot, 2000, 93, 2, 97-100.

- 22- MARCHAL N., BOURDON J.L., RICHARD C.**

Les milieux de culture pour l'identification biochimique des bactéries.

Paris: Edition doin; 1982: 339-362.

- 23- MURRAY J.F.**

Expressions cliniques actuelles de la tuberculose.

Rev. Prat. (Paris) 1996 : 46, 1344-9.

- 24- NICOD L.P.**

Immunologie de la tuberculose.

In : Godard Ph., Bousquet J., Michel F.B.

Paris : Maladies respiratoires, Masson ; 1993 : 225-230.

- 25- NOUHOUAYI A., BERGOGNE-BEREZIN E.**

Etude de la sensibilité des mycobactéries aux antibiotiques :
Techniques et Indications.

La lettre de l'infectiologue – Tome XI – N° 7 –1996.

26- PILLY E.

Tuberculose In:

APPIT, ed. Pilly. Montmerency: 2M2; 1996: 354-359.

27- ROUILLON A.

Epidémiologie de la tuberculose, In :

Godard Ph., Bousquet J., Michel F.B.

Maladies respiratoires, Paris : Masson ; 1993 : 230-233.

28- Union internationale contre la tuberculose et les maladies respiratoires (UICTMR).

Guide technique : Diagnostic de la tuberculose par examen microscopique direct des expectorations dans les pays à faibles revenus.

Cinquième édition, Paris, 2000.

Annexes

Annexe 1	= Fiche d'inventaire des produits chimiques
Annexe 2	= Fiche d'inventaire Matériel, Milieux et Réactifs
Annexe 3	= Bulletin de demande d'analyses
Annexe 4	= Fiche de travail
Annexe 5	= Fiche de résultat de Bacilloscopie
Annexe 6	= Fiche de résultat de culture
Annexe 7	= Fiche de résultat d'antibiogramme
Annexe 8	= Formulaire de collecte des lames pour le contrôle de qualité externe
Annexe 9	= Fiche technique pour la collecte des lames

REPUBLIQUE DU SENEGAL

MINISTERE DE LA SANTE, DE L'HYGIENE
ET DE LA PREVENTION

DIVISION DES MALADIES TRANSMISSIBLES

Programme National de lutte contre la tuberculose

Laboratoire National de Référence

Tél. /Fax : 824 90 09

**FORMULMAIRE DE COLLECTE DE LAMES
POUR LE CONTRÔLE DE QUALITE EXTERNE**

Région -----

Laboratoire -----

Nom du Superviseur -----

Date de la Collecte -----/-----/-----

Période concernée -----

N°	N° LAME	TYPE DE PATIENT	RESULTAT LOCAL	OBSERVATIONS
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				
10.				
11.*				
12.*				
13.*				

* Ces cages ne devront être remplies que pour remplacer les lames non trouvées au cours de l'échantillonnage

FICHE TECHNIQUE POUR LA COLLECTE DES LAMES

Pour obtenir une collection représentative du volume de travail d'un laboratoire, le PNT recommande que les techniciens gardent toutes les lames examinées dans l'ordre sériel du registre indépendamment du résultat de la lame (les 3 lames pour les nouveaux cas et toutes les lames de contrôle).

Procédure pour la collecte d'un échantillon de 10 lames par laboratoire et par trimestre

- Si les lames examinées sont convenablement rangées dans les boîtes à lames (les lames positives et négatives sont gardées selon l'ordre sériel du registre), la sélection se fera à partir du registre comme suit :
 - Estimer le nombre total de lames : N
 - Déterminer le x de l'échantillon : $x = N/10$
 - Commencer l'échantillonnage sur la base du registre par la 1^{ère} lame de la collection + un chiffre aléatoire compris entre 0 et x . Noter son numéro d'identification et son résultat sur la fiche de collecte ;
 - Noter les numéros et les résultats de chaque $x^{ième}$ lame sur la fiche de collecte jusqu'à l'obtention de 10 lames.
 - Chercher ces lames dans la boîte et les emballer pour les expédier au Laboratoire National de Référence, accompagnées de la fiche de collecte dûment remplie ;
 - Si la lame recherchée est introuvable, alors il faut la remplacer par celle qui suit immédiatement dans le registre quelque soit son résultat ; noter son numéro et son résultat dans la partie correspondante aux lames de rechange ;
 - Documenter tous les problèmes rencontrés au cours de la collecte de l'échantillon.
- Si les lames examinées ne sont pas convenablement rangées dans les boîtes à lames ou il s'il manque un grand nombre, alors l'échantillon est obtenu selon le pas de l'échantillonnage ($x = N/10$) appliqué sur la collection des lames présentes.

Une fois l'échantillon collecté, les lames restantes doivent être éliminées.

Cocher dans le registre le numéro du dernier malade de la période de collecte.

