ROYAUME DU MAROC

Ministère de la Santé

Institut National d'Hygiène

المملكـــــة المغربيـــة
ⵜⴰⴳⵍⴷⵉⵜ ⵏ ⵍⵎⵖⵔⵉⴱ
وزارة الصحة
ⵜⴰⵎⴰⵡⴰⵙⵜ ⵏ ⵜⵓⵙⴷⴰⵡⵉⵜ
المعهد الوطني للصحة
ⴰⵙⴳⵎⵉ ⴰⵏⴰⵎⵓⵔ ⵏ ⵜⵣⵓⵣⵜ

Laboratoire National de Référence de la Tuberculose

MANUEL DE CULTURE DES MYCOBACTÉRIES

Institut National d'Hygiène INH

Avec l'appui de Fonds Mondial

Ministère de la Santé

ROYAUME DU MAROC

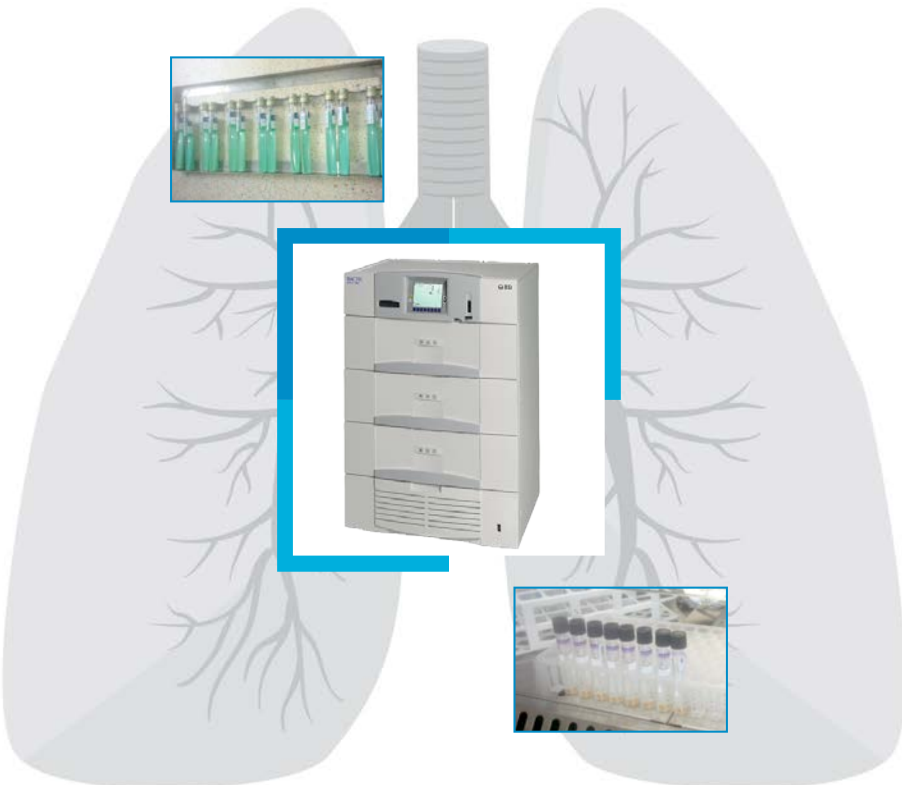
Ministère de la Santé

Institut National d'Hgiène

المملكـــــة المغربيـــة
ⵜⴰⴳⵍⴷⵉⵜ ⵏ ⵍⵎⵖⵔⵉⴱ
وزارة الصحة
ⵜⴰⵎⴰⵡⴰⵙⵜ ⵏ ⵜⴷⵓⵙⵉ
المعهد الوطني للصحة
ⴰⵙⵉⵏⴰⴳ ⴰⵏⴰⵎⵓⵔ ⵏ ⵜⴷⵓⵙⵉ

Laboratoire National de Référence de la Tuberculose

MANUEL DE CULTURE DES MYCOBACTÉRIES



ÉDITION 2017

Ministère de la Santé

AVANT PROPOS

Le diagnostic bactériologique de la tuberculose est posé lorsque la positivité de l'échantillon biologique a été établie par examen microscopique de frottis, mise en culture ou d'autres tests approuvés par l'OMS. La culture des mycobactéries, plus sensible que l'examen microscopique (bacilloscopie), permet l'identification biochimique et l'antibiogramme des bacilles isolés. Elle seule permet le diagnostic de certitude de la tuberculose.

Historiquement, la culture de *Mycobacterium tuberculosis* remonte au 19ème siècle, le temps où Robert Koch a développé les premiers milieux de culture pour isoler et cultiver l'agent pathogène. Actuellement, la culture est toujours d'usage au Maroc et dans beaucoup de pays où la tuberculose sévit.

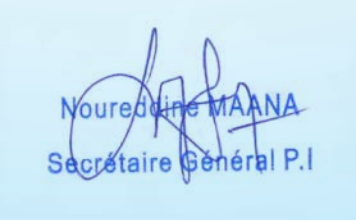
Afin de normaliser, au Maroc, la pratique de culture des mycobactéries, le Laboratoire National de Référence de la Tuberculose de l'Institut National d'Hygiène a élaboré ce manuel. Il est une révision du manuel de culture, édité en 2004, par les mêmes auteurs.

Ce manuel, destiné au personnel des laboratoires de bactériologie médicale, décrit toutes les étapes de la réalisation d'une culture, depuis le recueil des prélèvements jusqu'au rendu des résultats. Il aborde aussi les règles de biosécurité et propose un modèle d'agencement d'un laboratoire de culture.

Réussir la culture de mycobactérie permet de continuer les investigations biologiques en réalisant des tests de sensibilités aux antituberculeux et donc déterminer le niveau de résistance du germe isolé.

Vu l'importance qu'acquière la culture dans la prise en charge des patients tuberculeux et la surveillance de la résistance des mycobactéries circulants, j'encourage vivement l'utilisation, en tant que référence, de ce manuel dans la réalisation de culture et aussi dans la formation continue pour le personnel des laboratoires de culture des mycobactéries.

MAANA Noureddine
Secrétaire Général du Ministère de la Santé (PI)



REMERCIEMENTS

Que toutes les personnes qui ont contribué à la mise à jour de ce manuel trouvent ici nos sentiments de gratitude.

Nous remercions infiniment Dr Mohamed Rhajaoui, Directeur de l'Institut National d'Hygiène, et Dr Réda Charof, chef du Département de Bactériologie, pour leur appui.

Nos remerciements vont également au personnel du Programme National de Lutte Antituberculeuse qui a bien voulu accorder l'appui nécessaire pour la réalisation de ce travail.

Nos remerciements vont également aux responsables au Programme Fonds Mondial.

Ce travail a été élaboré par l'équipe du Laboratoire National de Référence de la Tuberculose sous la direction du Pr Vironique Vincent, Consultante de l'OMS.

Ont participé à l'élaboration de ce travail :

Responsable du Laboratoire National de Référence de la Tuberculose

- *Ouafae Lahlou*

Cadres au Laboratoire National de Référence de la Tuberculose

- *Radia Sabouni,*
- *Nada Bouklata*
- *Wafae Cherki*
- *El Mahfoud Akil*
- *Sanae Jouahri*

SOMMAIRE

Introduction **8**
Aménagement d'un laboratoire de culture **10**
Mesures de sécurité au laboratoire de culture **11**
Mesures générales de biosécurité applicables dans tous les laboratoires de tuberculose 11
Mesures minimale essentielles adaptées au laboratoire de culture (niveau de risque modéré) 11
Bonnes pratiques microbiologiques 11
Matériel et équipement du laboratoire 11
Équipements de protection individuelle 14
Procédure d'intervention d'urgence 15
Matériel et équipement du laboratoire de culture **16**
Équipement 16
Petit matériel 16
Consommables 16
Traitement des expectorations **17**
Méthode de Petroff 17
Préparation des réactifs 17
Matériel nécessaire à la technique 18
Technique 18
Méthode à la N-acétyl-L-cystéine 21
Préparation des réactifs 21
Matériel nécessaire à la technique 22
Technique 23
Traitement des prélèvements autres que les expectorations **24**
Surveillance des cultures et expression des résultats **25**
Incubation 25
Expression des résultats 26
Cultures positives 26
Cultures négatives 28
Indicateur de performance : taux de contamination **29**
Annexe 1 ..... **30**
Exemple de plan d'organisation d'un laboratoire de culture de mycobactéries 30
Annexe 2 ..... **31**
Préparation des milieux solides à l'oeuf 31
Contrôles de qualité des milieux solides à l'oeuf 32
Mesures préventives de contamination inter-prélèvements 33
Annexe 3 ..... **34**
Exemple de cahier de paillasse (de lecture) 34
Annexe 4 ..... **35**
Entretien et maintenance préventive des équipements 35
Autoclave 35
Centrifugeuse 36
Poste de sécurité microbiologique (PSM) 36
Etuve 37
Balance de précision 37
Réfrigérateur 37
Microscope 38
Références bibliographiques **40**

Introduction

La tuberculose (TB) est un problème majeur de santé publique au Maroc. La lutte antituberculeuse est organisée dans le cadre d'un programme spécifique, le Programme National de Lutte Antituberculeuse (PNLAT) dont la mise en ouvre a permis au Maroc d'atteindre dès 1995 les objectifs fixés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), à savoir détecter plus de 80% des cas de tuberculose et obtenir un succès thérapeutique pour plus de 85% des patients. Mais avec 31.542 nouveaux cas toutes formes confondues ont été notifié en 2016, soit une incidence de l'ordre de 91 pour 100.000 habitants, il est clair que la tuberculose restera encore un problème de santé publique pendant plusieurs années.

Le diagnostic bactériologique de TB joue un rôle crucial dans la lutte antituberculeuse. L'identification des cas repose en priorité sur la détection des cas de TB pulmonaire à frottis positifs, c'est-à-dire sur l'examen microscopique systématique des expectorations des suspects, ce qui permet de détecter les cas de tuberculose les plus contagieux. En effet, les patients dont les frottis d'expectorations sont positifs à l'examen microscopique sont porteurs d'un très grand nombre de bacilles et sont responsables de la transmission de la maladie. Le principal inconvénient de la microscopie est son manque de sensibilité car il faut plus de 10.000 bacilles par ml pour que la probabilité de détection soit supérieure à 90%.

La culture bactériologique bénéficie d'une plus grande sensibilité, de l'ordre de 10 BAAR/ml. C'est donc la technique de choix pour le diagnostic de certitude des cas de tuberculose à frottis négatif à l'examen microscopique. De plus, comme toutes les mycobactéries présentent la même propriété d'acido-alcoolo-résistance, seule l'identification de la culture permet de différencier les bacilles de la tuberculose des autres espèces mycobactériennes. Enfin, l'obtention de la culture est le préalable indispensable à la détermination de la sensibilité aux antituberculeux, notamment pour les antibiogrammes élargis aux antituberculeux de deuxième ligne. Même si les méthodes moléculaires de détection de la résistance à la rifampicine peuvent s'affranchir de l'obtention de la culture, les méthodes phénotypiques sur cultures de bacilles restent la méthode de référence des des tests de sensibilité aux antituberculeux.

Au Maroc, les indications de la mise en culture des prélèvements pathologiques pour isolement des bacilles de la tuberculose sont :

- Le diagnostic de TB pulmonaire pour les patients à microscopie négative présentant des symptômes évocateurs de tuberculose, qu'ils soient co-infectés par le VIH ou non;
- Le diagnostic de TB extra-pulmonaire;
- La détermination de la sensibilité aux antituberculeux chez les patients suspects de

TB multi-résistante, soit des contacts de patients MDR présentant eux-mêmes des symptômes évocateurs de TB soit des patients déjà traités et correspondant à des cas de rechute, échec ou reprise après abandon.

Aménagement d'un laboratoire de culture

Un laboratoire de culture de mycobactéries devrait être constitué de :

- Un secrétariat
- Le laboratoire proprement dit
- Une laverie

1 - Le secrétariat

Il doit être constitué d'une salle, avec un bureau et un vestiaire, où doivent être rangés tout le matériel bureautique ainsi que les registres.

2 - Le laboratoire proprement dit

C'est la salle de traitement des prélèvements. Elle comprend deux paillasses simples en L :

- Une paillasse avec évier, pour la préparation des réactifs et des plateaux de milieu de culture. Cette partie est considérée comme une zone propre.
- Une paillasse sur laquelle est installé le matériel de culture, à savoir : la hotte, l'étuve, la centrifugeuse, l'agitateur et la balance roberval. Elle peut servir également à la lecture des cultures.

Comme la décontamination, l'agitation et la centrifugation représentent une source de contamination pour le manipulateur, cette paillasse sera considérée comme une zone à haut risque.

3 – La laverie

C'est une salle munie d'une paillasse facilement lavable avec évier où doivent être installés un autoclave, un poupinel, une étuve séchoir, un distillateur et une poubelle. Des sacs en plastique pour le ramassage des déchets doivent également s'y trouver. Cette salle doit comporter un placard pour y mettre les déchets du petit matériel, de la verrerie et, à défaut d'une réserve, des produits et réactifs.

La disposition du matériel dans ces trois salles pourrait se faire selon le plan proposé en annexe 1.

Mesures de sécurité au laboratoire de culture

Les recommandations de l'OMS sur les mesures de biosécurité minimales à adopter dans les laboratoires de tuberculose s'appuient désormais sur l'évaluation des risques associés aux activités qui y sont réalisées. La probabilité de générer des aérosols infectieux, la viabilité des bacilles de la tuberculose et la charge bacillaire sont des facteurs clés pour déterminer le niveau du risque d'exposition du personnel à l'infection tuberculeuse du fait des techniques pratiquées au laboratoire.

- La microscopie des frottis d'expectorations, quand elle est réalisée selon de bonnes pratiques microbiologiques, comporte un faible risque de générer des aérosols infectieux du fait de la nature plutôt visqueuse des expectorations et de leur faible concentration de particules infectieuses. Cette technique peut être menée sur une paillasse ouverte si la pièce est correctement ventilée.

- Les techniques qui nécessitent de liquéfier les expectorations, comme celles utilisées pour la mise en culture, l'antibiogramme par méthode directe ou la détection des résistances par tests moléculaires sur bandelettes à partir des expectorations, présentent un risque accru (modéré) de générer des aérosols infectieux et doivent donc être pratiquées sous hotte (poste de sécurité microbiologique, PSM).

- La manipulation des cultures (que ce soit pour identification, détermination de la résistance aux antibiotiques par méthode indirecte ou détection des résistances par tests moléculaires sur bandelettes à partir de cultures) implique des étapes où de grandes quantités de bacilles sont présentes avec un risque élevé de générer des aérosols infectieux contenant des concentrations élevées de bacilles de la tuberculose. Ces activités doivent être réservées à des manipulations sous PSM dans un laboratoire de confinement.

Mesures générales de biosécurité applicables dans tous les laboratoires de tuberculose

Chaque technicien est responsable de sa propre sécurité et de celle de ses collègues. Tous les laboratoires, quelles que soient les activités qui y sont réalisées, doivent adopter un ensemble de mesures essentielles de biosécurité pour minimiser les risques d'exposition aux agents infectieux. Les mesures générales concernent :

- L'accès au laboratoire, réservé au seul personnel autorisé, avec interdiction d'y manger, boire ou fumer et d'y conserver des aliments.

- Le port de vêtements de protection.
  - Les blouses doivent être portées pendant toute la durée du travail, rangées séparément des vêtements personnels et ne pas être portées à l'extérieur du laboratoire. Il est souhaitable d'avoir 2 blouses : l'une réservée aux manipulations potentiellement contaminantes et l'autre pour les manipulations propres.

- Les gants doivent être portés pour toutes les procédures qui impliquent un contact avec les prélèvements et tout autre matériel infectieux. Après usage, les gants sont jetés et le lavage des mains est obligatoire.

- Le lavage des mains à l'eau et au savon (friction d'au moins 15 secondes) effectué systématiquement après des manipulations de matériel contaminé et avant de quitter le laboratoire.
- Le respect des bonnes pratiques microbiologiques de manière à minimiser la formation d'aérosols.
- Le respect des zones sale/propre à l'intérieur du laboratoire.
- Le suivi rigoureux des procédures en cas de déversement accidentel de matériel infectieux.
- L'élimination des déchets selon les procédures en vigueur.
- Le nettoyage régulier et la désinfection des surfaces de travail et de l'équipement.
- Un suivi médical régulier du personnel avec radiographie pulmonaire une fois par an.

Mesures minimales essentielles adaptées au laboratoire de culture (niveau de risque modéré)

Bonnes pratiques microbiologiques

Veiller à minimiser la production d'aérosols infectieux par le respect des bonnes pratiques microbiologiques pendant la réalisation des procédures techniques :

- Suivre les consignes décrites ci-dessus pour la préparation des frottis.
- Ne pas expulser la dernière goutte d'une pipette.
- Ne pas expulser l'air d'une pipette dans un liquide potentiellement infectieux.
- Au moment d'utiliser une pipette pour ajouter un réactif à un liquide potentiellement infectieux, placer la pipette contre la paroi interne du conteneur et expulser doucement le réactif.
- Ne pas mélanger ou resuspendre du matériel infectieux par des aspirations et refoulement successifs d'une pipette.
- Ne jamais passer au vortex ni agiter de tube contenant un liquide infectieux si le tube est ouvert.
- Ménager 10-15 minutes de repos pour minimiser la dispersion d'aérosols avant d'ouvrir un tube qui vient d'être agité ou centrifugé.
- Pendant la décantation d'un liquide, s'assurer que les tubes sont bien positionnés

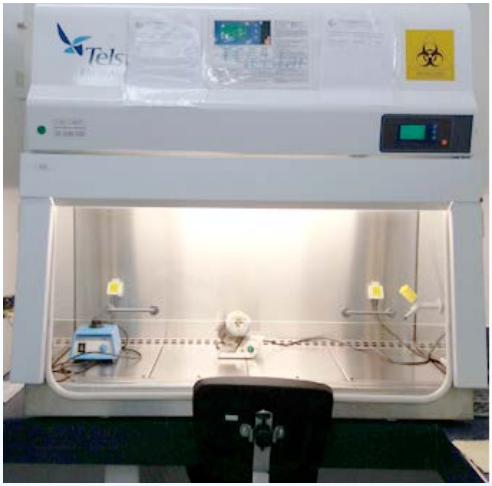
de manière à ce que le liquide coule le long de la paroi du récipient pour minimiser d'éventuelles éclaboussures.

Matériel et équipement du laboratoire.

Le laboratoire de culture doit être séparé des zones de passage non réglementé, à l'intérieur du bâtiment.

Poste de Sécurité Microbiologique (PSM). Dans les laboratoires à niveau de risque modéré, la barrière de protection primaire est assurée par le PSM.

- Toutes les manipulations pour la mise en culture (digestion/liquéfaction) des prélèvements et toute manipulation de prélèvements liquéfiés (pour antibiogramme direct par exemple) doivent être effectuées sous PSM.
- Le PSM doit être placé être situé hors des zones de passage et des courants d'air.
- Le PSM peut être de classe II type A1 ou A2. Les autres types de PSM ne sont pas recommandés.



- Le PSM doit être conçu par un fabricant certifié.
- Une maintenance régulière, au moins une fois par an, est impérative. **Un PSM mal entretenu peut s'avérer plus dangereux que protecteur.**
- Le travail sous PSM doit être organisé de façon à ménager des zones de travail distinctes avec zone «propre» et zone «contaminée» .
- Le plan de travail du PSM ne doit pas être encombré par le matériel au risque de perturber l'efficacité de circulation d'air du PSM.
- Les gestes des opérateurs doivent être lents et éviter le retrait fréquent des bras

pour ne pas perturber le flux d'entrée d'air dans le PSM. Il est recommandé de placer tout le matériel à utiliser dans le PSM avant de commencer la manipulation.

- Si un produit est répandu accidentellement dans un PSM, il faut nettoyer immédiatement le volume de travail pendant que l'enceinte continue à fonctionner. On utilisera à cet effet un désinfectant efficace que l'on devra appliquer en s'efforçant de produire le moins d'aérosols possible. Tout ce qui entre en contact avec le produit répandu doit être désinfecté et éliminé convenablement.

Ventilation

- Outre les PSM qui constituent la barrière de protection primaire, une barrière de protection secondaire doit être constituée par le laboratoire lui-même en maintenant un flux d'air unidirectionnel à travers le laboratoire assurant au moins 6 à 12 changements d'air par heure.

Centrifugeuse

- Les centrifugeuses doivent être équipées de protection anti-aérosols. Les tubes à centrifuger doivent être placés et retirés des godets de sécurité étanches sous PSM exclusivement et jamais sur la paillasse.

Équipements de protection individuelle

Chaque laboratoire doit évaluer le niveau de risque (charge de travail, activités du laboratoire, prévalence de tuberculose et de tuberculose multi-résistante, …) Et décider du niveau de protection appropriée pour le personnel.

- Le port de blouse est obligatoire, comme indiqué plus haut.
- Les gants utilisés sous PSM doivent être changés régulièrement et les mains lavées à chaque changement.
- Les masques respiratoires ne sont pas nécessaires si le travail est effectué selon les bonnes pratiques microbiologiques sous un PSM bien entretenu. En tout état de cause les masques respiratoires ne sont en aucun cas une alternative aux défaillances des PSM. Les masques respiratoires concernent les masques type N95 (US standard NIOSH N95) ou FFP2 (Européen standard EN149 : 2001). Pour rappel, les masques chirurgicaux n'ont d'autre but que de protéger le patient et ne confèrent pas de protection respiratoire à ceux qui les portent.

Procédure d'intervention d'urgence

Lorsque des substances infectieuses, en particulier des cultures, sont répandues au sol, il faut :

1. Impérativement évacuer le laboratoire avant toute tentative de nettoyage.
2. Interdire l'accès au laboratoire pendant au moins 1 heure pour que la ventilation de la pièce entraîne les aérosols vers l'extérieur et que les grosses particules sédimentent.
3. Revêtir des vêtements de protection : blouse, gants, masque respiratoire.
4. Regagner la zone de l'incident.
5. Couvrir la substance répandue à l'aide de lingettes ou de serviettes en papier pour éviter qu'elle ne s'étende.
6. Verser un désinfectant convenable sur les lingettes ou les serviettes ainsi qu'aux abords immédiats de la zone (en général une solution de javel à 5° fera l'affaire).
7. Appliquer le désinfectant de manière concentrique en commençant par le bord extérieur de la souillure et en allant vers le centre.
8. Attendre suffisamment longtemps, de 30 minutes à 1 heure, pour que le désinfectant agisse avant d'enlever la souillure pour l'éliminer. En présence de verre brisé ou d'autres fragments pointus ou tranchants, utiliser une pelle à poussière ou un morceau de carton rigide pour recueillir la substance répandue et la déposer dans un conteneur imperforable en vue de son élimination.
9. Placer tout le restant du matériel contaminé dans un sac fermé en vue de l'éliminer selon les règles.
10. Nettoyer et désinfecter la zone souillée.

Toute personne exposée à cette souillure doit être dirigée vers un service médical.

Messages clés

Le respect des bonnes pratiques microbiologiques est essentiel pour minimiser le risque de production d'aérosols. Les bonnes pratiques microbiologiques sont un code de pratiques de base qui ont pour objectif la prévention de la contamination du personnel de laboratoire ainsi que la prévention de la contamination des échantillons et de l'expérience.

Il est impératif de travailler sous poste de sécurité microbiologique (PSM).

Matériel et équipement du laboratoire de culture

Équipement

- Poste de sécurité microbiologique (PSM) de classe II type A1 ou A2
- Centrifugeuse avec godets de protection anti-aérosols
- Étuve
- Autoclave
- Réfrigérateur
- Distillateur

Petit matériel

- Bec bunsen avec système d'allumage de flamme à la demande ou micro-incinérateur
- Portoir chauffe lames
- Des portoirs avec orifices de 30 mm de diamètre pour les tubes à centrifugation
- Vortex
- Balance de précision
- Balance roberval
- Minuteur
- Mini-broyeur ou mortier (en cas de traitement de biopsies)
- Plateaux métalliques pour étuve
- Récipients pour recevoir surnageants et pipettes contaminées
- Pissettes pour eau de javel

Consommables

- Gants
- Lames
- Tubes à centrifuger, capacité 50ml, plastique transparent ou en verre à parois épaisses, avec bouchons à vis, résistant à une force centrifuge de 3.000 G
- Pipettes (Pasteur) de transfert de 1.0 Ml (avec graduation), stérile, en plastique
- Poires pour pipettes
- Papier pH
- Papier absorbant
- Étiquettes autocollantes
- Sacs poubelles autoclavables
- Cahier de paillasse
- Éprouvettes graduée : 100ml
- Éprouvettes graduée 200ml
- Flacon en verre avec bouchon à vis de 250ml, autoclavable
- Flacon en verre avec bouchon à vis de 150ml, autoclavable
- Pipette de 5ml
- Pipette de transfert 3 ou 5ml, en plastique et stérile
- Registre
- Ruban indicateur de stérilisation
- Spatule
- Coton cardé
- Ballon de 1 litre
- Pots pour pipettes
- Pots pour solutions et matériels contaminé (surnageant et pipette de transfert)
- Papier aluminium

Traitement des expectorations

La méthode consiste à traiter les expectorations pour éliminer la flore indésirable associée. Le traitement appliqué repose sur la plus grande résistance du bacille tuberculeux aux différents agents chimiques (NaOH, H2SO4 et détergents) qui détruisent les autres germes contenus dans l'expectoration. Les bacilles de la tuberculose et autres mycobactéries sont plus résistants que les germes banals aux agents chimiques mais des traitements prolongés ou trop drastiques peuvent également les éliminer complètement. Les temps de traitement et les concentrations de réactifs sont donc à observer avec minutie. Il existe plusieurs méthodes de traitement. Dans ce manuel, seule la méthode de Petroff et celle à la N-acétyl-L-cystéine seront traitées.

Le traitement des échantillons nécessite plusieurs étapes qui exposent à des risques de contamination entre prélèvements traités dans la même série. Des précautions doivent être prises pour prévenir et minimiser ce risque.

Méthode de petroff

Préparation des réactifs :

Matériel nécessaire à la préparation des réactifs :

- Une balance de précision
- Une spatule
- Une éprouvette graduée de 100ml
- Une éprouvette graduée de 200ml
- Une pipette de 5ml
- Des flacons de 30ml avec bouchon à vis
- Des ballons de 1 litre
- Du coton cardé
- Du papier aluminium ou à défaut du papier craft pour faire la pesée.

Préparation de la soude (NaOH) à 4% :

- Peser 4g de pastilles de soude, les introduire dans un flacon propre de 150ml,
- Ajouter 100ml d'eau distillée et mélanger.
- Répartir dans des petits flacons bouchés à vis ; à raison de 25ml par flacon.
- Stériliser à l'autoclave (120°C pendant 15mn) et conserver à la température ambiante.

Préparation de bleu de Bromothymol :

- Dissoudre 1g de bleu de bromothymol dans 250ml d'eau distillée.
- Stériliser à l'autoclave (120°C pendant 15mn) et conserver à la température ambiante.

Préparation de l'acide sulfurique (H_2S0_4) à 4% :

- Verser lentement 4 ml d'acide sulfurique pur dans une éprouvette graduée en verre contenant 50 ml d'eau distillée.
- Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.
- Répartir dans des petits flacons bouchés à vis ; à raison de 25 ml par flacon.
- Stériliser à l'autoclave (120°C pendant 15 mn) et conserver à la température ambiante.
- Ces différents réactifs doivent être gardés à température ambiante pour éviter leur précipitation.

Matériel nécessaire à la technique :

Tout le matériel doit être placé correctement dans le PSM avant de démarrer la technique.

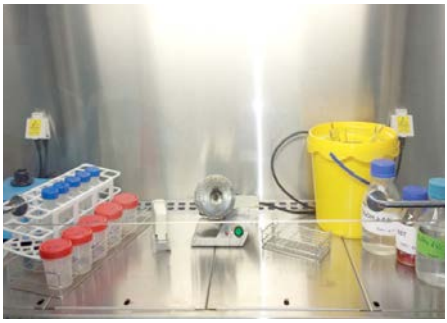
- Un bec à pédale ou bec électrique
- Des portoirs avec orifices de 30 mm de diamètre pour les tubes à centrifugation
- Des portoirs pour tubes de 16
- Des tubes coniques pour centrifugation
- Un pot de pipettes pasteur
- Un pot de pipettes graduées de 2 ml
- Un pot d'eau de javel à 5° chlorométrique pour recevoir le surnageant
- Un pot d'eau de javel à 5° chlorométrique pour les pipettes contaminées
- Un vortex
- Du papier absorbant
- Des lames identifiées pour la confection des frottis à partir du culot
- Une pissette d'eau de javel

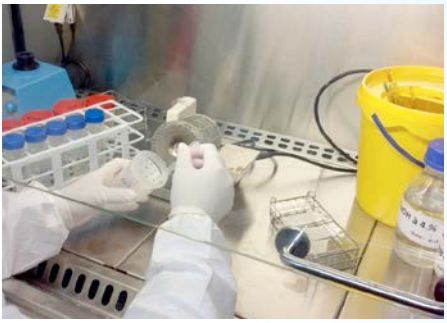
Technique :

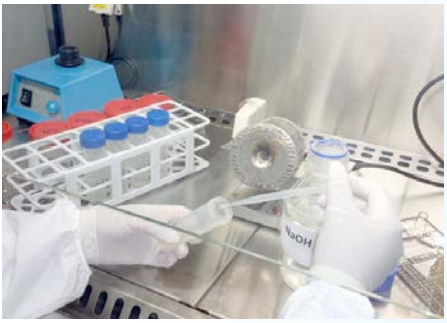
Fluidification – Décontamination :

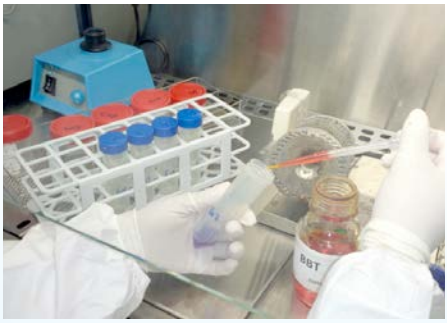
Dans un tube à centrifuger, conique, stérile, de 50 ml, à fermeture hermétique:

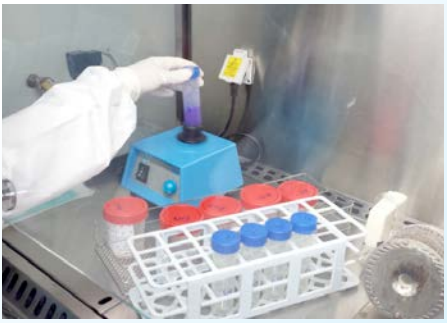
- Verser 2 à 3 ml d'expectoration.
- Ajouter deux fois le volume d'expectoration en soude (NaOH) à 4%.
- Ajouter quelques gouttes d'indicateur de pH (bleu de bromothymol).
- Agiter vigoureusement à l'aide d'un vortex.
- Incuber dans une étuve à 37°C, pendant 20 minutes.





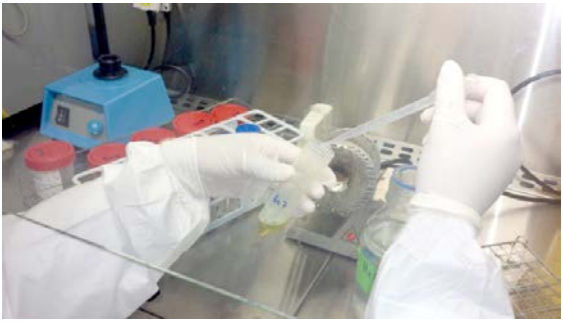






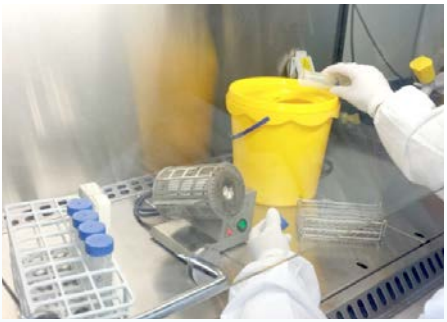
Neutralisation :

Neutraliser à l'aide d'une solution d'acide sulfurique à 4%. La neutralité est atteinte lorsque la solution vire au jaune.



Centrifugation :

Centrifuger à 3.000 T/min pendant 20 mn (température fixée à 20 -25°C). Éliminer le surnageant, le verser doucement et en une seule fois dans un pot contenant de l'eau de javel à 5° chlorométrique.

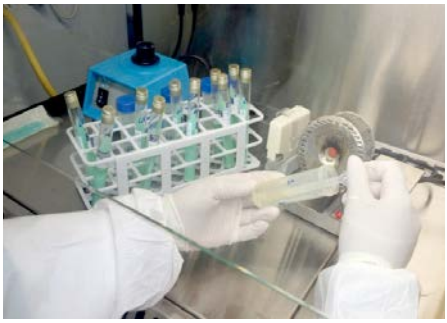
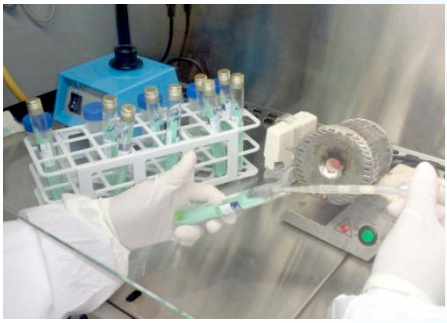


Ensemencement du culot

Resuspendre le culot et ensemencer des tubes de milieu solide (2 à 3 gouttes ou 0,2 ml par tube) dont au moins 1 tube de coletsos.

Déposer une goutte sur une lame pour un examen microscopique de la morphologie des bacilles.

Incuber les tubes à 37°C.

Méthode à la N-Acétyl-Cystéine

Cette méthode est adaptée à l'inoculation des milieux liquides.

Préparation des réactifs :

Matériel nécessaire à la préparation des réactifs :

- Une balance de précision
- Une spatule
- Une éprouvette graduée de 100 ml
- Une éprouvette graduée de 200 ml
- Une pipette de 5 ml
- Des flacons de 30 ml avec bouchon à vis
- Des ballons de 1 litre
- Du coton cardé
- Du papier aluminium ou à défaut du papier craft pour faire la pesée.

Préparation de la soude (NaOH) à 4% :

- Peser 4g de pastilles de soude, les introduire dans un flacon propre de 150 ml
- Ajouter 100 ml d'eau distillée et mélanger
- Stériliser à l'autoclave (120°C pendant 15 mn) et conserver à la température ambiante.

Préparation de citrate de sodium (= citrate trisodique) :

- Dissoudre 2,94g de citrate de sodium Dihydrate ($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$, MM 294,1) dans 100 ml d'eau distillée ou 2,6g de citrate de sodium anhydre ($C_6H_5Na_3O_7$, MM 258,07)
- Stériliser à l'autoclave (120°C pendant 15mn) et conserver à la température ambiante.

Préparation du tampon phosphate pH 6,8 :

Dissoudre dans 1 litre d'eau distillée :

- 3,55g de phosphate disodique anhydre Na_2HPO_4
- 3,40g de phosphate monopotassique anhydre KH_2PO_4
- Vérifier le pH. Ajuster à pH 6,8
- Stériliser à l'autoclave (120°C pendant 15mn) et conserver à la température ambiante
- Ces différents réactifs doivent être gardés à température ambiante pour éviter leur précipitation.

Préparation du mélange NAOH – NALC : toujours extemporanément :

- Mélanger 100ml de solution de soude et 100ml de solution de citrate de sodium
- Ajouter 1g de N-acétyl-L-Cystéine (NALC) et mélanger.

Préparer ce mélange juste avant usage car NALC perd son activité mucolytique avec le temps. Jeter le mélange éventuellement restant. Si un congélateur -20°C est disponible le produit peut être conservé pendant 6 mois.

Matériel nécessaire à la technique :

Tout le matériel doit être placé correctement dans le PSM avant de démarrer la technique.

- Un bec à pédale soit bec électrique
- Des portoirs avec orifices de 30mm de diamètre pour les tubes à centrifugation
- Des portoirs pour tubes de 16
- Des tubes coniques pour centrifugation
- Un pot de pipettes pasteur
- Un pot de pipettes graduées de 2 ml
- Un pot d'eau de javel à 5° chlorométrique pour y jeter le surnageant
- Un pot d'eau de javel à 5° chlorométrique pour les pipettes contaminées
- Un vortex
- Du papier absorbant
- Des lames identifiées pour la confection des frottis à partir du culot
- Une pissette d'eau de javel.

Technique :

Fluidification – décontamination :

Dans un tube à centrifuger, conique, stérile, de 50 ml, à fermeture hermétique:

- Verser 2 à 3 ml d'expectoration
- Ajouter un volume équivalent de mélange NAOH - NALC
- Agiter vigoureusement à l'aide d'un vortex
- Incuber à température ambiante (20°C – 25°C), pendant 15 minutes.

Neutralisation :

Neutraliser en remplissant le tube jusqu'à 2 cm du haut du tube avec du tampon phosphate.

Centrifugation :

- Centrifuger à 3.000 T/mn pendant 15 mn (température fixée à 20 -25°C)
- Éliminer le surnageant, le verser doucement et en une seule fois dans un pot contenant de l'eau de javel à 5° chlorométrique.

Ensemencement du culot

Resuspendre le culot et ensemencer des tubes de milieu solide (2 à 3 gouttes ou 0,2 ml par tube) dont au moins 1 tube de Coletsos.

Déposer une goutte sur une lame pour un examen microscopique de la morphologie des bacilles.

Incuber les tubes à 37°C.

Traitement des prélèvements autres que les expectorations

Pour les prélèvements précieux, difficiles à obtenir (LCR, pus, etc), la règle est d'inoculer systématiquement la totalité du prélèvement car plus la quantité de prélèvement ensemencée est importante plus les chances d'obtenir une culture positive sont élevées. En outre, plus on utilise de tubes moins il y a de risque que tous les tubes de culture soient contaminés.

- **Lavages gastriques :** ces prélèvements doivent être traités au maximum dans les 4h qui suivent leur recueil. Il est prudent d'effectuer le recueil dans un tube contenant 100mg de bicarbonate de soude. Procéder comme pour une expectoration. Si l'échantillon est très aqueux, centrifuger à 3.000 t/mn pendant 15 minutes, éliminer le surnageant, resuspendre dans 5ml d'eau distillée stérile, et procéder comme pour une expectoration.

- **Autres liquides corporels:**

  - Si le prélèvement a été effectué stérilement, centrifuger et inoculer la totalité du sédiment à raison de 2 à 3 gouttes ou 0,2ml par tube, dont au moins 1 tube de coletsos. Incuber les tubes à 37°C.
  - Si le prélèvement n'est pas stérile, procéder comme pour une expectoration si le volume est inférieur à 10ml. Pour les volumes supérieurs à 10ml, centrifuger et décontaminer le culot comme une expectoration.

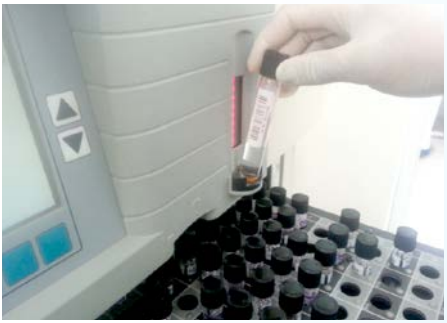
- **Pièces opératoires :** le prélèvement effectué stérilement doit être déposé dans un tube contenant un petit volume d'eau stérile. Les prélèvements biopsiques collectés dans un liquide fixateur (boin, ..) Sont impropres à la culture de bacilles de la tuberculose.

  - Si le prélèvement est effectué à l'extérieur du laboratoire, le transport doit être effectué à 4°C.
  - Homogénéiser le prélèvement avec un mini-broyeur ou au mortier en mouillant si nécessaire avec de l'eau distillée stérile.
  - Ensemencer la totalité du broyat à raison de 2 à 3 gouttes ou 0,2ml par tube, dont au moins 1 tube de coletsos.
  - Incuber les tubes à 37°C. Pour les biopsies cutanées, incuber la moitié des tubes à 30°C.

Surveillance des cultures et expression des résultats

Les prélèvements, débarrassés de la flore associée éventuelle, sont ensemencés sur des milieux spécifiques des bacilles de la tuberculose, répondant à leurs exigences nutritionnelles, milieux solides de Löwenstein-Jensen et Coletsos (préparations et contrôles de qualité indiquées en Annexe 2) et milieu liquide Middlebrook (le milieu Middlebrook est la base du milieu commercialisé de la gamme MGIT). Le manuel décrit la méthode de culture sur milieu solide.

Pour les cultures effectuées par la méthode automatisée commercialisée MGIT, suivre les instructions du fabricant.



Incubation

- Ranger les tubes d'un même plateau dans l'ordre de leur numérotation afin de faciliter leur lecture.
- Mettre une étiquette sur le plateau comportant la date de la manipulation et le numéro du 1er et du dernier tube de la série.
- Incuber les tubes, couchés en position inclinée avec les bouchons lâches pendant les premiers jours d'incubation.
- Examiner les tubes le 3ème ou 4ème jour d'incubation afin de déceler une contamination ou la présence de mycobactéries atypiques à croissance rapide.

- Pour tout tube contaminé, demander un autre prélèvement. Les tubes contaminés sont jetés et le résultat est noté sur le cahier de paillasse pour la traçabilité.
- Surveiller régulièrement l'évaporation de liquide. Une fois le liquide évaporé fermer les tubes sans bloquer le bouchon.
- La lecture est ensuite faite une fois par semaine jusqu'à la 4ème semaine ensuite une fois par mois jusqu'au 3ème mois.
- A chaque lecture : sortir les tubes présentant des colonies. Contrôler la présence de BAAR positifs après coloration et examen microscopique, noter si la morphologie est, ou n'est pas, caractéristique du bacille de la tuberculose et enregistrer le résultat de la culture sur le cahier de paillasse.

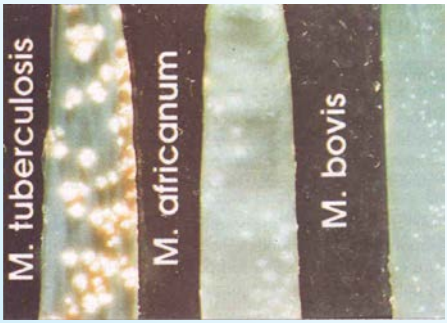
Expression des résultats :

Les résultats des cultures sont notés, à chaque lecture, sur le cahier (ou la fiche) de paillasse (cf. Formulaires en Annexe 3).

Cultures positives

Les cultures sont déclarées positives dès l'apparition de colonies :

- Typiques, à croissance lente, se développant en 3 à 4 semaines, rugueuses de couleur beige prenant en vieillissant un aspect en chou–fleur. En présence de telles colonies, l'identification de *Mycobacterium tuberculosis* peut être posée sans ambigüité.



Photos manuelle IPP

- Atypiques, à croissance rapide ou lente, de différents aspects, le plus souvent lisses avec pour certaines espèces, une pigmentation assez caractéristique.

Photos manuelle IPP

Les résultats doivent être exprimés quantitativement par tube :

Nombre exact des colonies si celui-ci est inférieur à 50 colonies

» 50-100 Colonies

» 100-200 Colonies

» Culture presque confluente

» Culture confluente

La date à laquelle la culture s'est révélée positive devra être mentionnée sur le formulaire des résultats.

Les cultures positives sont envoyées systématiquement pour identification et, éventuellement pour la réalisation d'un test de sensibilité aux antibacillaires, au Laboratoire National de Référence de la Tuberculose à l'INH, à l'Institut Pasteur du Maroc, ou à l'un des laboratoires régionaux selon le schéma directeur de l'organisation du réseau des laboratoires de tuberculose validé par le PNLAT/LNRT. L'identification sera complétée par l'examen microscopique de la morphologie des bacilles et la croissance positive ou négative sur milieu de Löwenstein-Jensen contenant de l'acide p-nitrobenzoïque (PNB, 500 µg/ml) et milieu de Löwenstein-Jensen contenant de l'hydrazide de l'acide thiophène-2-carboxylique (TCH, 2µg/ml). Le milieu avec PNB permet de différencier les bacilles tuberculeux des mycobactéries atypiques car *M.tuberculosis* et *M.bovis* ne poussent pas sur PNB contrairement aux mycobactéries atypiques qui toutes poussent sur ce milieu. Le milieu avec TCH permet de différencier *M.tuberculosis* de *M.bovis*, car *M.tuberculosis* pousse sur TCH mais pas *M.bovis*.

Remarque : Contrairement à l'isolement de *M.tuberculosis* ou *M.bovis* qui constitue un diagnostic de tuberculose, l'isolement de mycobactéries atypiques ne correspond nullement au diagnostic d'une mycobactériose. Les mycobactéries atypiques sont présentes partout dans l'environnement, dans l'air, l'eau traitée (potable) ou non, la poussière, les aliments. L'exposition à ces germes est donc très fréquente et leur isolement à partir de prélèvements de sites ouverts (broncho-pulmonaires, gastriques, ...) n'a pas de valeur diagnostique. Il faut des isolements abondants, répétés sur plusieurs semaines, et des signes cliniques compatibles pour pouvoir poser un diagnostic de mycobactériose pulmonaire. L'isolement de mycobactéries atypiques à partir de lésions fermées (biopsies chirurgicales) présente par contre une haute valeur diagnostique. Il s'agit dans ce cas de faire la démonstration d'absence de toute contamination exogène du prélèvement pendant le recueil, le transport éventuel et la manipulation au laboratoire.

Cultures négatives

Les cultures sont déclarées provisoirement négatives à partir du 30ème jour. Jusqu'à la fin du 2ème mois, cette réponse est toujours provisoire.

Les cultures sont déclarées négatives si elles le restent jusqu'au 70ème jour d'incubation.

La réponse culture négative doit toujours être accompagnée de la date à laquelle la lecture du résultat a été faite.

Indicateur de performance : taux de contamination

Le taux de contamination est un indicateur de performance des procédures de décontamination des prélèvements. L'indicateur est calculé sur **le nombre de tubes contaminés** par rapport au nombre de tubes ensemencés (et non sur le nombre d'échantillons). Le taux doit être compris entre 2% et 5%. Trop bas le taux signale une procédure trop drastique et trop élevé une procédure pas assez décontaminante.

En milieu liquide, le taux de contamination est plus élevé mais ne devrait pas dépasser 10%, au-delà la contribution de la culture au diagnostic est trop faible et ne justifie pas son coût.

Les causes possible de taux de contamination élevé sont :

- Non respect de la chaîne de froid pendant la conservation des échantillons;
- Délai excessif entre le recueil du prélèvement et sa mise en culture;
- Temps de décontamination trop court;
- Déficience dans la procédure de stérilisation des réactifs.

Les causes possible de taux de contamination trop faible sont :

- Concentration de décontaminant trop élevée;
- Temps de décontamination trop long;
- Mauvaise neutralisation de l'échantillon;
- Concentration de vert malachite trop élevée;
- Incubation à température trop élevée.

Autres indicateurs

Certains indicateurs sont recommandés pour évaluer la performance et l'apport de la culture par exemple :

Nombre de cultures effectuées dans le cadre du diagnostic et du suivi.

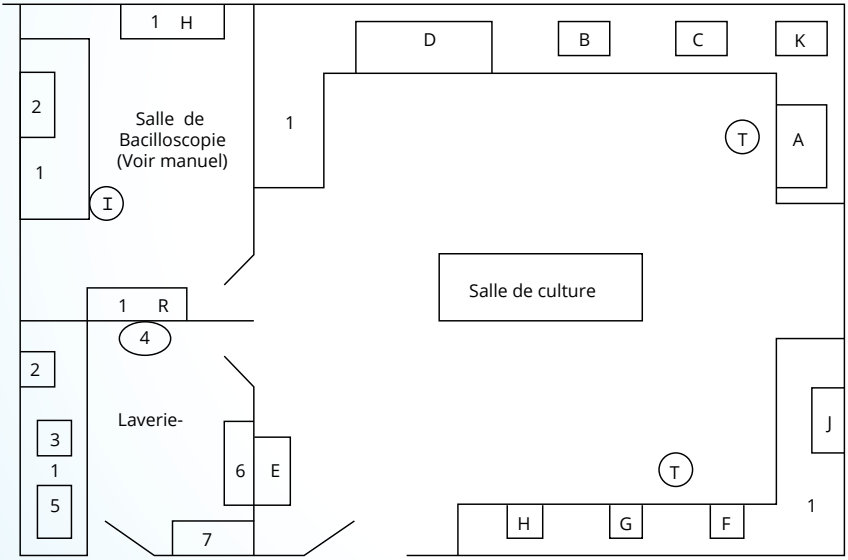
L'apport de la culture dans le diagnostic de la tuberculose : nombre d'examen direct négatif et culture positive pour le diagnostic et pour le suivi.

La confirmation du résultat de l'examen microscopique par la culture : nombre d'examen direct positif et culture positive pour le diagnostic et pour le suivi.

La discordance entre le résultat de l'examen microscopique et la culture : nombre d'examen direct positif et culture négative pour le diagnostic et pour le suivi.

ANNEXE 1

Exemple de plan d'organisation d'un laboratoire de culture de mycobactéries



Laverie	Laboratoire : (bacilloscopie et culture)	Secrétariat
1- Paillasse	A- Hotte bactériologique	M - Bureau
2- Évier double	B- Agitateur de Khan	N - Chaise
3- Distillateur	C- Centrifugeuse	O -Vestiaire
4- Autoclave	D- Etuve bactériologique	P- Lavabo
5- Poupinel	E- Réfrigérateur	Q- Placard
6- Table	F- Balance de précision	
7- Placard de rangement	G- pH mètre	
	H- Microscope	
	I - Tabouret	
	J- Evier	
	K- Balance de Roberval	
	L- Vortex (dans la hotte)	

ANNEXE 2

Préparation des milieux solides à l'oeuf.

Solution de vert malachite 2%

- Procéder dans des conditions stériles. Dissoudre 2g de vert malachite dans 100ml d'eau distillée stérile. Laisser dissoudre à l'étuve à 37°C pendant 1–2 heures.
- Conserver en bouteilles opaques. Cette solution n'est pas stable, éliminer à l'apparition d'un précipité.

Solution de sels

- Préparer la solution de sels comme indiqué dans le tableau ci-dessous, dissoudre dans l'eau distillée.
- Autoclaver à 121°C pendant 30 minutes.

Homogénat d'œufs

- Nettoyer les œufs en les frottant avec de l'eau et du savon, laisser tremper dans de l'éthanol à 70% pendant 15 minutes. Laisser sécher.
- Casser les œufs un par un pour vérifier leur fraîcheur. Ajouter autant d'œufs que nécessaire pour atteindre un niveau de 1.000 ml
- Homogénéiser la masse d'œufs.

Préparation du milieu proprement dit

- Mélanger tous les composants : solution de sels, vert malachite, homogénat d'œufs.
- Répartir de 6 à 8 ml de mélange dans des tubes à vis de16 x 125 mm. Laisser les bouchons lâches sans visser complètement, pour éviter l'excès de condensation.
- Placer les tubes sur des portoirs inclinés et coaguler à 80°C pendant 45 minutes.
- A la sortie du coagulateur, laisser refroidir les tubes à l'abri de la lumière. Identifier le lot avec la date de préparation.
- Revisser les bouchons. Conserver en position verticale à 4°C, jusqu'à 4 semaines.

Composants	LJ, modifié (IUATLD/WHO)	Coletsos
[a]Phosphate monopotassique (KH_2PO_4), anhydre	2,4g	2,4g
[a]Sulfate de magnésium ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,24g	0,24g
[a]Citrate de magnésium	0,6g	0,6g
[a]*L*-Asparagine	3,6g	3,6g
Eau distillée	600 ml	612 ml
bGlycérol (ml))	12 ml	-
[b]Pyruvate (g)	-	7,2g
Oeufs	1000 ml	1000 ml
Vert malachite (2%)	20 ml	20 ml
pH	6.8	6.8

[a] il existe des préparations commercialisées contenant l'ensemble de ces composants

[b]le gycérol du milieu de löwenstein-jensen favorise la croissance de *mycobacterium tuberculosis* alors que le pyruvate favorise la croissance de mycobacterium bovis.

Contrôles de qualité des milieux solides à l'oeuf

La couleur

Les tubes doivent présenter une couleur homogène vert clair. Des disparités de couleur entre tubes d'un même lot peuvent être dues à une mauvaise homogénéisation ou à la présence de résidus dans les tubes. Une couleur vert foncé peut être due à un excès de vert malachite ou à un pH trop acide. Une couleur vert pâle peut être due à une mauvaise qualité de vert malachite, à un pH trop élevé ou une température de coagulation excessive.

La texture

Sélectionner 2 à 3 tubes du lot de la préparation. Si le milieu est liquide ou se désintègre facilement au tapotement de la paroi des tubes, la température de coagulation était probablement trop basse. Ces lots sont impropres à la culture.

L'humidité

Il devrait y avoir un peu d'eau de condensation à la base des tubes. Un excès d'eau indique que les tubes ont été vissés trop tôt après la coagulation ou que la composition du milieu n'était pas correcte. Le milieu ne doit pas rouler quand on tourne ou bouge le tube.

L'homogénéité

Il est normal que quelques bulles soient visibles sur les bords des tubes mais la présence de bulles dans le milieu indique une température de coagulation excessive.

La stérilité

Chaque lot de préparation est testé pour stérilité. Aucune croissance ne doit apparaître après 24 h d'incubation à 37°C.

La sensibilité

La qualité du milieu pour permettre une bonne croissance des bacilles de la tuberculose ne peut être appréciée qu'après ensemencement d'une culture de souche contrôle.

Mesures préventives de contamination inter-prélèvements

- Utiliser des solutions de réactifs aliquotés
- Ne pas réutiliser de solutions déjà utilisées un jour précédent.
- Ne pas ouvrir de crachoir ou de tube contenant un prélèvement avant d'avoir refermé le prélèvement précédemment manipulé.
- Distribuer les solutions de réactifs sans toucher le bord des tubes avec les pipettes.
- **Décanter les surnageants avec précaution en évitant de créer des éclaboussures** et les éliminer en les versant sur de l'eau de javel.

ANNEXE 3

Exemple de cahier de paillasse (de lecture)

Date	Numéro	1er semaine	2ème semaine	3ème semaine	4ème semaine	2ème mois	3ème mois	Ziehl	Remarques
01/01/03	1	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative		
	2	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Contamination
	3	Négative	Douteux	-	-	-	-	Positive	
	4	Négative	Négative	Positive					
	5	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Positive	
	6	Négative	Négative	Douteux	Positive	-	-		
	7	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative		
	8	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative		
	9	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative		
	10	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative		
	...								
	...								
	...								
	...								

ANNEXE 4

Entretien et maintenance préventive des équipements

Autoclave

- Les autoclaves doivent être installés loin des zones de travail car ils sont une source de chaleur et de bruit, et peuvent être à l'origine d'accidents graves en cas de fuite de vapeur.
- Dédier un autoclave pour la stérilisation (propre) et un autre autoclave pour la décontamination (sale). Si un seul autoclave est disponible, ne jamais charger en même temps du matériel à décontaminer et du matériel à stériliser. Il est recommandé d'équiper la valve de sortie d'air de l'autoclave dédié à la décontamination du matériel infectieux avec un filtre de porosité 0,2 µm d façon à éviter la contamination des effluents en cas de dysfonctionnement de l'autoclave.
- Attention : un mauvais usage de l'autoclave peut s'avérer extrêmement dangereux. L'autoclave peut exploser si la pression est trop forte, si un élément est défectueux ou si la porte est ouverte avant la fin du cycle.
- Une attention particulière doit être portée au chargement de conteneurs contenant des liquides. Les bouchons des tubes contenant des liquides doivent être laissés lâches; si ils sont trop serrés, les tubes peuvent exploser à l'ouverture de l'autoclave.
- Ne pas surcharger l'autoclave pour ne pas entraver la circulation de la vapeur pendant le cycle.
- Utiliser les conditions suivantes:
  - Matériel solide pour stérilisation : 121°C (pression 115 kPa), 20 minutes (le temps nécessaire à la stérilisation des liquides dépend du volume).
  - Décontamination de matériel infectieux : 121°C (pression 115 kPa), 30 minutes.
- Utiliser des gants thermorésistants pour manipuler le matériel après ouverture de l'autoclave.

Maintenance préventive

À chaque usage, vérifier la libre manipulation des portes, l'intégrité des joints et l'absence de fuites pendant le cycle.

Préventive mensuelle

- Inspecter les parois pour éliminer d'éventuels résidus
- Nettoyer le tamis de drain
- Vérifier l'efficacité des cycles. Des spores thermo-résistants geobacillus stearothermophilus sont utilisés pour tester l'efficacité de l'autoclave. Placer un tube de spores dans un sac autoclavable au centre du chargement de l'autoclave. Après un cycle à 121°C de 15 minutes, le tube de spores est incubé à 56°-60°C en même temps qu'un tube de spores non autoclavé. Quand la croissance est visible dans le

tube non autoclavée, on observe le tube autoclavé. Ce tube doit rester négatif, une croissance indique un dysfonctionnement de l'autoclav et des cycles non efficaces.

Préventive annuelle :
Les autoclaves doivent être inspectés et certifiés annuellement. Au minimum, tester les manomètres et thermomètres.

Centrifugeuse :

N'utiliser que des centrifugeuses avec protection anti-aérosols et des tubes à centrifuger résistants à 3000g. Ouvrir les pots à centrifuger sous PSM pour se protéger des aérosols au cas où des tubes auraient été cassés pendant la centrifugation.

En cas de tubes cassés
Les tubes cassés doivent être placés dans un sac autoclavable dans un conteneur métallique et autoclavés. Nettoyer sous PSM les pots à centrifuger par immersion dans l'alcool à 70°.

Maintenance

Préventive à chaque usage

Bien vérifier l'équilibre des pots opposés.

Préventive hebdomadaire
Essuyer les parois internes à l'alcool à 70°. Ne jamais utiliser de javel qui est corrosive.

Préventive mensuelle
Nettoyer l'enceinte de la centrifugeuse, la chambre du rotor, les rotors et les accessoires; Nettoyer la housse de la centrifugeuse, la chambre des rotors, les rotors et leurs accessoires à l'alcool à 70°.

Préventive annuelle
La centrifugeuse doit être inspectée annuellement par un technicien qualifié.

Poste de sécurité microbiologique (PSM)

Entretien
Nettoyer la hotte et la désinfecter après chaque utilisation avec l'alcool à 70°.

Maintenance

Préventive hebdomadaire:
Si le PSM est équipé de lampes UV, nettoyer la lampe UV avec un tampon de gaze mouillé à l'alcool à 70°. Porter des gants, ne jamais toucher la lampe à mains nues.

Préventive mensuelle:
La vitesse du flux d'air sera contrôlée 1 fois par mois sur le tableau de commandes.
Les résultats des contrôles ainsi que les dates de remplacement des filtres doivent être notés sur la fiche de surveillance.

Préventive annuelle :

» Vérification du sens de la circulation d'air dans le PSM. L'utilisation de fumigènes commercialisés est recommandée. Ce sont de petits tubes en verre, scellés, équipés d'une poire en caoutchouc à une extrémité. Il faut casser le tube pour générer la fumée que l'on dirige en appuyant sur la poire. On peut ainsi vérifier la bonne circulation d'air dans le PSM, détecter des fuites, vérifier que la circulation d'air est suffisante quand un opérateur travaille sous le PSM et que les mouvements de bras n'entraînent pas de sortie d'air du PSM vers le laboratoire.

» Une certifcation du PSM devrait être effectuée une fois par an par un technicien qualifié selon les spécifications du fabricant.

Etuve

- Nettoyer les parois internes et externes et les désinfecter une fois par mois avec de l'alcool à 70°.
- Ne pas remplir complètement l'étuve (en une seule opération) car le temps de stabilité de la température dans le milieu de culture serait très long.
- Placer les tubes à au moins 25 mm des parois internes de l'étuve et des piles.
- Les incubateurs doivent être équipés d'un système de régulation de la température.
- Les parois des incubateurs doivent être protégées de la lumière solaire.
- Vérifier l'uniformité de la température dans le volume utile à l'aide de plusieurs thermomètres.
- Les températures doivent être dûment enregistrées, au début de chaque journée de travail, sur les fiches de surveillance.

Balance de précision :

- La balance doit être posée sur un support horizontal stable ; à l'abri des vibrations.
- Le plateau doit être nettoyé après chaque utilisation.
- Utiliser des poids calibrés pour vérifier les poids affichés par la balance. Procéder à une calibration de la balance en cas de problème.

Réfrigérateur :

- Utiliser des réfrigérateurs distincts pour le matériel propre et le matériel sale.
- La température doit être vérifiée au début de chaque semaine à l'aide d'un thermomètre. La température doit être de +2°C à +8°C.
- Les températures doivent êtres enregistrées quotidiennement et reportées sur les fiches de surveillance affichées sur la porte du réfrigérateur.

Maintenance mensuelle

Le dégivrage, le nettoyage, la désinfection de l'intérieur et le nettoyage des joints de la porte doivent se faire tous les mois et après chaque coupure d'électricité.

Microscope

- Essuyer les oculaires et les objectifs avec du papier absorbant imbibé de produit non corrosif, comme le mélange 80/20 Ethyléther/Alcool, à la fin de chaque journée de travail.
- Nettoyer et lubrifier le chariot une fois/semaine.
- Recouvrir le microscope de sa housse après chaque utilisation.
- Vérifier l'alignement (ou centrage optique) au moins une fois par mois :
  - Placer une lame avec une préparation sans lamelle. Abaisser le condenseur. Ouvrir le diaphragme. Examiner avec l'objectif à plus faible grossissement (3.5 Ou 10 x). Regarder dans l'oculaire et mettre au point.
  - Fermer le diaphragme. On devrait voir dans le champ un disque lumineux flou entouré d'un anneau sombre.
  - Monter lentement le condenseur jusqu'à ce que les bords de ce disque lumineux soient bien nets.
  - Le cas échéant, modifier légèrement la position du miroir pour que le disque de lumière se trouve exactement au centre du cercle clair dessiné par la zone d'ombre ou superposé à celui-ci.

Problème: visualisation du champ est trop faible

Cause probable	Solution
Le condenseur est trop bas	Relever le condenseur à une position correcte
Le diaphragme est fermé	Ouvrir le diaphragme

Problème: il ya des ombres dans le champ qui se déplacent quand on tourne l'oculaire

Cause probable	Solution
La surface de l'oculaire est rayée	Remplacer l'oculaire
L'oculaire est sale	Nettoyer l'oculaire

Problème: l'image avec l'objectif de magnification élevée n'est pas claire

Cause probable	Solution
La lame est placée à l'envers	Retourner la lame
Il y a une bulle d'air dans l'huile	Déplacez rapidement objectif 100x
Il y a une saleté sur l'objectif	Nettoyer l'objectif

Problème: l'image avec l'objectif de magnification faible n'est pas claire

Cause probable	Solution
Il y a de l'huile sur l'objectif	Nettoyer l'objectif

Problème: le champ de vision est sombre

Considérer les causes possibles:

- Croissance massive des champignons sur les lentilles ou les prismes en raison de stockage dans un environnement à forte humidité.
- Pénétration de l'huile d'immersion entre les lentilles de l'objectif probablement due à l'utilisation d'huile de mauvaise qualité ou de l'utilisation de xylène. C'est presque certainement la cause si un champ complètement flou devient clair après avoir changé l'objectif.
- Objectif endommagé par suite de négligence à la mise au point ou le changement brutal de lames sans lever l'objectif

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LOWENSTEIN. 1931. Die Züchtung der tuberkelbazillen aus dem strömenden Blute (La culture du bacille tuberculeux dans le sang circulant). Zbl. für Bakt. Abt I, 120-127.

DUBOS R, MIDDLEBROOK G. 1946. Media for tubercle bacillus. Amer. Rev. Tuberc. 54, 204-212.

COLETSOS PJ. 1962. La culture des mycobactéries dysgoniques ou en état de quiescence (bacilles dits visibles et non viables). Presse Médicale, 70, 2119-2122.

BOISVERT H. 1970. Action de l'acide pyruvique sur la croissance et l'antibiogramme des mycobactéries. Rev. tuberc. pneumol. 34, 117-124.

Tison F, CARBONNELLE B. 1972. Recherche, isolement et étude du bacille tuberculeux et des autres mycobactéries en pratique courante. Crouan & Roques eds, Lille.

Strong BE, Kubica GP. 1981. Isolation and identification of Mycobacterium tuberculosis. A guide for the level II laboratory. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, publication n° PB82-164625.

LEVY-FREBAULT, 1984. Mycobactériologie clinique et de santé publique. Préparé pour la Société Européenne de Mycobactériologistes par un comité ad hoc. Version Francaise.

KENT PT, KUBICA GP. 1985. Public health Mycobacteriology: A guide for the level III Laboratory. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta.

DAVID HL, LEVY-FREBAULT V, THOREL MF. 1989. Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique. Commission des laboratoires de référence et d'expertise de l'Institut Pasteur.

TRUFFOT-PERNOT C, GROSSET J, GICQUEL B, JARLIER V, DOUCET-POPULAIRE F, 1992. Bactériologie de la tuberculose et des infections à Mycobactéries atypiques. Encycl. Med. Chir. Edition techniques, Pneumologie, 6019 A34, 12p.

BOULAHBAL F, TAZIR M, KHALED S, ZERRAR A. Bactériologie de la tuberculose: aspects diagnostiques, thérapeutiques et organisationnels ; Collection le cours de médecine ; université d'Algrer ; INESSEM-Alger.

World Health Organization. 1998. Laboratory services in tuberculosis control. Part III: Culture. World Health Organization, Geneva. available at http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_TB_98.258_(part3).pdf?ua=1

World Health Organization. 1998. Laboratory services in tuberculosis control. Part II: Microscopy. World Health Organization, Geneva. Available at http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_TB_98.258_(part2).pdf?ua=1

Institut Pasteur Paris et Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière. Cours de Mycobactériologie Médicale, 1999.

World Health Organization Regional Office for the Eastern Mediterranean. 2002. Basics of quality assurance for intermediate and peripheral laboratories, 2nd ed. World Health Organization, Cairo.

World Health Organization. 2004. Laboratory biosafety manual, 3rd ed. World Health Organization, Geneva. Available at http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/en/Biosafety7.pdf

PROGRAMME NATIONAL DE LUTTE ANTI-TUBERCULEUSE. 2011. Guide de la lutte anti-tuberculeuse l'usage des professionnels de santé. Ministère de la Santé, Direction de l'Epidémiologie et de Lutte contre les Maladies, Royaume du Maroc.

World Health Organization. 2013. Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual. World Health Organization, Geneva (WHO/HTM/TB/2012.11). Accessible à http://www.who.int/tb/publications/2012/tb_biosafety/en/.

Photos prises à l'Institut National d'Hygiène.

Institut National d'Hygiène
Laboratoire National de Référence de la Tuberculose

27, Av. Ibn Batouta. B.P. : 769 Rabat
Tél.: 0537 77 19 02/65/30
FAx. 0537 77 20 67