ROYAUME DU MAROC

Ministère de la Santé

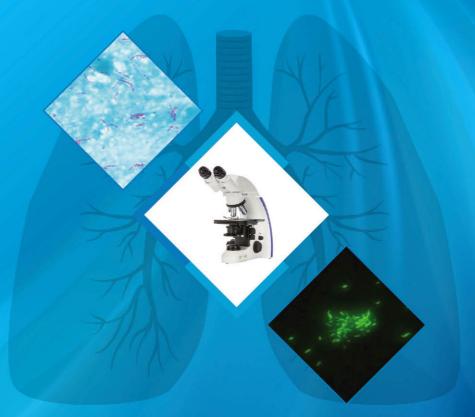
Institut National d'Hgiène



المملكـــة المغربيــة ΘΧΗΛΣΗ Ι ΜΕΤΟΣΘ+ **οξίζε الصحة** ΣΘΚΗ Ι +ΟοLIο-3+ المعهد الوطني للصحة کΧΑΚΗ Ι ΟΘΖοΙο Ι ΧΟΙΣΘο

Laboratoire National de Référence de la Tuberculose

MANUEL DE BACILLOSCOPIE









ROYAUME DU MAROC Ministère de la Santé Institut National d'Hgiène



المملكـــة المغربيــة ⊖ ۱ المحالا ا +3 NNXو+ وزارة الصحة ≥ 10 + 10 +0 الماء+ المعهد الوطني للصحة > XXX+ ا 20 اه الحا⊙اء

Laboratoire National de Référence de la Tuberculose

MANUEL DE BACILLOSCOPIE







AVANT PROPOS

La tuberculose, autrefois appelée « phtisie » est une maladie contagieuse, due le plus souvent à *Mycobacterium tuberculosis*, plus connu sous le nom de bacille de Koch. Le diagnostic de certitude de la tuberculose repose sur la mise en évidence de germe dans les prélèvements pathologiques comme les expectorations, les urines, les liquides de ponction des séreuses...

Différentes techniques sont d'usage pour le diagnostic biologique de la tuberculose humaine dont l'examen microscopique ou la bacilloscopie. Celle-ci représente l'un des moyens les plus efficace pour le dépistage, le diagnostic et le suivi du traitement des patients atteints de la tuberculose. Elle joue de ce fait, un rôle crucial dans la lutte anti-tuberculeuse.

Dans un souci de standardisation à l'échelle nationale, de la technique de bacilloscopie, le Laboratoire National de Référence de la Tuberculose de l'Institut National d'Hygiène a révisé son manuel de bacilloscopie qu'il avait édité en 2004.

Le présent manuel est destiné au personnel de santé en charge de l'examen microscopique de la tuberculose, aux étudiants et aux biologistes. Il traite de toutes les étapes de la réalisation de la bacilloscopie, de la réception de prélèvement au rendu de résultat, et décrit les deux techniques actuellement utilisées au Maroc, la technique de microscopie conventionnelle avec coloration de Ziehl-Neelsen et la technique de fluorescence LED avec coloration à l'Auramine. Des chapitres consacrés à la biosécurité et au contrôle de la qualité sont également abordés dans ce document.

L'utilisation de ce manuel pratique permettra, sans doute, de poser un diagnostic sûr et jouera un rôle important dans l'amélioration de la qualité des services fournis par les laboratoires de la bascilloscopie et contribuera par conséquent à la performance du Programme National de Lutte contre la Tuberculose.

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 du laboratoire	9
Mesures de sécurité au laboratoire de microscopie	10
Mesures générales de biosécurité applicables dans tous les laboratoires de tuberculose	10
Mesures minimum essentielles adaptées aux laboratoires de microscopie (niveau de risque faible)	11
Recueil des prélèvements	13
Enregistrement des échantillons	14
Conservation et transport des expectorations	14
Confection des frottis	14
Principe de la coloration des bacilles de la tuberculose	17
L'examen microscopique en lumière transmise : méthode de Ziehl-Neelsen	17
Matériel nécessaire :	17
Petit matériel	17
Consommables	18
Préparation des réactifs pour la coloration de Ziehl-Neelsen	18
Coloration des lames :	19
Examen au microscope	22
Interprétation et enregistrement des résultats	23
L'examen microscopique en fluorescence	24
Matériel nécessaire	24
Petit matériel	25
Consommables	25
Préparation des réactifs pour la coloration à l'auramine	25
Coloration des lames: méthode de fluorescence à l'auramine	26
Examen au microscope	28
Interprétation et enregistrement des résultats	29
Assurance qualité	30
Contrôle de qualité des réactifs nouvellement préparés	30
Surveillance des résultats	30
Supervision et contrôle de qualité externe	31
Annexe	32
Problèmes fréquents rencontrés avec la coloration de Ziehl-Neelsen	32
Problèmes fréquents rencontrés avec la coloration à l'auramine	33
Précautions particulières : Huile d'immersion et nettoyage des objectifs	
Références bibliographiques	35

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 cas de tuberculose toute forme confondues ont été notifié en 2016, soit une incidence de l'ordre de 91 nouveaux cas par 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 manuel a été élaboré dans un souci de standardisation à l'échelle nationale des techniques de microscopie dans le respect des recommandations de l'OMS de 2007 et 2011, à savoir :

- Réduction du nombre de frottis pour le diagnostic des nouveaux cas de TB pulmonaire de 3 à 2, à condition qu'un système performant de contrôle de qualité externe de la microscopie soit en place et dans le cas où le volume de travail est élevé et les ressources humaines sont limitées.
- Révision de la définition d'un nouveau cas de TB à frottis d'expectoration positif, reposant sur la détection d'au moins 1 bacille acido-alcoolo-résistant dans au moins une expectoration, à condition qu'un système performant de contrôle de qualité externe de la microscopie soit en place.
- Remplacement de la microscopie conventionnelle à lumière transmise avec coloration de Ziehl-Neelsen par la microscopie à fluorescence LED dans les laboratoires, que le volume de travail soit élevé ou non.

Aménagement du laboratoire

Le laboratoire doit être ensoleillé (les rayons U.V. du soleil permettent la destruction du BK), bien aérés et suffisamment éclairés.

Il doit être organisé en 3 parties :

- > **Espace 1**: un endroit bien illuminé avec une paillasse recouverte de faïence ou de toute autre matière lisse et facile à nettoyer avec des détergents ou des désinfectants et un lavabo à eau courante; pour la préparation et la coloration des frottis.
- ➤ **Espace 2 :** une table pour le microscope. Si l'électricité n'est pas disponible, cette table doit être placée directement devant une fenêtre.
- ➤ **Espace 3 :** une table pour l'enregistrement des prélèvements, rangement des documents et registre de laboratoire ainsi que la conservation des lames.

Espace 3 Table d'enregistrement avec un système de rangement des lames lues - Évier avec eau courante - Coloration de frottis Paillasse pour: - Préparation des colorants - Préparation des frottis Table de lecture avec le microscope Espace 2

Mesures de sécurité au laboratoire de microscopie

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.

Mesures générales de biosécurité applicables dans tous les laboratoires detuberculose

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 réalisées avec ou sans gants et avant de quitter le laboratoire.
- Le respect des bonnes pratiques microbiologiques de manière à minimiser la création d'aérosols.

- Le respect des zones sale/propre à l'intérieur du laboratoire.
- ➤ Le suivi rigoureux des procédures en cas de déversement ou bris accidentel de matériel infectieux sur le sol ou sur la bayasse.
- 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 aux laboratoires de microscopie (niveau de risque faible)

- Organiser le recueil des prélèvements à l'air libre, à l'extérieur du laboratoire, de sorte que les aérosols produits soient dilués et stérilisés par les UV de la lumière du soleil.
- ➢ Bien identifier la zone de paillasse « sale » dédiée à la réception et à la manipulation des prélèvements de la zone « propre » strictement réservée à l'administration (registres, cahiers de laboratoire). Ne jamais déposer un crachoir sur la table d'enregistrement ou sur celle réservée à la lecture.
- Ne jamais manipuler un crachoir détérioré (qui pourrait présenter des fuites), le jeter et désinfecter immédiatement la paillasse ; demander un nouveau prélèvement.
- ➤ Veiller à la bonne ventilation du laboratoire, si le climat le permet, la ventilation naturelle par des fenêtres ouvertes est suffisante. Sinon il faut prévoir une ventilation mécanique, avec 6 à 12 changements d'air par heure, sans recirculation dans la pièce, en s'assurant que le flux d'air ainsi créé s'éloigne du technicien.
- > Veiller à minimiser la production d'aérosols par :
 - Le respect des consignes de manipulation correcte, avec des gestes lents et sans heurts pour minimiser au maximum la création d'aérosols, lors de l'ouverture des crachoirs, du prélèvement à l'anse de platine des particules purulentes et l'étalement sur lame:
 - La décontamination de l'anse par chauffage à la flamme après élimination des particules résiduelles d'expectorations dans du sable. Commencer par flamber la partie de l'anse la plus proche du manche en se rapprochant doucement, au fur et à mesure du rougissement de l'anse, de la partie en contact avec les matières infectieuses;
 - Le séchage complet des lames de frottis à l'air sur un porte-lame (ou sur une plaque chauffante si disponible). Ne jamais sécher les lames à la flamme et éviter de les déplacer mouillées.

- Décontaminer les crachoirs par immersion dans la javel avant de les éliminer par incinération ou autoclavage. Mettre les crachoirs et tous les déchets potentiellement infectieux dans un bac (bidon métallique à couvercle par exemple) muni d'un sac en plastique autoclavable jetable. Lors du déplacement des déchets à l'intérieur ou à l'extérieur du laboratoire vers l'autoclave, mettre les déchets dans un conteneur en plastique ou en métal. Dans la mesure du possible, les déchets provenant de laboratoires de la tuberculose ne doivent pas être jettes dans une décharge.
- ➤ Lorsque des substances infectieuses sont répandues au sol ou sur la paillasse, il faut procéder immédiatement au nettoyage avant de poursuivre le travail. Marche à suivre :
 - Disposer un tissu absorbant sur la zone souillée et verser dessus une bonne quantité de javel à 12°. Appliquer le désinfectant de manière concentrique en commençant par le bord extérieur de la souillure et en allant vers le centre;
 - Laisser agir pendant 30 minutes à 1 h le désinfectant qui couvre les zones souillées;
 - Recueillir soigneusement les objets ou fragments pointus ou tranchants qui sont contaminés et les placer dans un conteneur imperforable en vue de leur élimination.
 Recueillir dans un sac fermé tout le matériel contaminé restant en vue de sa destruction.
- L'élimination du matériel en verre contaminé (lames de microscopie notamment) doit faire l'objet d'une attention particulière. Le matériel doit être placé dans des conteneurs résistants à la perforation avant d'être incinérés (après passage préalable à l'autoclave, si la pratique du laboratoire l'exige). Les conteneurs de lames ne doivent en aucun cas être jetés directement à la décharge.
- Désinfecter toutes les surfaces de travail à la fin de chaque procédure et à la fin de la journée par de la javel à 5%.
- Bien préparer les solutions de javel. Les solutions d'hypochlorite de sodium (du genre eau de javel) contiennent 50 g/l de chlore libre et doivent donc être diluées à 1:50 ou 1:10 pour obtenir une concentration finale de 1 ou de 5 g/litre. Conservée dans un local bien ventilé, à l'abri de la lumière, une solution à 50 g/l peut durer jusqu'à 3 mois. Les solutions diluées doivent être préparées journalièrement.
- Nettoyer le sol à l'eau additionnée javel à 5%. Proscrire l'usage du balai.

Messages clés:

- » Pas de recueil des expectorations dans le laboratoire.
- » Les masques ne sont pas requis pour la préparation des frottis d'expectorations.
- » Il est nécessaire de se laver les mains à l'eau et au savon, à chaque fois :
 - Après avoir manipulé du matériel infectieux;
 - Avant de quitter le laboratoire.

Recueil des prélèvements

- Pour chaque patient suspect de tuberculose, 2 expectorations sont collectées en 2 jours :
 - Une première expectoration recueillie le jour de la consultation, en plein air, loin des autres patients;
 - Une deuxième expectoration recueillie le lendemain par le malade lui-même au réveil, à ieun.
- ➤ Le personnel de laboratoire doit expliquer au patient la démarche à suivre pour produire une expectoration de qualité. Mettre le sujet en confiance en lui expliquant les raisons de cet examen. Montrer lui comment inspirer par le nez et expirer par la bouche, profondément 2 à 3 fois de suite, avant de faire un effort de toux profonde et vigoureuse pour remonter des mucosités bronchiques. Expliquer que la manœuvre doit être répétée plusieurs fois pour obtenir un échantillon de bonne qualité.
- ➤ La salive et les décharges naso-pharyngées ne sont pas considérées comme des échantillons idéaux. Néanmoins, ils doivent être examinés.
- Quand le patient arrive avec le formulaire de demande de bacilloscopie, lui donner un crachoir fermé hermétiquement, clairement identifié avec le nom et le prénom du patient, en indiquant l'échantillon numéro 1. Il faut toujours identifier le crachoir sur sa paroi et non sur le couvercle.
- Un formulaire de demande de bacilloscopie doit accompagner chaque échantillon. Les renseignements inscrits sur le formulaire doivent être les mêmes que ceux du crachoir.
- Récupérer le crachoir et contrôler la quantité et la qualité du prélèvement. Noter l'aspect des expectorations sur le formulaire de demande de bacilloscopie. Donner le deuxième crachoir bien identifié avec le nom et le prénom du patient, en indiquant l'échantillon numéro 2.



Échantillon mucoïde



Échantillon purulent



Échantillon hémorragique



Échantillon salivaire

Enregistrement des échantillons

Il est très important d'identifier les échantillons pour éviter les erreurs. Le système d'enregistrement adopté est le registre du PNLAT.

L'information provenant du formulaire de demande de bacilloscopie sera entièrement transcrite aux endroits appropriés dans le registre de bacilloscopie. Les renseignements nécessaires pour l'identification précise de chaque échantillon doivent être complets, précis et inclure :

- La date de réception de l'échantillon;
- Le numéro de série du laboratoire inscrit dans le registre de bacilloscopie commence à 1 le 1^{er} janvier de chaque année et s'incrémente de 1 à chaque patient jusqu'au 31 décembre de la même année. Pour chaque patient, utiliser le même numéro de registre de bacilloscopie suivi de /1 et /2 pour identifier le premier échantillon recueilli sur place et le deuxième échantillon recueilli à jeun au domicile du patient;
- Le nom, le prénom, le sexe, l'âge et l'adresse du patient;
- La qualité de l'échantillon comme noté sur le formulaire de demande de bacilloscopie;
- Le motif de l'examen : diagnostic ou contrôle.

Conservation et transport des expectorations

Pour les laboratoires recevant des expectorations d'autres formations sanitaires, les prélèvements sont envoyés par les moyens de transport des Délégations de la Santé, dans des glacières spécialement fournies à cet effet. La glacière doit être accompagnée d'une liste identifiant les prélèvements qui s'y trouvent. Une fois au laboratoire, il faut vérifier la conformité entre la liste et les échantillons ainsi que l'intégrité des crachoirs. Chaque prélèvement doit être accompagné d'un formulaire de demande de bacilloscopie. Tout crachoir cassé ou renversé doit être éliminé. Une fois les prélèvements récupérés, la glacière est désinfectée et renvoyée au laboratoire d'origine.

Confection des frottis

- > Sur la paillasse, près d'un bec bunsen, placer le matériel nécessaire.
- Marquer le numéro du prélèvement correspondant au registre du laboratoire avec le numéro de l'échantillon 1 ou 2, comme indiqué sur le crachoir.

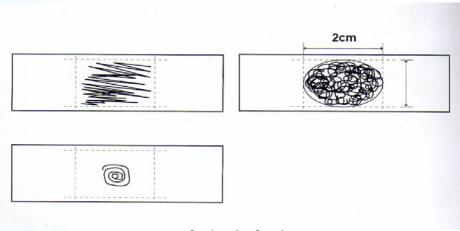


- > Ouvrir doucement le crachoir pour éviter les aérosols et prélever à l'anse métallique une parcelle purulente ou hémorragique de l'expectoration. Le résultat de l'examen microscopique dépend essentiellement du choix de la particule traitée.
- Déposer le contenu de l'anse au centre de la lame et l'étaler en effectuant une rotation continue sur le tiers central de la lame sans atteindre les bords. L'épaisseur du frottis doit être correcte, suffisante mais pas surchargée. Pour le vérifier, on place un texte imprimé en dessous de la lame. Le frottis est trop mince si le texte est complètement lisible à travers l'étalement et trop surchargé si le texte n'est pas visible du tout. Un frottis correct laisse deviner les caractères imprimés sans être pleinement lisibles.





- Tremper l'anse immédiatement dans le flacon contenant le sable et l'alcool (ou l'eau de javel), par des mouvements verticaux, pour la débarrasser des particules qui restent collées à l'anse. Flamber l'anse de la base fixée dans le manche vers l'extrémité qui a plongé dans l'échantillon. L'anse doit être chauffée jusqu'à l'obtention de la couleur rouge incandescente.
- Sécher le frottis en plaçant la lame sur un porte-lames ou sur une plaque chauffante si disponible. Laisser sécher à l'air (15 à 30 minutes sur le porte-lame sans chauffage). Ne jamais sécher les lames à la flamme au risque de générer des aérosols. Éviter de déplacer les lames non séchées pour la même raison.
- Quand la lame est bien sèche, la prendre à l'aide de la pince métallique pour la fixer en passant rapidement trois fois sur la flamme bleue du bec bunsen, le frottis tourné vers le haut. L'exposition à la chaleur empêche les bacilles de se détacher de la lame au cours des étapes de coloration, mais une chaleur excessive endommage les bacilles. Cette étape de fixation doit donc être bien observée.
- Une fois la préparation des frottis terminée, les crachoirs sont décontaminés à l'eau de javel avant d'être incinérés.
- > Bien se laver les mains à l'eau et au savon après avoir manipulé les crachoirs.



Confection des frottis

Remarque: pour les prélèvements autres que les expectorations, s'adresser au laboratoire régional car les aspirations bronchiques, urines, tubages gastriques nécessitent d'être centrifugés. Quant aux autres types de prélèvements comme les liquides céphalo-rachidiens et liquides de pus, généralement très pauvres en bacilles, la microscopie n'est pas indiquée et il est préférable de faire directement une culture.

Messages clés:

La préparation des frottis est la même pour la coloration de Ziehl-Neelsen ou pour la coloration par fluorescence.

Travailler dans un laboratoire bien aéré. Éviter tout geste brusque tant que le crachoir est ouvert.

Bien laisser sécher les lames à l'air libre avant de les fixer à la chaleur. Flamber directement peut être dangereux pour le bacilloscopiste et endommager le frottis. Bien se laver les mains à l'eau et au savon après avoir manipulé les crachoirs.

Principe de la coloration des bacilles de la tuberculose

Les bacilles de la tuberculose, comme toutes les autres mycobactéries, sont dits « acidoalcoolo-résistants » c'est-à-dire que, une fois colorés, les bacilles conservent la coloration même sous l'action conjuguée de l'acide et de l'alcool. La propriété d'acido-alcoolorésistance s'explique par la présence d'acides mycoliques dans la paroi cellulaire des mycobactéries. Au cours de la coloration, la fuchsine ou l'auramine se lie à des acides mycoliques de la paroi cellulaire. La décoloration intense (par acide fort ou acide/alcool) ne libère pas le colorant et les bacilles conservent la couleur rouge de la fuchsine ou la couleur vert fluorescent de l'auramine. La coloration de contraste (avec du bleu de méthylène) fournit un fond de couleur bleue. Toutes les mycobactéries présentent cette propriété d'acido-alcoolo-résistance mais on peut considérer que dans les pays à forte prévalence de tuberculose, les bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) retrouvés dans les échantillons respiratoires sont presque toujours des bacilles de la tuberculose. Les mycobactéries de l'environnement sont plus fréquemment isolées dans les pays à faible prévalence de tuberculose. Mais même dans les pays à forte prévalence, les BAAR retrouvés dans les prélèvements extra-pulmonaires, en particulier lavage gastrique ou urine, ne doivent jamais être considérés automatiquement comme des bacilles de la tuberculose. De plus il a été rapporté des cas de patients suspectés de tuberculose multi-résistante qui se sont révélés être des cas d'infections dues à des mycobactéries de l'environnement.

L'examen microscopique en lumière transmise : méthode de Ziehl-Neelsen

Matériel nécessaire:

Petit matériel

- Flacon contenant du sable et de l'alcool
- Bec bunsen avec alimentation en gaz (raccordement au réseau d'alimentation ou bonbonne)
- Crayon diamant ou crayon à papier pour des lames aux extrémités dépolies
- Entonnoirs de petite taille pour filtrer les solutions de coloration
- Pince métallique pour manipuler les lames à la flamme
- Anse métallique
- Porte-lames
- Baguettes en verre pour support des lames à installer au-dessus de l'évier
- Minuteur
- Goupillon métallique
- Bouteilles pour colorants
- Pissette pour l'eau de rinçage

- Microscope binoculaire, avec lentilles parfocales, objectif 100x et oculaire 10x
- Boîtes de rangement des lames
- Ballon de 1 litre
- Ballon de 2 litres
- Eprouvette de 1 litre
- Eprouvette de 100 ml

Consommables

- Crachoirs
- Papier filtre de taille adaptée aux entonnoirs
- Papier tissu doux ou spécial pour nettoyage des lentilles
- Sac plastique autoclavable pour élimination des déchets
- Lames neuves, propres
- Alcool à brûler
- Coton ou gaze pour confectionner une petite torche enflammée
- Réactifs de coloration
- Solutions de désinfectant
- Huile à immersion, synthétique à indice de réfraction supérieur à 1.5
- Un registre de bacilloscopie

Préparation des réactifs pour la coloration de Ziehl-Neelsen

Fuchsine phéniquée à 1%

Fuchsine basique, qualité certifiée, 10 g

Éthanol, qualité technique, 100 ml

Phénol cristallisé, qualité analytique, 50 g

Dans un flacon en verre de 1 litre, ajouter 100 ml d'éthanol.

- Ajouter 50 g de cristaux de phénol (vérifier que les cristaux sont bien incolores, ne pas utiliser de cristaux teintés) et les dissoudre en agitant la solution;
- Ajouter 10 g de fuchsine basique en poudre. Bien mélanger jusqu'à dissolution complète;
- Ajouter de l'eau distillée pour amener le volume final à 1 litre;
- Transvaser dans une bouteille à verre opaque, étiqueter « fuchsine phéniquée 1%» avec la date de la préparation;

Après filtration conserver à l'abri de la lumière à température ambiante, maximum 12 mois.

Acide-alcool à 3%

Acide chlorhydrique, qualité technique, 30 ml

Éthanol à 95%, qualité technique, 970 ml

- Additionner lentement l'acide chlorhydrique dans l'alcool éthylique (ne jamais verser l'éthanol sur l'acide). Attention la réaction est exothermique;
- Transvaser dans une bouteille à verre opaque, étiqueter «Acide-alcool 3%» avec la date de la préparation;
- Conserver à l'abri de la lumière à température ambiante, maximum 12 mois.

Bleu de méthylène à 0,1%

Bleu de méthylène hydrosoluble, 1 g

Eau distillée, 1 litre

- Dissoudre 1 g de bleu de méthylène dans 1 litre d'eau distillée;
- Transvaser dans une bouteille à verre opaque, étiqueter «bleu de méthylène 0,1%» avec la date de la préparation;

Après filtration conserver à l'abri de la lumière à température ambiante, maximum 12 mois.

Tous les réactifs doivent être contrôlés comme indiqué en annexe.

Coloration des lames:

Coloration





- Les lames sont placées sur une grille porte-lame ou baguettes en verre comme support, bien à l'horizontale, au-dessus d'un évier ou d'un large récipient. Les frottis sont tournés vers le haut, les lames ne doivent pas se toucher et être séparées d'au moins 1 cm (soit environ la largeur d'un doigt).
- Inclure des lames contrôles de qualité, une positive et une négative.

- Recouvrir totalement la lame de fuchsine.
- Chauffer doucement, au moyen d'un goupillon imbibé d'alcool à brûler, jusqu'à émission de vapeur. Éviter l'ébullition et le dessèchement du colorant. L'ébullition pourrait modifier la morphologie des bacilles et mener à des erreurs de lecture.
- Répéter cette opération au bout de 3 à 5 minutes en rajoutant de la fuchsine, toujours filtrée, si nécessaire pour que la lame soit toujours complètement recouverte de colorant.
- Laisser le colorant en contact avec les lames pendant au moins 10 minutes.

Décoloration





- Rincer délicatement à l'eau chaque lame individuellement (ne pas éclabousser les autres lames) en utilisant une pissette et non le jet du robinet qui risquerait de décrocher le frottis de la lame. Incliner les lames une à une pour en égoutter l'eau.
- Recouvrir chaque lame avec le mélange acide-alcool.
- Laisser agir 3 minutes.

Contre coloration





 Rincer délicatement à l'eau chaque lame individuellement (ne pas éclabousser les autres lames) en utilisant une pissette et non le jet du robinet qui risquerait de décrocher le frottis de la lame. Incliner les lames une à une pour en égoutter l'eau, le frottis est alors incolore ou légèrement teinté en rose.

- Couvrir chaque lame de solution de bleu de méthylène.
- Laisser agir 1 minute.
- Rincer délicatement à l'eau chaque lame individuellement (ne pas éclabousser les autres lames) en utilisant une pissette et non le jet du robinet qui risquerait de décrocher le frottis de la lame. Incliner les lames une à une pour en égoutter l'eau.
- Laisser sécher les lames à l'air sur un porte-lame. Ne pas sécher au buvard.



Messages clés

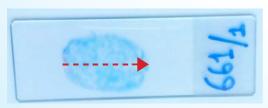
- Respecter les temps de chaque étape à l'aide d'un minuteur
- 10 minutes pour la fuchsine, 3 minutes pour l'acide-alcool, 1 minute pour le bleu de méthylène
- Appliquer les solutions de coloration/décoloration et l'eau de rinçage à l'extrémité de chaque lame, jamais directement sur le frottis, pour éviter de le détacher.

Examen au microscope

- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis en laissant tomber la goutte sur la lame et prenant soin de ne pas toucher la lame avec l'embout de l'applicateur
- Utiliser un objectif de magnification 40 fois pour la mise au point en recherchant les zones de matériel purulent ou mucoïde. Éviter les zones où le frottis est trop épais, trop fin ou ne révèle que des cellules épithéliales.

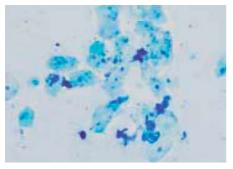


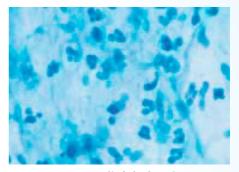
- Mettre en place l'objectif de magnification 100 fois.
- Ajuster la mise au point avec délicatesse en utilisant la vis micrométrique jusqu'au moment où l'image du champ apparaît. L'objectif ne doit pas toucher la lame.
- Examiner le frottis de manière systématique de gauche à droite, en déplaçant la lame dans le sens de la longueur pour explorer le champ suivant en évitant tout chevauchement. Examiner au moins 100 champs, soit une longueur de frottis avant de conclure que le résultat est négatif. Cette lecture doit prendre environ 5 minutes. Si la lame est positive, moins de champs peuvent être lus (voir plus bas).



1 longueur de frottis = 100 champs

- Les BAAR apparaissent sous forme de bâtonnets rouges, fins, droits ou incurvés, à coloration régulière ou granuleuse, isolés ou groupés en amas de quelques bacilles.
- Les problèmes les plus fréquemment rencontrés sont indiqués en Annexe.
- Après lecture, ranger les lames dans une boîte, sans écrire le résultat sur la lame, dans l'ordre des numéros du registre de laboratoire. Toutes les lames sont conservées au moins 1 an, ou 6 mois si le volume annuel dépasse 10000 lames.
- Essuyer l'objectif après la lecture de chaque lame pour éliminer le surplus d'huile. Après la lecture, procéder au nettoyage du microscope avec le liquide nettoyant du fournisseur ou un mélange 80/20 d'éthyléther et d'éthanol ou une solution d'éthanol à 70%.

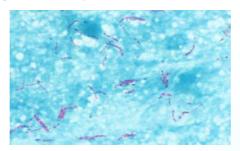




Mauvaise qualité de frottis

Bonne qualité de frottis

Exemples de morphologies caractéristiques des bacilles de la tuberculose



Interprétation et enregistrement des résultats

Observation	Interprétation
Aucun BAAR dans 100 champs	Absence de BAAR
1 à 9 BAAR dans 100 champs	Noter le nombre exact de bacilles
10 à 99 BAAR dans 100 champs	1+
1 à 10 BAAR par champ, lire 50 champs	2+
Plus de 10 BAAR par champ, lire 20 champs	3+

Noter les résultats sur le registre en vérifiant à nouveau le numéro d'identification de la lame. Noter les résultats positifs en rouge sur le registre (pas sur la lame).

L'examen microscopique en fluorescence

En 2011 l'OMS a publié une nouvelle recommandation sur la microscopie à fluorescence utilisant des diodes électroluminescentes (LED) pour le diagnostic de la tuberculose. La microscopie à fluorescence est aussi précise et au moins 10% plus sensible que la microscopie à lumière transmise. De plus la technique présente des avantages opérationnels, de coût et de réduction de la charge de travail. L'OMS recommande une approche progressive pour passer de la microscopie à lumière transmise à la microscopie à fluorescence avec LED dans le réseau des laboratoires de tuberculose.

La préparation des frottis est exactement la même que pour la microscopie à lumière transmise.

Matériel nécessaire

Petit matériel

- Flacon contenant du sable et de l'alcool
- Bec Bunsen avec alimentation en gaz (raccordement au réseau d'alimentation ou bonbonne)
- Crayon diamant ou crayon à papier pour des lames aux extrémités dépolies
- Entonnoirs de petite taille pour filtrer les solutions de coloration
- Pince métallique pour manipuler les lames à la flamme (pour fixation après séchage à l'air libre)
- Anse métallique
- Porte-lames
- Baguettes en verre pour support des lames à installer au-dessus de l'évier
- Minuteur
- Bouteilles pour colorants
- Pissette pour l'eau de rinçage
- Microscope binoculaire à fluorescence avec lampe LED, objectif 10x et 40X, oculaire 10x. Noter qu'un modèle de microscope offre les deux possibilités de fluorescence et lumière transmise et permet de passer d'un type de microscopie à l'autre par une simple manœuvre.
- Boîtes de rangement des lames
- Ballon de 1 litre
- Ballon de 2 litres
- Éprouvette de 1 litre
- Éprouvette de 100 ml

Consommables

- Crachoirs
- Papier filtre de taille adaptée aux entonnoirs
- Papier tissu doux ou spécial pour nettoyage des lentilles
- Sac plastique autoclavable pour élimination des déchets
- Lames neuves, propres
- Réactifs de coloration
- Solutions de désinfectant
- Un registre de bacilloscopie

Préparation des réactifs pour la coloration à l'auramine

Auramine à 0,1%

- Auramine, qualité certifiée, 10g
- Éthanol dénaturé, qualité technique, 1000 ml
- Cristaux de phénol, qualité analytique, 30 g
- Eau distillée, 900 ml

Solution A

- Dissoudre 10 g de poudre d'auramine dans 1000 ml d'éthanol. Bien mélanger jusqu'à dissolution complète. Ne pas chauffer. L'auramine est potentiellement cancérigène, toujours porter des gants et des masques et nettoyer immédiatement toutes les éclaboussures
- Étiqueter « Préparation d'auramine 1% », dater et stocker dans une bouteille opaque à l'obscurité, à température ambiante, au maximum 12 mois.

Solution B

- Dissoudre 30 g de cristaux de phénol dans 900 ml d'eau distillée
- Étiqueter «Phénol 3%», dater et stocker dans une bouteille opaque à l'obscurité, à température ambiante, au maximum 12 mois.

Solution d'auramine à 0,1% (Solution de travail)

- Mélanger 50 ml de solution a et 450 ml de solution b
- Étiqueter «Auramine 0,1%», dater et stocker dans une bouteille opaque à l'obscurité, à température ambiante, au **maximum 2 mois**
- Bien se laver les mains après la préparation des réactifs
- Filtrer et conserver à l'abri de la lumière à température ambiante, maximum 12 mois.

Acide-alcool à 0,5%

- Acide chlorhydrique, qualité technique, 5 ml
- Éthanol à 95%, qualité technique, 1000 ml
- Additionner lentement l'acide chlorhydrique dans l'alcool éthylique (ne jamais verser l'éthanol sur l'acide). Attention la réaction est exothermique
- Transvaser dans une bouteille à verre opaque, étiqueter « Acide-alcool 0,5% » avec la date de la préparation
- Conserver à l'abri de la lumière à température ambiante, maximum 12 mois.

Bleu de méthylène à 0,3%

Bleu de méthylène hydrosoluble, 3 g

Eau distillée, 1 litre

- Dissoudre 3 g de bleu de méthylène dans 1 litre d'eau distillée
- Transvaser dans une bouteille à verre opaque, étiqueter « Bleu de méthylène 0,3% » avec la date de la préparation
- Filtrer et conserver à l'abri de la lumière à température ambiante, maximum 12 mois.

Tous les réactifs doivent être contrôlés comme indiqué en annexe.

Coloration des lames: méthode de fluorescence à l'auramine

Coloration

- Les lames sont placées sur une grille porte-lame ou baguettes en verre, bien à l'horizontale, au-dessus d'un évier ou d'un large récipient. Les frottis sont tournés vers le haut, les lames ne doivent pas se toucher et être séparées d'au moins 1 cm (soit environ la largeur d'un doigt).
- Inclure des lames contrôles de qualité, une positive et une négative.
- Recouvrir totalement la lame de solution d'auramine filtrée.
- Laisser le colorant en contact avec les lames pendant au moins 20 minutes.
 Ne pas chauffer.



Décoloration

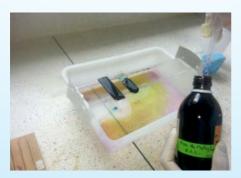
- Rincer délicatement à l'eau chaque lame individuellement (ne pas éclabousser les autres lames) en utilisant une pissette et non le jet du robinet qui risquerait de décrocher le frottis de la lame. Incliner les lames une à une pour en égoutter l'eau
- Recouvrir chaque lame avec le mélange acide-alcool
- Laisser agir 1 à 2 minutes.





Contre coloration

- Rincer délicatement à l'eau chaque lame individuellement (ne pas éclabousser les autres lames) en utilisant une pissette et non le jet du robinet qui risquerait de décrocher le frottis de la lame. Incliner les lames une à une pour en égoutter l'eau.
- Couvrir chaque lame de solution de bleu de méthylène
- Laisser agir 1 minute
- Rincer délicatement à l'eau chaque lame individuellement (ne pas éclabousser les autres lames) en utilisant une pissette et non le jet du robinet qui risquerait de décrocher le frottis de la lame. Incliner les lames une à une pour en égoutter l'eau.
- Laisser sécher les lames à l'air sur un porte-lame. Ne pas sécher au buvard.





Attention : en cas d'utilisation de réactifs commercialisés prêts à l'emploi, suivre les iwndications du fabricant pour les différentes étapes et respecter les temps d'application recommandés.

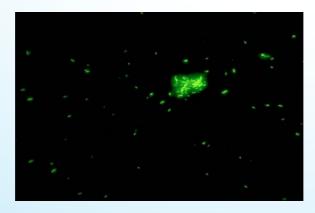
Examen au microscope

Lire les lames le jour même de leur coloration car la lumière visible fait rapidement disparaître la coloration fluorescente.

Utiliser l'objectif 20X pour balayer le frottis et l'objectif 40x pour la lecture.

- Les BAAR apparaissent jaune-vert fluorescent sur fond noir, sous forme de bâtonnets, longs, fins, légèrement incurvés, mais avec des intensités de coloration variables (uniforme, bipolaire ou granuleuse), isolés ou groupés en amas de quelques bacilles.
- Il faut observer au moins 100 champs.
- Ne pas recolorer les lames douteuses à la coloration de Ziehl-Neelsen.
- Les frottis colorés peuvent révéler des artefacts fluorescents qui n'ont pas la morphologie typique des bacilles et parfois pas la même couleur.
- Les formes bacillaires colorées en jaune ou vert non fluorescent ne doivent pas être considérées comme des BAAR.
- Les problèmes les plus fréquemment rencontrés sont indiqués en annexe.
- Après lecture, ranger les lames dans une boîte, sans écrire le résultat sur la lame, dans l'ordre des numéros du registre de laboratoire.

Exemples de morphologies caractéristiques des bacilles de la tuberculose



Interprétation et enregistrement des résultats

Expression	200x (26 Champs)	400x (52 champs)
Pas vue de BAAR	0 BAAR sur toute la lame	0 BAAR sur toute la lame
Nombre réel	1 – 29 BAAR/ 26champs	1 – 19 BAAR / 52 champs
+	1 – 10 BAAR / Champ	20 - 199 BAAR /52 Champs
++	10 – 100 BAAR par Champ	5 - 50 BAAR par Champ (Lire 10-15 Champs)
+++	>100 BAAR par Champ	>50 BAAR par Champ (Lire 5-à 7champs)

⁻ Noter les résultats sur le registre en vérifiant à nouveau le numéro d'identification de la lame.

⁻ Noter les résultats positifs en rouge sur le registre (pas sur la lame).

Assurance qualité

Contrôle de qualité des réactifs nouvellement préparés

Tous les réactifs doivent être contrôlés dès leur préparation selon la procédure suivante :

Sélectionner une expectoration riche en bacilles (1+) à partir de laquelle est préparée une collection de frottis fixés (de 30 à 50 lames). Cette collection de frottis sera conservée dans des boîtes avec un numéro correspondant) la boîte et la date de préparation.

Sélectionner une expectoration négative. De la même manière, préparer une collection de frottis à partir de l'échantillon négatif.

A partir de chacune des collections, prendre 3 à 4 lames et les colorer avec le lot de colorants nouvellement préparé.

- Les frottis négatifs ne doivent pas révéler d'images bacilliformes pouvant induire une confusion avec les BAAR;
- Les frottis positifs doivent montrer des bacilles bien visibles;
- L'arrière plan doit être complètement décoloré;
- Il ne doit pas y avoir de cristaux visibles de colorants;
- Les BAAR doivent présenter une coloration forte et unie.

Retenir les lots de colorants si toutes ces conditions sont remplies.

Si les résultats ne sont pas satisfaisants, répéter la coloration sur 2 autres frottis. Retenir les lots si les résultats sont corrects, éliminer les lots dans le cas contraire.

La coloration des frottis positifs permet de contrôler aussi bien la qualité des réactifs du nouveau lot de colorant préparé que l'exactitude de la méthode de coloration. Ainsi, si la lame du contrôle positif ne montre pas de BAAR, cela signifie que soit les réactifs sont défectueux soit la procédure n'a pas été effectuée correctement. Lorsque le problème a été identifié et corrigé, la coloration doit être répétée avec de nouveaux frottis utilisés comme contrôles.

Surveillance des résultats

Des indicateurs de performance utiles pour l'évaluation de la qualité des résultats sont facilement calculés à partir des données du registre de laboratoire. Les valeurs fortes ou faibles ou des variations importantes peuvent aider à détecter des anomalies.

Il est pratique de noter en bas de chaque page du registre les données suivantes et d'effectuer régulièrement les calculs tous les mois ou tous les trimestres.

	Nombre de frottis négatifs	Nombre de frottis avec nombre exact de BAAR	Nombre de frottis 1+	Nombre de frottis 2+	Nombre de frottis 3+	Nombre total de frottis positifs	Nombre total de frottis
Frottis de suspects	a	b	С	d	е	f = (b+c+d+e)	g= (a+f)
Frottis de suivi de traitement	h	i	j	k	I	m = (i+j+k+l)	n = (h+m)

Charge de travail: g + n

% Positifs parmi les suspects : f / g

% Positifs parmi les cas de suivi de traitement : m / n

% De faiblement positifs parmi les suspects : b + c / f

La charge de travail maximum pour rester dans une zone de bonne performance est de 20 à 25 lames par jour par microscopiste. Il faut également considérer que pour entretenir le savoir-faire, le minimum de lames lues est de 20 à 25 par semaine soit un minimum de 2 à 3 lames par jour.

Pour les autres indicateurs, il n'y a pas de valeur attendue car les chiffres sont dépendants du contexte épidémiologique. Mais les variations de tendance sont très instructives et permettent de détecter soit un changement épidémiologique ou fonctionnel (par exemple : variation saisonnière chez les nouveaux cas, défaut d'orientation des suspects lié à une nouvelle équipe médicale insuffisamment formée, etc) soit une amélioration ou détérioration de la qualité du travail.

Supervision et contrôle de qualité externe

Une supervision décentralisée des laboratoires de microscopie est effectuée par les responsables de la supervision au niveau de chaque région qui rédigeront chacun les rapports. Les rapports de supervision sont analysés par le LNRT. A l'occasion des visites, des lames sont collectées pour relecture en aveugle afin d'assurer le contrôle de qualité externe de l'ensemble des laboratoires du réseau de microscopie.

Les superviseurs du LNRT assurent la supervision et le contrôle de qualité des laboratoires où exercent les superviseurs régionaux et les laboratoires ayant montré une discordance lors de la supervision régionale.

Annexes

Problèmes fréquents rencontrés avec la coloration de Ziehl-Neelsen

Problème	Cause	Action corrective	
Frottis trop	Décoloration insuffisante	Respecter le temps de décoloration Vérifier la solution de décoloration	
rouge	La fuchsine a séché sur le frottis	Vérifier l'horizontalité du porte-lames Bien recouvrir la totalité de la lame de fuchsine	
	Mauvaise qualité de solution de fuchsine	Vérifier la solution de fuchsine	
	Etape de chauffage insuffisante	Respecter la procédure de chauffage avec 2 cycles d'émission de vapeur	
	Temps de contact de la fuchsine insuffisant	Respecter le temps de coloration d'au moins 10 minutes	
BAAR pâles	Frottis trop chauffé à la fixation	Respecter les précautions de chauffage à la fixation	
	Frottis trop chauffé pendant l'étape de coloration	Arrêter le chauffage dès l'émission de vapeur de fuchsine	
	Solution de fuchsine périmée	Ne pas conserver de solution de fuchsine plus de 12 mois	
	Solution de fuchsine mal conservée	Conserver la fuchsine à l'abri de la lumière dans une bouteille opaque rangée à l'obscurité	
	Temps de contre coloration trop long	Respecter 60 secondes de coloration au bleu de méthylène	
Arrière-plan trop foncé	Rinçage des lames inefficace après la coloration au bleu de méthylène	Respecter l'étape de rinçage	
	Solution de bleu de méthylène trop concentrée	Vérifier la solution de bleu de méthylène	
	Frottis trop épais	Refaire un frottis	
Présence de dépôts	Colorants non filtrés	Bien filtrer les solutions en changeant de filtre chaque jour	

Problèmes fréquents rencontrés avec la coloration à l'auramine

Problème	Cause	Action corrective
	Décoloration insuffisante	Respecter le temps de décoloration
Fluorescence trop vive	Contre-colorant trop faible	Préparer une nouvelle solution de contre-colorant
	L'auramine a séché sur la lame	Vérifier l'horizontalité du porte-lames Bien recouvrir la totalité de la lame d'auramine
	Auramine non filtrée	Bien filtrer la solution d'auramine en changeant de filtre chaque jour
	Frottis trop épais	Refaire un frottis
	Mauvaise qualité de solution d'auramine	Vérifier la solution d'auramine Stocker dans une bouteille opaque à l'obscurité
	Temps de contact de l'auramine insuffisant	Respecter le temps de coloration d'au moins 20 minutes
BAAR pâles	Frottis trop chauffé à la fixation	Respecter les précautions de chauffage à la fixation
	Décoloration trop poussée	Respecter le temps de décoloration 1 à 2 minutes
	Frottis exposés à la lumière du jour	Conserver les lames dans une boîte Lire les frottis le plus rapidement possible
	Frottis trop épais	
	Contre-coloration trop longue	Respecter 60 secondes de coloration au bleu de méthylène
Arrière-plan trop foncé	Décoloration trop longue	Respecter 2 minutes de décoloration
	Rinçage des lames inefficace après contre-coloration au bleu de méthylène	Respecter l'étape de rinçage
	Solution de bleu de méthylène trop concentrée	Vérifier la solution de bleu de méthylène
	Frottis trop épais	Refaire un frottis

Précautions particulières : Huile d'immersion et nettoyage des objectifs

Le choix de l'huile à immersion est très important car la qualité de l'huile utilisée conditionne la durée de vie du microscope. L'usage du xylène est absolument prohibé pour garantir la qualité des objectifs. Choisir une huile synthétique à indice de réfraction supérieur à 1.5. Ne jamais utiliser d'huile de cèdre. Une huile de bonne qualité est fluide et s'élimine naturellement de la lame en position verticale. Un passage léger d'un papier doux est généralement suffisant pour nettoyer les objectifs. Pour un nettoyage plus intense, utiliser un mélange 80:20 d'éthyléther et d'alcool, ou de l'éthanol à 70%.

Dans une huile de bonne qualité (avec un indice de réfraction > 1,5), la tige de verre disparaît.

La tige reste visible dans une huile de mauvaise qualité (avec un indice de réfraction < 1,5).

Références bibliographiques

World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control. Part II: Microscopy. World Health Organization, Geneva, 1998.

Technical guide: sputum examination for tuberculosis by direct microscopy in low income countries, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, Paris, 2000.

World Health Organization. Reduction of number of smears for the diagnosis of pulmonary TB. TB diagnostics and laboratory strengthening – WHO policy, 2007. Available at: http://www.who.int/tb/laboratory/policy_diagnosis_pulmonary_tb/en.

Mase S, Ramsay A, Ng N, Henry M, Hopewell PC, Cunningham J, Urbanczik R, Perkins M, Aziz MA, Pai M. Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. Int J Tuberc Lung Dis 2007;11(5):485-95.

World Health Organization. Definition of a new sputum smear-positive TB case. TB diagnostics and laboratory strengthening – WHO policy, 2007. Available at: http://www.who.int/tb/laboratory/policy_sputum_smearpositive_tb_case/en.

Angra P et al. Ziehl-Neelsen staining: strong red on weak blue, or weak red under strong blue? International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 2007, 11:1160–1161.

Bonnet M, Ramsay A, Gagnidze L, Githui W, Guerin PJ, Varaine F. Reducing the number of sputa examined, and thresholds for positivity: An opportunity to optimize smear microscopy. Int J Tuberc Lung Dis 2007;11(9):953-8.

World Health Organization. Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis: policy statement. 2011. WHO/HTM/TB/2011.8 available at http://www.who.int/tb/publications/2011/led_microscopy_diagnosis 9789241501613/en. Accessible à http://www.who.int/tb/publications/2012/tb_biosafety/en/.

World Health Organization. Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual. Geneva: World Health Organization, 2013 (WHO/HTM/TB/2012.11).

The handbook: Laboratory diagnosis of tuberculosis by sputum microscopy. SA Pathology, Adelaide, 2013.

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