

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 2011

THESE N°

**APPLICATION DES EXIGENCES TECHNIQUES DE LA NORME NF EN ISO 15189
AU SECTEUR DE PARASITOLOGIE DIRECTE DU C.H.U. DE LIMOGES**

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE
obtenu après soutenance du**

**MEMOIRE
du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale**

présentée et soutenue publiquement : le 06 mai 2011

PAR

Jean-Philippe COLLET

né le 06 mai 1980, à Nice.

EXAMINATEURS DE LA THESE

Mme le Professeur ALAIN Sophie.....Président
Mme le Professeur DARDÉ Marie-Laure.....Juge
M. le Professeur DREYFUSS GillesJuge
M. le Docteur BOUTEILLE BernardJuge
Mme le Docteur ROQUES Christine.....Membre invité

DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur VALLEIX Denis

ASSESEURS:

Monsieur le Professeur LASKAR Marc
Monsieur le Professeur MOREAU Jean-Jacques
Monsieur le Professeur PREUX Pierre-Marie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:

* C.S = Chef de Service

ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ADENIS Jean-Paul (C.S)	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE, VIROLOGIE
ALDIGIER Jean-Claude (C.S)	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD-MOUVEROUX Françoise (C.S)	MEDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
AUBARD Yves (C.S)	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
BEAULIEU Pierre	ANESTHESIOLOGIE et REANIMATION CHIRURGICALE
BEDANE Christophe	DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE
BERTIN Philippe (C.S)	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre (C.S)	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNAUD François	PNEUMOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie (C.S.)	DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE
BORDESSOULE Dominique (C.S)	HEMATOLOGIE
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre (C.S)	RADIOTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre (C.S)	PSYCHIATRIE ADULTES
COGNE Michel (C.S)	IMMUNOLOGIE
COLOMBEAU Pierre	UROLOGIE
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
COURATIER Philippe	NEUROLOGIE
DANTOINE Thierry (C.S)	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
DARDE Marie-Laure (C.S)	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel	PEDIATRIE
DENIS François (Sur 31/08/2011)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DESSPORT Jean-Claude	NUTRITION
DRUET-CABANAC Michel (C.S)	MEDECINE ET SANTE DU TRAVAIL
DUMAS Jean-Philippe (C.S)	UROLOGIE
DUMONT Daniel (Sur 31/08/2012)	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL
ESSIG Marie	NEPHROLOGIE
FEISS Pierre (Sur 31.08.2013)	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
FEUILLARD Jean (C.S)	HEMATOLOGIE
FOURCADE Laurent	CHIRURGIE INFANTILE
GAINANT Alain (C.S)	CHIRURGIE DIGESTIVE
GAROUX Roger (C.S)	PEDOPSYCHIATRIE
GASTINNE Hervé (C.S) (Retraite au 04.10.10)	REANIMATION MEDICALE
GUIGONIS Vincent	PEDIATRIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE
JAUBERTEAU-MARCHAN Marie-Odile	IMMUNOLOGIE
LABROUSSE François (C.S)	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LASKAR Marc (C.S)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne (CS)	PEDIATRIE
MABIT Christian	ANATOMIE
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE
MAUBON Antoine	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
MELLONI Boris (C.S)	PNEUMOLOGIE
MERLE Louis	PHARMACOLOGIE CLINIQUE

MONTEIL Jacques (C.S)
MOREAU Jean-Jacques (C.S)
MOULIES Dominique (C.S) (**Sur. 31.08.2013**)
MOUNAYER Charbel
NATHAN-DENIZOT Nathalie (C.S)
PARAF François
PLOY Marie-Cécile (C.S)
PREUX Pierre-Marie
ROBERT Pierre-Yves
SALLE Jean-Yves (C.S)
SAUTEREAU Denis (C.S)
SAUVAGE Jean-Pierre (**Sur 31/08/2011**)
STURTZ Franck (C.S)
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre
TREVES Richard
TUBIANA-MATHIEU Nicole (C.S)
VALLAT Jean-Michel (C.S)
VALLEIX Denis (C.S)
VANDROUX Jean-Claude (**Sur 31/08/2011**)
VERGENEGRE Alain (C.S)
VIDAL Elisabeth (C.S)
VIGNON Philippe
VIROT Patrice (C.S)
WEINBRECK Pierre (C.S)
YARDIN Catherine (C.S)

BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
 NEUROCHIRURGIE
 CHIRURGIE INFANTILE
 RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
 ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
 ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
 BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
 EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
 OPHTALMOLOGIE
 MEDECINE PHYSIQUE ET READAPTATION
 GASTRO-ENTEROLOGIE, HEPATOLOGIE
 OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
 BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
 ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES
 RHUMATOLOGIE
 CANCEROLOGIE
 NEUROLOGIE
 ANATOMIE – CHIRURGIE GENERALE
 BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
 EPIDEMIOLOGIE-ECONOMIE DE LA SANTE et PREVENTION
 MEDECINE INTERNE
 REANIMATION MEDICALE
 CARDIOLOGIE
 MALADIES INFECTIEUSES
 CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE

MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

AJZENBERG Daniel
ANTONINI Marie-Thérèse (C.S)
BOURTHOMIEU Sylvie
BOUTEILLE Bernard
CHABLE Hélène
DURAND-FONTANIER Sylvaine
ESCLAIRE Françoise
FUNALOT Benoît
HANTZ Sébastien
LAROCHE Marie-Laure
LE GUYADER Alexandre
MARIN Benoît
MOUNIER Marcelle
PICARD Nicolas
QUELVEN-BERTIN Isabelle
TERRO Faraj
VERGNE-SALLE Pascale
VINCENT François

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
 PHYSIOLOGIE
 CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE
 PARASITOLOGIE - MYCOLOGIE
 BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
 ANATOMIE – CHIRURGIE DIGESTIVE
 BIOLOGIE CELLULAIRE
 BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
 BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
 PHARMACOLOGIE CLINIQUE
 CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
 EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
 BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE – HYGIENE HOSPITALIERE
 PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
 BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
 BIOLOGIE CELLULAIRE
 THERAPEUTIQUE
 PHYSIOLOGIE

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

CAIRE François

NEUROCHIRURGIE

P.R.A.G.

GAUTIER Sylvie

ANGLAIS

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

BUCHON Daniel
BUISSON Jean-Gabriel

MÉDECINE GÉNÉRALE
 MEDECINE GENERALE

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

DUMOITIER Nathalie
MENARD Dominique
PREVOST Martine

MEDECINE GENERALE
 MEDECINE GENERALE
 MEDECINE GENERALE

REMERCIEMENTS

Au Professeur Sophie ALAIN,

PROFESSEUR DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER

SERVICE DE BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE-HYGIENE DU CHU DE LIMOGES

Vous m'avez fait l'honneur de bien vouloir assurer la présidence de cette thèse.

Je vous remercie pour toute l'attention que vous savez porter aux internes en Biologie Médicale.

Veillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude et de tout mon respect.

Au Professeur Gilles DREYFUSS,

PROFESSEUR DES UNIVERSITES-FACULTE DE PHARMACIE DE LIMOGES

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail.

Soyez persuadé de mon plus profond respect.

Au Professeur Marie-Laure DARDÉ,

PROFESSEUR DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER

CHEF DU SERVICE DE PARASITOLOGIE-MYCOLOGIE DU CHU DE LIMOGES

Mes plus sincères remerciements pour la confiance que vous m'avez accordée en acceptant d'être ma directrice de thèse.

Au cours de ces années, votre grande disponibilité, votre rigueur scientifique et votre immense culture médicale m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions possibles.

Vos qualités professionnelles et humaines imposent l'admiration.

Au Docteur Bernard BOUTEILLE,

MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER

SERVICE DE PARASITOLOGIE-MYCOLOGIE DU CHU DE LIMOGES

Merci de m'avoir épaulé tout au long de ce travail.

Vos connaissances et votre expérience hors du commun ont su répondre à mes nombreuses sollicitations.

Trouvez ici le témoignage de ma respectueuse et sincère reconnaissance.

Au Docteur Christine ROQUES,

BIOQUALITICIENNE

SERVICE DE PARASITOLOGIE-MYCOLOGIE DU CHU TOULOUSE RANGUEIL

En acceptant de m'initier à l'univers de la qualité et en partageant vos connaissances si précieuses, vous avez permis la réalisation de ce travail.

Votre bonne humeur et votre disponibilité laissent transparaître d'énormes qualités humaines.

Merci infiniment.

Au Docteur Daniel AJZENBERG,

C'est un immense privilège d'avoir pu travailler à tes côtés, tes compétences et tes qualités d'orateur ont su rendre mon apprentissage passionnant.

Merci pour ta bonne humeur.

A tous mes collègues internes,

Pour les chaleureux moments partagés ensemble.

A Annabelle, Hélène, Martine, Maryse, Michèle, Murielle et Valérie,

Merci d'avoir contribué à la réalisation de ce travail et de participer à sa mise en application.

A Christine et Martine,

A tout le personnel hospitalier qui a participé de près ou de loin au bon déroulement de mes années d'internat.

A mes parents,

Pour m'avoir permis d'être ce que je suis et m'avoir donné les armes nécessaires à mon épanouissement. Vous êtes un exemple quotidien de tolérance et de bonté. De simples mots ne peuvent suffire à vous témoigner la profondeur de mon amour.

A mon frère Guillaume,

Rien ne peut remplacer tous ces moments de joie, d'amour, de complicité et de solidarité.

Tu es pour moi un modèle et une source inépuisable d'inspiration.

Merci d'exister.

A ma sœur Nathalie,

Merci ma sœur pour ta générosité et ton sourire qui ont illuminé mon enfance.

Tu es une grande sœur fantastique. Quel plaisir de te voir heureuse.

A mes neveux Marion, Clément et Ange,

Pour tous les moments de bonheur que vous nous apportez.

A ma grand-mère Joséphine et à la mémoire de mon grand-père Marc,

Pour ces merveilleux souvenirs d'enfance.

A René,

A mes beaux-parents Guy et Marie-Rafaëlla,

Pour votre immense soutien au cours de ces longues années d'études. La confiance que vous m'avez accordée a une valeur inestimable. Soyez certains de l'amour et du respect que j'éprouve à votre égard.

A Aldric,

Pour les moments précieux et enrichissants que nous avons partagés. Ta force d'esprit et ton intelligence forcent l'admiration.

A Alalia,

A Vincent et Chloé,

Pour leur amitié à toute épreuve.

A Christophe, Didier, Marianne, Romain, Pierre-Alain et Youcef

Aux petits Louis et Arthur

A Lydia,

Pour ton amour, ta présence et ton soutien permanents depuis le premier jour de notre rencontre.

Tu sais me comprendre, m'écouter et me rassurer lorsque je doute. La vie à tes côtés est tous les jours plus intense, tu fais de moi un homme comblé.

Je suis fier que tu sois la mère de mes enfants et d'être uni à une aussi belle personne que toi.

A mon fils Vincenzo,

Tu m'apprends ce qu'est la vie et me remplis de bonheur. Comment est-il possible d'être aussi merveilleux ?

A Giovanni,

Nous t'attendons avec impatience.

LISTE DES ABREVIATIONS

AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
ANAES	Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé
ANOFEL	Association Française des Enseignants et Praticiens Hospitaliers Titulaires de Parasitologie et de Mycologie Médicale
CATT	Card Agglutination Trypanosomiasis Test
CDC	Centers for Disease Control
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CNR	Centre National de Référence
Cofrac	Comité français d'accréditation
EBV	Virus d'Epstein-Barr
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
ELISA	Enzyme-Linked ImmnoSorbent Assay
FR	Facteur Rhumatoïde
GBEA	Guide de Bonne Exécution des Analyses de Biologie Médicale
GE	Goutte Epaisse
GLIMS	General Laboratory Information Management System
GTA	Guide Technique d'Accréditation
HRP	Histidine Rich Protein
ICT	Immunochromatographic Test
IFI	Immunofluorescence Indirecte
mAECT	Chromatographie par mini colonne échangeuse d'anions
M-	Sujets non infectés
M+	Sujets infectés
MIF	Merthiolate-Iode-Formol
MGG	May-Grünwald-Giemsa
MQ	Manuel Qualité
NF EN ISO	Norme Française Européenne Internationale
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase Chain Reaction
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
QBC	Quantitative Buffy Coat
S-	Recherches négatives
S+	Recherches positives
Se	Sensibilité diagnostique
SIDA	Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
Sp	Spécificité diagnostique
VAT	Variant Antigen Type
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WB	Western Blot

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	4
LISTE DES ABREVIATIONS	13
SOMMAIRE.....	14
INTRODUCTION	16
GENERALITES	19
1. LA NORME NF EN ISO 15189 ET LES GUIDES D'ACCREDITATION.....	20
1.1 La Norme NF EN ISO 15189	20
1.2 Les guides d'accréditation du Cofrac	21
2. LES ASPECTS FONDAMENTAUX DE LA NORME	21
2.1 Organisation et management.....	21
2.2 Le personnel.....	22
2.3 Maîtrise documentaire	22
2.4 Traçabilité	24
2.5 Identification et maîtrise des non-conformités.....	24
2.6 Validation des méthodes.....	24
2.7 Incertitude de mesure.....	27
2.8 Prestation de conseils.....	28
3. DEROULEMENT DE LA DEMARCHE D'ACCREDITATION	29
3.1 Entrée dans la démarche d'accréditation	29
3.2 Relation avec les auditeurs.....	30
3.3 Obtention de l'accréditation.....	31
APPLICATION DE LA NORME A LA PARASITOLOGIE DIRECTE DU CHU DE LIMOGES	32
1. UN TRAVAIL QUI S'INSCRIT DANS UN PROJET HOSPITALIER	33
2. LES SPECIFICITES DE LA PARASITOLOGIE DIRECTE FACE AUX EXIGENCES DE LA NORME.....	33
3. LES OBJECTIFS PRIORITAIRES.....	34
3.1 Analyse du risque d'erreur en parasitologie pour cibler les actions prioritaires.....	34
3.2 L'intérêt du patient : une priorité de notre démarche	36
3.3 La maîtrise de la documentation	37
4. LES MOYENS UTILISES.....	38

4.1	Les documents Cofrac	38
4.2	Un modèle d'accréditation.....	38
4.3	Les ouvrages de référence.....	38
	RESULTATS.....	40
1.	PRESTATIONS DE CONSEILS	41
1.1	Les exigences de la Norme	41
1.2	Des aides à la prescription pour répondre à cette exigence	41
1.3	Avis et interprétations.....	46
2.	EXIGENCES LIEES AU PERSONNEL	47
2.1	Pré-analytique	47
2.2	Analytique.....	56
2.3	Post-analytique.....	61
3.	PROCEDURES TECHNIQUES	61
3.1	Le prélèvement est réalisé au laboratoire	61
3.2	Le prélèvement n'est pas réalisé au laboratoire	75
	DISCUSSION.....	163
1.	LES AVANCEES	164
2.	LES LIMITES ET LES PERSPECTIVES.....	165
2.1	Les mesures restant à mettre en place	165
2.2	Le futur bâtiment de Biologie Médicale.....	168
	CONCLUSION.....	171
	BIBLIOGRAPHIE.....	173
	TABLE DES MATIERES.....	177
	TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	182
	TABLE DES TABLEAUX.....	184

INTRODUCTION

Le 23 septembre 2008, Michel Ballereau, conseiller général des établissements de santé, propose au ministère de la Santé, de la Jeunesse et des Sports, un rapport pour un projet de réforme de la Biologie Médicale. La réforme proposée prône la qualité de l'analyse tout en considérant que le plus important est la réponse apportée à une question clinique, par un examen approprié réalisé dans les meilleures conditions de qualité et de coût possibles. Il s'agit de passer d'un système de « normes » réglementaires telles que la taille des locaux ou les quotas de personnels, à un système qui repose sur l'accréditation vérifiant notamment la qualité des résultats, la qualification permanente du personnel et la prise en compte des erreurs constatées.

L'accréditation deviendrait alors obligatoire pour tous les laboratoires de Biologie Médicale, sur la totalité des examens réalisés. Le 13 janvier 2010, l'Ordonnance d'application n°2010-49 relative à la Biologie Médicale rend effective cette réforme, et accorde, aux laboratoires existants, une période transitoire: 3 ans pour la première étape marquant la volonté d'accréditation sur la totalité de l'activité et 6 ans pour l'accréditation obligatoire effective. L'aménagement possible de certains points de cette Ordonnance, courant 2011, ne devrait cependant pas remettre en cause ces directives.

Le comité français d'accréditation (Cofrac) est aujourd'hui l'unique organisme d'accréditation reconnu et la norme de référence désignée est la Norme européenne NF EN ISO 15189. L'examen de cette Norme montre une grande proximité avec l'actuel GBEA avec toutefois un niveau d'exigence plus élevé. La Norme NF EN ISO 15189 sépare les exigences en deux familles : les exigences relatives au management de la qualité (maîtrise des documents, revue de contrats, identification et maîtrise des non-conformités, actions correctives et préventives, audits internes...) et les exigences proprement techniques destinées à améliorer la prise en charge des échantillons du prélèvement (pré-analytique) jusqu'au compte-rendu du résultat (post-analytique).

Afin de s'inscrire dans une démarche d'accréditation, le service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Limoges a débuté un ensemble de remaniements et de mesures, en référence aux exigences de la Norme. Le secteur de parasitologie directe présente de nombreuses particularités à prendre en considération lors de l'application de certaines exigences techniques. Pour exemple, la qualité du résultat rendu en parasitologie est largement dépendante :

- De la qualité de l'ensemble de la phase pré-analytique incluant notamment la prescription médicale, les conditions de prélèvement ainsi que la pertinence des informations cliniques et épidémiologiques recueillies au lit du patient ; un effort tout particulier doit alors être fait pour perfectionner cette étape.
- De la qualité de la formation des techniciens assurant la recherche directe des éléments parasitaires par observation microscopique. Cette formation nécessite une expérience pratique importante alors que les parasitoses sont des pathologies rarement rencontrées en France métropolitaine. Il est donc difficile de mettre en place des mesures d'habilitation sur des périodes courtes (cas des internes ou du personnel remplaçant).

Concernant la majorité des parasitoses tropicales, la rareté des échantillons positifs disponibles rend peu évidente la validation sur site des techniques et la mise en place de contrôles internes de qualité. Pour ces techniques qui sont qualitatives pour la majorité d'entre elles, l'emploi de réactifs de fabrication « maison » est peu adapté à une démarche de qualité.

Ce travail de thèse, détaille l'ensemble des actions menées au sein du secteur de parasitologie directe, de novembre 2009 à mars 2011 ; elles ont toutes été réalisées dans le but répondre de la manière la plus cohérente possible aux exigences techniques de la Norme NF EN ISO 15189.

GENERALITES

1. LA NORME NF EN ISO 15189 ET LES GUIDES D'ACCREDITATION

1.1 LA NORME NF EN ISO 15189

Cette Norme internationale, fondée sur l'ISO/CEI 17025 et sur l'ISO 9001, fournit les exigences de compétence et de qualité propres aux laboratoires d'analyses de Biologie Médicale (1).

Elle est destinée à être utilisée par les laboratoires d'analyses de Biologie Médicale qui élaborent leur système de management de la qualité et évaluent leur propre compétence ainsi que par les organismes d'accréditation engagés dans des activités de confirmation ou de reconnaissance de la compétence des laboratoires d'analyses de Biologie Médicale (1).

Cette Norme est divisée en deux parties majeures :

- Une partie qui intègre les exigences relatives au management et souvent appelée « partie qualité ».
- Une partie « exigences techniques » correspondant au cœur du métier, c'est entre autre sur elle que se fonde l'aptitude technique du laboratoire.

Tableau 1 : Exigences de la Norme NF EN ISO 15189

<u>Exigences relatives au management</u>	<u>Exigences techniques</u>
1. Organisation et management	1. Personnel
2. Système de mangement de la qualité	2. Locaux et conditions environnementales
3. Maîtrise des documents	3. Matériel de laboratoire
4. Revue de contrats	4. Procédures pré analytiques
5. Analyses transmises à des laboratoires sous-traitants	5. Procédures analytiques
6. Services externes et approvisionnements	6. Assurer la qualité des procédures analytiques
7. Prestations de conseils	7. Procédures post analytiques
8. Traitement des réclamations	8. Compte rendu des résultats
9. Identification et maîtrise des non conformités	
10. Actions correctives	
11. Actions préventives	
12. Amélioration continue	
13. Enregistrements qualité et enregistrements techniques	
14. Audits internes	
15. Revue de direction	

1.2 LES GUIDES D'ACCREDITATION DU COFRAC

L'application des exigences de cette Norme peut poser des problèmes pratiques surtout pour un laboratoire qui débute une démarche de qualité et qui doit se familiariser avec un « nouveau » vocabulaire. Les documents Cofrac LAB LABM Ref 02 : *Exigences pour l'accréditation des laboratoires d'analyses de biologie médicale selon la Norme NF EN ISO 15189* (2) et SH Ref 02 : *Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale* (3) sont destinés à faciliter l'application de cette Norme et à en faire ressortir des exigences prioritaires de manière concrète. La satisfaction des exigences normatives et des dispositions législatives et réglementaires citées dans le document SH Ref 02 est la condition de l'accréditation ; leur non respect constitue un écart (3).

Le Cofrac met aussi à disposition des laboratoires un guide technique d'accréditation en Parasitologie-Mycologie: le document LAB GTA 12 (4) qui définit certaines recommandations spécifiques résultant de l'application de la Norme.

2. LES ASPECTS FONDAMENTAUX DE LA NORME

2.1 ORGANISATION ET MANAGEMENT

La phase de sensibilisation du personnel au sein du laboratoire doit être initiée dès le départ, de façon à ce que la démarche qualité soit comprise par l'ensemble des acteurs du système (biologistes, internes, techniciens, secrétaires...) et que leur adhésion permette de construire le système et de le faire vivre.

La définition des responsabilités est une priorité avec la nomination d'un responsable d'assurance qualité qui doit avoir des compétences par une formation aux normes ISO et à l'assurance qualité (1). Il doit être épaulé par l'ensemble du personnel ; des référents peuvent être désignés dans chaque secteur et des réunions de concertations doivent être instituées pour faire le point régulièrement sur les démarches mises en place et évaluer leur efficacité.

La politique et les objectifs du système de management de la qualité doivent être définis dans une déclaration de politique de la qualité sous l'autorité du directeur du laboratoire et figurer dans le manuel de qualité qui doit également décrire la structure de la documentation du système qualité.

2.2 LE PERSONNEL

Un système qualité ne peut fonctionner que s'il repose sur du personnel impliqué et motivé. La nécessité de formalisation de la qualification du personnel doit inciter à définir des modalités d'habilitation à un poste déterminé et à mettre en place un parcours de formation. Le laboratoire peut s'appuyer sur les formations externes (formation continue, congrès, fournisseurs) ou internes (1) (2) (3).

2.3 MAITRISE DOCUMENTAIRE

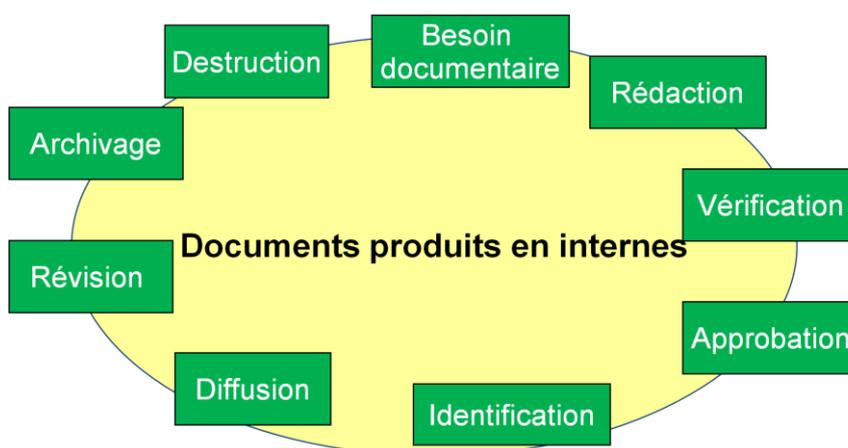
Un des principes fondamentaux d'une bonne organisation du laboratoire est la mise en place d'une architecture documentaire structurée. Cette notion de base de la qualité fait partie intégrante des recommandations de la Norme NF EN ISO 15189 ; **exigence 4.3.1.** :

« Le laboratoire doit définir, documenter et mettre à jour les procédures de maîtrise de tous les documents et informations (de sources internes et externes) qui constituent sa documentation de la qualité [...] »

Le laboratoire doit donc établir et tenir à jour des procédures visant à maîtriser tous les documents faisant partie de son système de management (produits en interne ou provenant de sources externes). Un exemplaire de chacun de ces documents est archivé pour toute consultation ultérieure et le directeur du laboratoire définit sa période de conservation.

Tout document est révisé et approuvé, par les personnes habilitées à le faire, avant sa diffusion au personnel de laboratoire (*Illustration 1*) ; seules les versions autorisées des documents appropriés doivent être disponibles sur les lieux où elles sont utilisées (1) (2).

Illustration 1 : Schéma du circuit classique d'un document produit en interne (d'après C. ROQUES)



Le Manuel Qualité (MQ) décrit le système de management de la qualité dans le laboratoire et la structure de la documentation de celui-ci. Il inclut ou fait référence aux procédures de soutien, incluant les procédures techniques. Il met en relief la structure de la documentation du système de management de la qualité (1). L'ensemble du personnel doit être formé à l'utilisation et à l'application du Manuel Qualité et de tous les documents référencés (1).

Il constitue le sommet de la pyramide du système de documentation (*Illustration 2*).

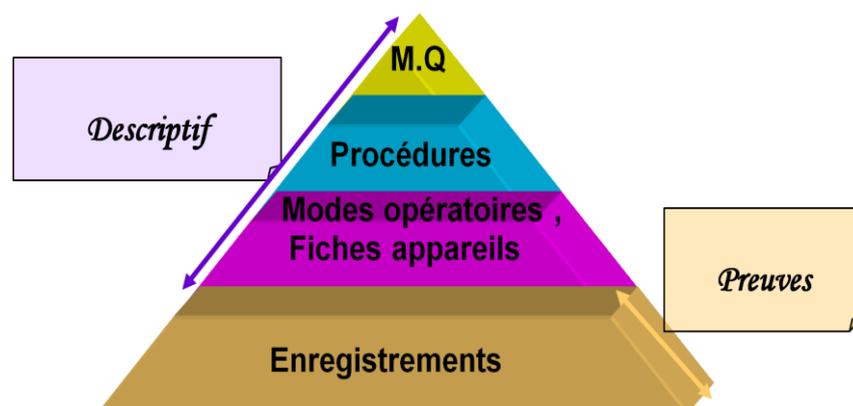
Les procédures (procédures de soutien, procédures techniques) décrivent, selon les situations rencontrées, l'ensemble des actions menées dans les domaines du pré-analytique, de l'analytique ou du post-analytique, elles répondent aux questions : comment faire ? quand ?

Toutes ces procédures doivent se référer aux différents modes opératoires utilisés, ceux-ci répondent aux questions : Où ? Selon quel procédé ?

Le Manuel Qualité, les procédures et les modes opératoires constituent des documents descriptifs du laboratoire.

A ces éléments descriptifs s'ajoutent un ensemble de documents : les enregistrements (prescriptions, fiches d'habilitation, diplômes, listes de travail, feuilles de paillasse...) qui constituent des preuves des actions menées (*base de la pyramide de l'Illustration 2*) et dont la durée de conservation d'au minimum 18 mois doit être déterminée par la direction du laboratoire (2).

Illustration 2 : Schéma de la pyramide de gestion documentaire (d'après C. ROQUES)



2.4 TRAÇABILITE

La traçabilité est un élément incontournable de la démarche et contribue à la création d'indicateurs. Il est essentiel de mettre en place des formulaires d'enregistrement, tant pour le domaine qualité (fiches d'anomalies) que pour le domaine technique (traçabilité des réactifs, fiches de stocks, prélèvements non conformes). Ainsi, la fiche d'anomalie permet de recenser le dysfonctionnement constaté, l'action corrective réalisée et les actions préventives envisagées. Celle-ci fait partie intégrante des outils à utiliser pour participer à l'amélioration continue de la qualité. Cet effort de traçabilité nécessite une discipline au quotidien de l'ensemble du personnel.

2.5 IDENTIFICATION ET MAITRISE DES NON-CONFORMITES

Le laboratoire doit mettre en place une politique et une procédure en cas de non-conformité quelconque de ses analyses par rapport à ses procédures et aux exigences convenues dans le cadre de son système de management de la qualité (1).

2.6 VALIDATION DES METHODES

Le respect des règles d'assurance qualité des laboratoires nécessite de procéder à la validation des techniques en préalable à leur utilisation et à le justifier (1) (5).

Il est essentiel de démontrer que la méthode (généralement un couple analyseur/réactif) fonctionne correctement dans les conditions opératoires du laboratoire et qu'elle donne des résultats sûrs pour le patient. Pour cela, une vérification initiale et une vérification continue sont requises (5).

Le document LAB GTA 04 (5) a pour but d'expliciter ce qui est entendu par les aspects de « validation de méthodes », il constitue un guide pratique pour les laboratoires d'analyse de Biologie Médicale.

Il en ressort que la vérification initiale d'une méthode est souvent la plus compliquée, elle s'effectue en plusieurs étapes :

- Le biologiste doit initialement déterminer les critères de performance (paramètres) à évaluer au moment de la vérification sur site en fonction du type de l'analyse (qualitative, semi-quantitative ou quantitative) ainsi que les limites d'acceptabilité de ces critères. Le choix de ces limites dépendra des recommandations de l'ANAES, de sociétés savantes et des conférences consensus (5).

- Une vérification bibliographique est également indispensable, elle consiste à réaliser l'étude des données du fournisseur ainsi qu'une synthèse des lectures bibliographiques concernant la méthode à valider. Une synthèse critique de ces données devra être abordée (5).
- Une étape de vérification sur site permettra ensuite d'évaluer, dans les conditions du laboratoire, les critères de performance initialement fixés. La méthodologie et la profondeur de cette vérification dépendront du type d'analyse et des possibilités matérielles du laboratoire (5).

Pour les analyses quantitatives, fournissant un résultat chiffré en relation directe avec une quantité ou une activité de l'analyte à mesurer, la vérification sur site devra couvrir de nombreux paramètres : fidélité, justesse, corrélation, sensibilité entre autres, en se basant sur le traitement statistique du suivi de contrôles de qualité internes et externes (5) (6).

Concernant les analyses qualitatives qui apportent une information sur la présence ou l'absence de l'analyte, le nombre souvent insuffisant d'échantillons positifs disponibles rend très compliquée l'évaluation de la méthode (5). La vérification sur site est alors plus réduite et devra explorer principalement la sensibilité diagnostique et la corrélation avec une ou plusieurs autres méthodes du laboratoire (*Tableau 2*) (5).

Le récent guide d'accréditation pour la validation des méthodes : SH GTA 04 (7) apporte quelques précisions supplémentaires en distinguant les méthodes « fournisseurs » (portée flexible standard A) dites adoptées, avec uniquement la nécessité d'une vérification réduite des performances sur site et les méthodes adaptées ou développées en internes (portée flexible étendue B) pour lesquelles la validation sur site de nombreux paramètres sera nécessaire.

Concernant les méthodes qualitatives, la spécificité et la sensibilité diagnostiques sont, d'après ce guide, les paramètres essentiels à maîtriser. Pour cela, la comparaison des résultats obtenus avec d'autres méthodes complémentaires ou des techniques de référence est conseillée (7).

Tableau 2 : Vérification initiale d'une technique qualitative, d'après LAB GTA 04 (5)

<i>Paramètres à vérifier et/ou à connaître</i>	Bibliographie	Vérification sur site
<i>Spécificité</i>	Oui	Non
<i>Sensibilité diagnostique</i>	Oui	Oui
<i>Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)</i>	Oui	Oui
<i>Stabilité</i>	Oui	Si besoin
<i>Robustesse</i>	Oui	Non
<i>Corrélation avec méthode de référence</i>	Oui	Non
<i>Corrélation avec méthode utilisée au laboratoire</i>	Oui (Si existe)	Oui (si possible)

Les résultats de la vérification doivent faire l'objet d'un document cohérent et clair, avec une acceptation formelle de la validité opérationnelle des techniques. Ce document doit comporter la présentation de la technique, la détermination des paramètres à vérifier, la détermination des objectifs à atteindre, la compilation et le traitement statistique des données obtenues et la décision quant à la validité opérationnelle de la technique (5) (7). Les formulaires SH FORM 43 et SH FORM 44 prévus par le Cofrac peuvent servir de modèle de présentation des résultats.

Pour chaque analyse, une vérification continue doit également être mise en place et s'appuie notamment sur l'utilisation, la gestion et le suivi de contrôles de qualité internes et externes (5) (7).

2.7 INCERTITUDE DE MESURE

L'étude de l'incertitude est un indicateur de la qualité d'un résultat d'analyse. L'incertitude de mesure est inhérente à tout processus de mesure. Son évaluation permet d'accorder un niveau de confiance que l'on peut avoir dans le résultat rendu. Pour ce faire, quel que soit le type d'analyse, le laboratoire devra identifier et lister tous les facteurs ayant potentiellement une influence sur le résultat puis montrer, après analyse du risque, comment sont maîtrisés les facteurs dont l'influence est jugée significative, de manière à minimiser les erreurs (1) (2) (8). Pour établir la liste exhaustive de ces facteurs, le laboratoire doit s'appuyer sur l'analyse de chaque étape de son processus (du pré- au post-analytique), par exemple à partir de la règle des « 5M » (main d'œuvre, milieu, matériel, matière, méthode) (8) (*Tableau 3*).

L'étude de la criticité permet d'évaluer l'influence des différents facteurs d'incertitude mis en évidence. Des mesures prioritaires pourront alors être instaurées pour minimiser le risque d'erreur. Pour les analyses quantitatives, les données de validation de méthode, en particulier celles relatives à la fidélité (répétabilité et reproductibilité) et à la justesse (biais), permettent, grâce et des formules mathématiques, une approche de l'incertitude associée au résultat de l'analyse (5).

Tableau 3 : Identification des facteurs d'incertitude grâce à la règle des « 5M »

<i>Pré-analytique</i>					Criticité
Main d'œuvre	<i>Préleveur</i>		<i>Préleveur externe</i>		1/3/9
Méthode	<i>Méthode de prélèvement utilisée</i>				1/3/9
Milieu	<i>Type de tube</i>	<i>Conditions du transport</i>	<i>Durée du transport</i>	<i>Conservation</i>	1/3/9
Matériel	<i>Matériel utilisé</i>				1/3/9
Matière	<i>Qualité de l'échantillon</i>				1/3/9
<i>Analytique</i>					Criticité
Main d'œuvre	<i>Technicien</i>	<i>Interne</i>		<i>Biologiste</i>	1/3/9
Méthode	<i>Mode opératoire</i>				1/3/9
Milieu	<i>Conditions ambiantes</i>	<i>Conditions de stockage des prélèvements</i>		<i>Conditions de stockage des réactifs</i>	1/3/9
Matériel	<i>Pipette</i>	<i>Automate</i>		<i>Informatique</i>	1/3/9
Matière	<i>Réactifs</i>	<i>Echantillons</i>			1/3/9
<i>Post-analytique</i>					Criticité
Main d'œuvre	<i>Opérateur réalisant les calculs</i>				1/3/9
Méthode	<i>Calculs, algorithmes, arrondis...</i>				1/3/9
Milieu					1/3/9
Matériel	<i>Système informatique de laboratoire</i>				1/3/9
Matière					1/3/9

2.8 PRESTATION DE CONSEILS

L'Ordonnance du 13 janvier 2010 a substantiellement modifié le rôle du biologiste médical dans la prestation de soin au patient. La « prestation de conseils » de la Norme devient une obligation à la phase pré-analytique comme à la phase post-analytique de l'examen. Le conseil en matière de choix des examens de Biologie Médicale est alors une obligation et des rencontres régulières avec le personnel médical sont recommandées (1). Le biologiste doit modifier, si nécessaire, la prescription sur le fondement des éléments cliniques

du patient et en fonction de la question posée par le prescripteur (3). De plus, le compte-rendu d'examens doit être validé avec interprétation contextuelle et une communication appropriée au prescripteur et au patient dans un délai compatible avec l'état de l'art.

3. DEROULEMENT DE LA DEMARCHE D'ACCREDITATION

3.1 ENTREE DANS LA DEMARCHE D'ACCREDITATION

Pour justifier son entrée effective dans une démarche d'accréditation, le laboratoire de Biologie Médicale peut avoir recours, selon son choix, à deux options (A ou B) définies par l'arrêté du 14 décembre 2010 (9).

3.1.1 Option A

En choisissant cette option, le laboratoire doit adresser au Cofrac, au plus tard le 31 octobre 2012, une demande d'accréditation partielle sur un ou plusieurs examens, de la phase pré-analytique à la phase post-analytique. Cette demande est accompagnée d'un dossier comprenant le formulaire de renseignements et le questionnaire d'autoévaluation (sur la conformité du laboratoire vis-à-vis de la Norme). Ces documents sont disponibles sur le site internet du Cofrac (10).

Après réception du dossier complet, le Cofrac adresse au laboratoire un document, à lui retourner signé, décrivant la portée de demande d'accréditation. Dans les mois qui suivent, le Cofrac effectue une visite d'évaluation lui permettant ou non de délivrer une accréditation partielle au laboratoire.

Une fois titulaire de cette accréditation partielle et au plus tard le 31 mai 2013, le laboratoire fait sa demande d'entrée effective dans la démarche d'accréditation en adressant au Cofrac un dossier comportant obligatoirement:

- 3 vérifications de méthodes portant sur des méthodes qualitatives et quantitatives.
- La preuve de l'abonnement à des programmes d'évaluation externe de la qualité.
- Une description de l'activité du laboratoire qui n'entre pas dans sa portée d'accréditation partielle.
- Un calendrier prévisionnel conduisant à une accréditation sur la totalité de son activité avant le 1^{er} Novembre 2016.

La notification au laboratoire (par le Cofrac) de la décision constatant l'entrée effective dans la démarche d'accréditation en constitue la preuve.

3.1.2 Option B

Cette option permet au laboratoire d'éviter la demande au Cofrac d'une accréditation partielle. La demande de vérification d'entrée dans la démarche se fera donc au plus tard le 31 mai 2013, mais le dossier devra comporter en plus une attestation en cours de validité émanant d'un organisme agréé, reconnu par la Haute Autorité de Santé pour l'évaluation des pratiques en Biologie Médicale, avant le 1^{er} janvier 2010 (9).

3.2 RELATION AVEC LES AUDITEURS

Après l'acceptation du dossier, le contact téléphonique et le mail sont les moyens de correspondre avec le responsable Cofrac des dossiers (11). Le nombre d'auditeurs, leur nom, le mois potentiel et le nombre de jours de la visite sont proposés (11).

3.2.1 Avant l'audit

Tous les auditeurs retenus (un auditeur qualitatif et un ou plusieurs auditeurs techniques) entrent en relation avec le laboratoire pour obtenir des documents supplémentaires et décider du planning lors de la visite. Celui-ci sera connu du laboratoire au minimum 15 jours avant la visite (11).

3.2.2 Déroulement de l'audit

Après une réunion d'ouverture, l'auditeur qualitatif qui est en général le rapporteur de l'audit s'intéresse essentiellement à la partie « management » de la Norme, il est en relation avec le référent qualité, le chef de service ou le directeur de laboratoire et le cadre de santé (11).

L'auditeur technique vérifie quant à lui le respect des exigences de la partie technique de la Norme en contrôlant les phases pré-analytique, analytique et post-analytique.

Une réunion de clôture permet aux auditeurs de faire le bilan de la visite et de notifier les écarts critiques ou non critiques. Un écart critique correspond à un dysfonctionnement qui peut avoir un risque ou une conséquence sur la qualité du système par rapport à la Norme et devra être corrigé avant la prochaine visite. Trop d'écarts critiques empêchent l'accréditation d'un laboratoire. A la fin de cette réunion, les fiches d'écart sont signées par les deux parties (11).

3.2.3 Après la visite d'audit

Le laboratoire dispose de 15 jours pour proposer un plan d'amélioration aux auditeurs qui devront à leur tour donner ou non leur accord sur les actions proposées.

Un rapport confidentiel de la visite est envoyé par les auditeurs au Cofrac et au laboratoire ; il passera en commission d'expert et la réponse sera signifiée au laboratoire 4 à 5 mois après la visite des auditeurs (11).

3.3 OBTENTION DE L'ACCREDITATION

L'accréditation est délivrée par notification écrite du responsable de la section des laboratoires ; un numéro d'accréditation est lié au logo Cofrac et à la mise en ligne de l'accréditation du laboratoire sur le site du Cofrac. L'utilisation du logo est soumise à des règles strictes (11).

Le laboratoire accrédité sera soumis à une surveillance régulière avec une première visite 1 an après puis tous les 15 mois, l'accréditation étant valable 4 ans (11).

APPLICATION DE LA NORME A LA
PARASITOLOGIE DIRECTE DU CHU DE LIMOGES

1. UN TRAVAIL QUI S'INSCRIT DANS UN PROJET HOSPITALIER

La Norme NF EN ISO 15189 constitue le référentiel d'accréditation. Nous avons donc choisi d'identifier, à partir de la lecture de ce document, toutes les exigences techniques pour lesquelles le secteur de parasitologie directe du CHU de Limoges pouvait présenter des écarts, en cherchant à cibler les éléments prioritaires.

Ce travail, bien que réalisé au sein d'un unique secteur, ne peut être productif que s'il s'inscrit dans une dynamique de groupe et que les procédures mises en place sont connues et appliquées par l'ensemble du personnel du service. A l'échelle du centre hospitalier universitaire, la notion de travail d'équipe est également essentielle puisque l'ensemble des laboratoires actuels de Biochimie, Hématologie, Immunologie, Bactériologie-Virologie-Hygiène, Parasitologie-Mycologie et de Pharmacologie-Toxicologie seront considérés dans l'avenir comme un unique et même laboratoire devant répondre aux attentes du Cofrac. Une structure qualité a donc été mise en place pour fédérer les initiatives et donner un sens à l'ensemble des démarches avec pour objectif d'atteindre un niveau « qualité » homogène sans négliger les pratiques spécifiques de chaque site. La mise en place d'un système informatique de gestion de la qualité est prévue pour septembre 2011 et chacun des sites devra disposer de procédures et modes opératoires actualisés et approuvés pour que ce système de gestion documentaire soit exploitable. La création d'un dossier d'accréditation du Pôle est fixée à octobre 2012 ; l'objectif étant que le processus d'accréditation soit initié avant 2013, année du déménagement des laboratoires dans un nouveau bâtiment du Pôle Biologie-Hygiène.

2. LES SPECIFICITES DE LA PARASITOLOGIE DIRECTE FACE AUX EXIGENCES DE LA NORME

La particularité de la discipline de parasitologie nous a amené à réfléchir longuement aux actions à mettre en œuvre pour répondre de la manière la plus cohérente possible aux exigences de la Norme. En effet, les méthodes de référence font souvent appel à des techniques manuelles d'enrichissement et/ou de coloration pour lesquelles l'emploi de réactifs « maison » parfois toxiques est nécessaire. Les analyses réalisées sont de type qualitatif puisqu'elles s'appuient sur l'identification morphologique de parasites ; on comprend alors l'importance pour le personnel de bénéficier de procédures adaptées d'habilitation et de formation continue. La faible incidence de certaines parasitoses en France métropolitaine rend difficile la mise en

place de contrôles de qualité ainsi que la validation des méthodes à partir d'échantillons positifs.

3. LES OBJECTIFS PRIORITAIRES

3.1 ANALYSE DU RISQUE D'ERREUR EN PARASITOLOGIE POUR CIBLER LES ACTIONS PRIORITAIRES

Pour établir un plan d'action global des mesures à mettre en place au sein du secteur, nous avons commencé par faire le bilan général de l'influence que peuvent avoir les différents facteurs d'incertitude sur le résultat. Cette analyse du risque d'erreur, appliquée à la parasitologie directe, nous a permis de cibler des actions prioritaires à mettre en place.

En affectant, d'après la règle des 5M, un score de 1, 3 ou 9 à chaque étape de l'analyse (1 = faible niveau d'influence, 3 = niveau intermédiaire et 9 = niveau élevé d'influence), nous avons estimé l'influence sur le résultat (criticité) que peuvent avoir les différentes phases : pré-analytique, analytique et post-analytique. L'influence maximale pour chaque phase est donc de 45 (9 fois 5). Il est bien évident que le résultat de cette évaluation est variable en fonction du parasite recherché et de la méthode utilisée, elle devra donc être réalisée pour chaque analyse. Néanmoins, l'étude générale résumée dans le *Tableau 4* constitue une première approche utile. On s'aperçoit que les phases pré-analytique (27/45) et analytique (29/45) sont décisives, la main d'œuvre et la méthode utilisée devant être maîtrisées. Nous avons donc décidé de cibler nos actions prioritaires autour de la maîtrise de la formation du personnel préleveur et technicien (habilitation, formation continue) et de la maîtrise des techniques utilisées au laboratoire (révision des modes opératoires, validation des méthodes).

Tableau 4 : Influence des facteurs d'incertitude en parasitologie directe

<i>Pré-analytique</i>					<i>Criticité</i>	
Main d'œuvre	<i>Prescripteur Préleveur</i>	<i>Préleveur externe</i>			3	27
Méthode	<i>Méthode de prélèvement utilisée</i>				3	
Milieu	<i>Type de tube</i>	<i>Conditions du transport</i>	<i>Durée du transport</i>	<i>Conservation</i>	9	
Matériel	<i>Matériel utilisé</i>				3	
Matière	<i>Qualité de l'échantillon</i>				9	
<i>Analytique</i>					<i>Criticité</i>	
Main d'œuvre	<i>Technicien</i>	<i>Interne</i>	<i>Biologiste</i>		9	29
Méthode	<i>Mode opératoire</i>				9	
Milieu	<i>Conditions ambiantes</i>	<i>Conditions de stockage des prélèvements</i>	<i>Conditions de stockage des réactifs</i>		1	
Matériel	<i>Pipette</i>	<i>Automate</i>	<i>Informatique</i>		1	
Matière	<i>Réactifs</i>	<i>Echantillons</i>			9	
<i>Post-analytique</i>					<i>Criticité</i>	
Main d'œuvre	<i>Opérateur réalisant les calculs</i>				9	13
Méthode	<i>Calculs, algorithmes, arrondis...</i>				1	
Milieu					1	
Matériel	<i>Système informatique de laboratoire</i>				1	
Matière					1	

3.2 L'INTERET DU PATIENT : UNE PRIORITE DE NOTRE DEMARCHE

3.2.1 Le paludisme : l'urgence diagnostique vitale

L'urgence diagnostique et la gravité potentielle d'un accès palustre imposent une prise en charge optimale de cette parasitose. En s'assurant que le prélèvement sanguin est traité à n'importe quelle heure de la journée, dans les bonnes conditions et dans le délai le plus bref possible, que les renseignements cliniques essentiels à l'approche diagnostique sont fournis, que les méthodes de recherche du paludisme sont performantes (vérification sur site) et réalisées par un personnel compétent et que le résultat est rendu au médecin prescripteur le plus rapidement possible, le laboratoire augmente alors les chances de survie du patient en cas d'accès palustre. Cette réflexion justifie la mise en place en priorité de mesures permettant d'assurer la qualité du résultat.

3.2.2 La gale : une nuisance constituant un problème de Santé Publique

La gale représente un problème de Santé Publique, puisque cette parasitose très contagieuse est à l'origine d'épidémies familiales ou de collectivité (maisons de retraites...). Les 146 recherches de gale effectuées à Limoges en 2010 montrent que cette ectoparasitose est d'actualité. Le diagnostic est le plus souvent clinique, orienté par un prurit très intense, mais la mise en évidence de l'acarien constitue le seul diagnostic de certitude. Il existe néanmoins de fréquents faux négatifs, notamment dans les formes pauci-parasitaires. En assurant un prélèvement de qualité, le laboratoire permet d'authentifier des épidémies, de traiter et donc de soulager les patients.

La mise en place de mesures permettant de maîtriser au maximum la phase pré-analytique constitue un des points fondamentaux de ce travail.

3.2.3 La recherche de parasites dans les selles : principale activité du secteur

Avec environ 1000 recherches annuelles, la recherche de parasites dans les selles est l'analyse qui représente la principale activité du secteur. Elle constitue un élément clé de la démarche diagnostique et permet par un prélèvement simple et non invasif de mettre en évidence de nombreux parasites intestinaux, ce qui implique une parfaite maîtrise de cet examen.

L'étape pré-analytique est essentielle pour de nombreuses raisons :

- Les résultats ne sont interprétables que si la recherche est prescrite à plusieurs reprises et en respectant certaines conditions.

- Certains parasites comme les cryptosporidies sont recherchés et identifiés grâce à des techniques spécifiques à réaliser en fonction des renseignements cliniques et/ou de l'aspect des selles.
- En cas de suspicion clinique d'amoebiose intestinale, l'acheminement des selles doit être très rapide en raison de la fragilité des formes végétatives du protozoaire.

La qualité de la phase analytique est conditionnée par deux éléments majeurs : la compétence du personnel et les performances des techniques de concentration et de coloration utilisées. L'évaluation sur site de nos méthodes de recherche de parasites dans les selles est donc également abordée au cours de ce travail.

Pour permettre au clinicien d'interpréter correctement le résultat rendu et de comprendre les limites de celui-ci, nous avons jugé utile de mettre en place un système de commentaires pré-établis, adaptés à chaque situation.

3.2.4 Les parasites pathogènes rares en France

La faible incidence de certaines parasitoses tropicales comme les schistosomoses ou les filarioses ne justifie en aucun cas une démarche diagnostique moins solide.

Le rôle du laboratoire est, au contraire, primordial car leur diagnostic souvent difficile permet au clinicien de débiter un traitement curatif adapté. Le diagnostic de phase dans la trypanosomose humaine africaine est d'une importance pronostique et thérapeutique capitale.

Pour ces parasitoses, nous nous sommes attachés à améliorer au maximum la prise en charge pré-analytique et la qualité des procédures appliquées. La vérification sur site des performances des méthodes étant peu applicable, leur validation s'appuie essentiellement sur une vérification bibliographique.

3.3 LA MAITRISE DE LA DOCUMENTATION

La maîtrise de la documentation étant une des exigences majeures de la Norme et une des priorités de la cellule qualité du Pôle Biologie-Hygiène, un effort tout particulier a été fait au cours de ce travail pour établir une architecture documentaire structurée. L'utilisation de méthodes de coloration et de concentration des parasites souvent historiques a nécessité une revue de littérature importante et une mise à jour des modes opératoires.

4. LES MOYENS UTILISES

4.1 LES DOCUMENTS COFRAC

Pour parvenir à satisfaire au maximum aux exigences de la Norme ISO EN 15189, nous avons dans un premier temps cherché à identifier les exigences techniques pour lesquelles le secteur de parasitologie directe présentait des écarts, en cherchant à cibler les éléments prioritaires. Les documents LAB LABM Ref 02 et SH Ref 02 destinés à faciliter l'application de la Norme et son utilisation par les évaluateurs (2) nous ont été d'une aide précieuse. D'autres documents Cofrac comme le guide technique d'accréditation en parasitologie et mycologie médicale (4) et le GTA 04 (5) nous ont ensuite permis de mettre en place des mesures efficaces en tenant compte des spécificités de la discipline.

4.2 UN MODELE D'ACCREDITATION

Le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Rangueil de Toulouse est accrédité selon les Normes NF EN ISO 17025 en 2006 puis 15189 en 2010. Il constitue un modèle d'accréditation prouvant ainsi qu'il est possible, en quelques années, de parvenir à instaurer une véritable politique de qualité au sein du laboratoire, même lorsque la discipline fait appel à des techniques manuelles souvent anciennes.

De nombreux échanges avec le Docteur Christine Roques, auditeur Cofrac et responsable qualité de ce laboratoire, nous ont permis d'avoir un éclairage sur de nombreux points de la Norme et de progresser dans les différentes étapes de prise en charge des échantillons.

Grâce à des avis éclairés et le contrôle de certains de nos échantillons par une PCR à Toulouse, nous avons pu procéder à la validation de nos méthodes de recherche du paludisme par une vérification sur site approfondie.

4.3 LES OUVRAGES DE REFERENCE

Afin d'établir une architecture documentaire structurée et pratique, de nombreuses concertations avec Annabelle Audevard, technicienne référente qualité et les biologistes du laboratoire ont été nécessaires.

Le Guide technique d'accréditation en parasitologie (4) recommande plusieurs ouvrages et sites de référence pour l'élaboration des modes opératoires et des procédures analytiques.

Nous avons sélectionné les références suivantes :

- Anofel, Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales, Elsevier Masson, 2007.
- Y.J. Golvan et P. Ambroise-Thomas, *Les nouvelles techniques en parasitologie et immuno-parasitologie*, Flammarion médecine-sciences, 1988.
- M. Gentilini, *Diagnostic en Parasitologie*, Masson, 1993.
- Cahiers BIOFORMA de Formation en Biologie Médicale N°11 : *Amibes et flagellés intestinaux*.
- Cahiers BIOFORMA de Formation en Biologie Médicale N°23 : *Parasites sanguins*.

En fonction des parasitoses recherchées et des techniques utilisées, nous avons élargi nos références bibliographiques à des publications récentes et aux recommandations spécifiques.

La qualité du résultat en parasitologie directe dépend fortement de l'aptitude du personnel à reconnaître les éléments parasitaires au microscope. Nous avons alors décidé d'accompagner nos modes opératoires de photographies permettant d'illustrer les principaux éléments parasitaires recherchés en fonction de la méthode employée. Ces photographies sur lames ont été réalisées, pour la majorité d'entre elles, à partir d'échantillons positifs du laboratoire.

Dans un but synthétique la partie suivante développera, en référence à la Norme et autres documents Cofrac, les actions menées et les mesures mises en place au sein du secteur.

RESULTATS

1. PRESTATIONS DE CONSEILS

1.1 LES EXIGENCES DE LA NORME

Le chapitre 4.7 de la Norme porte sur la manière dont le laboratoire de Biologie Médicale est amené à conseiller les prescripteurs :

« Les professionnels qualifiés pour cette tâche doivent conseiller en matière de choix des analyses et d'utilisation des prestations du laboratoire, y compris la fréquence de prescription et le type d'échantillon requis. Le cas échéant, l'interprétation des résultats des analyses doit être fournie. »

De plus, l'Ordonnance du 13 janvier 2010 a substantiellement modifié le rôle du biologiste médical dans la prestation de soins au patient. La « prestation de conseil » de la Norme devient une obligation à la phase pré-analytique comme à la phase post-analytique de l'examen (3).

Cette exigence de prestation de conseil est reformulée dans le chapitre 5.4.3. de la Norme, relatif aux informations que le laboratoire doit mettre à disposition du prescripteur dans son manuel de prélèvement :

« Le manuel de prélèvement des échantillons primaires doit comprendre les éléments suivants : ...des informations données aux utilisateurs des prestations du laboratoire sur les indications médicales et le choix approprié des méthodes disponibles ... »

1.2 DES AIDES A LA PRESCRIPTION POUR REpondre A CETTE EXIGENCE

La cellule qualité du CHU de Limoges a mis en place un catalogue des analyses directement consultable par tous les services reliés au réseau de l'hôpital sur Hermès. Des mises au point sont régulièrement réalisées afin que ce catalogue soit en mesure de répondre aux attentes de la Norme, un écart a notamment été mis en évidence concernant cette dernière exigence.

Pour orienter le choix du prescripteur de la manière la plus pratique possible nous avons donc décidé d'élaborer des fiches d'aide à la prescription destinées à être mises à disposition du prescripteur sur Hermès et à servir de base documentaire au personnel du laboratoire (interne et biologiste) lors d'un conseil formulé aux cliniciens.

D'après le document LAB GTA 12 (4), les procédures analytiques adoptées peuvent être celles préconisées par le collège des enseignants et des praticiens hospitaliers titulaires de

Parasitologie et Mycologie médicale, c'est donc en référence à la 7^e édition du livre ANOFEL (12) que nous avons créé ces logigrammes décisionnels.

Des aides à la prescription ont été mises au point pour orienter le prescripteur devant une situation fréquente en parasitologie : l'hyperéosinophilie sanguine.

Pour certaines parasitoses spécifiques, souvent rares et nécessitant une prescription adaptée, nous avons également mis au point des fiches d'aide à la prescription.

1.2.1 L'hyperéosinophilie sanguine : un motif fréquent de recherche parasitaire

En pratique clinique, un des principaux éléments devant faire suspecter une parasitose est sans nul doute l'hyperéosinophilie sanguine, surtout lorsqu'aucune autre étiologie évidente ne lui est imputée. Ce point d'appel biologique peut être induit par tous les helminthes, avec une intensité pouvant varier en fonction du parasite en cause, de la charge parasitaire, de la phase du cycle, et de l'individu. Plus rarement sont en cause d'autres parasitoses comme les myiases ou la gale (13).

Bien qu'efficace par son action cytolytique antihelminthique, l'hyperéosinophilie a, en contre partie, un rôle néfaste sur les propres cellules de l'organisme (cœur, peau, intestin, rate) ce qui incite à ne pas laisser persister longtemps une hyperéosinophilie (13). Faire le diagnostic étiologique du (ou des) parasite(s) en cause est essentiel pour plusieurs raisons.

La mise en route d'un traitement adapté au(x) parasite(s) permet d'avoir une efficacité ciblée ; contrairement à certaines idées reçues, les helminthes ne répondent pas tous de la même façon à un traitement d'épreuve par le flubendazole et certaines molécules sont spécifiquement recommandées dans certaines parasitoses (triclabendazole dans la distomatose, praziquantel dans la schistosomose et la taeniose, ivermectine dans la loase et l'anguillulose) (12).

De plus, débiter un traitement antiparasitaire sans connaître l'organisme en cause peut s'avérer dangereux pour le patient, c'est le cas dans la loase au cours de laquelle la lyse parasitaire importante induite par le traitement peut être à l'origine de choc anaphylactique lors de microfilarémies élevées (12).

Habituellement, l'éosinophilie est plus élevée pour les parasites effectuant un cycle complexe dans l'organisme (toxocarose, trichine, douve...) que chez ceux restant dans le tube

digestif. Cependant, dans ce dernier cas, il peut y avoir des hyperéosinophilies élevées mais fugaces (*Taenia*). Dans certains cas, comme l'anguillulose, où il existe un cycle d'auto-infestation, l'éosinophilie est fluctuante, une remontée correspondant à un nouveau cycle interne de migration tissulaire (13). Dans les parasitoses anciennes, l'éosinophilie peut revenir à un taux subnormal, comme par exemple au cours des schistosomoses où le parasite se recouvre de protéines de l'hôte et se « camoufle » sur le plan immunologique (13).

On comprend alors que l'importance de l'élévation du taux d'éosinophiles à un moment donné peut orienter le prescripteur mais ne peut en aucun cas constituer un argument diagnostique décisif.

L'enquête étiologique commence par un interrogatoire sur les pays visités par le patient, même remontant à plusieurs années, certains parasites comme les anguillules persistant dans l'organisme plusieurs dizaines d'années, et sur son mode vie (bain en eau douce, consommation de crudités, poisson ou viande peu cuite...). En effet si certains parasites sont cosmopolites, d'autres sont plus fréquents dans certaines régions, qu'il s'agisse de l'Europe (échinococcose alvéolaire) ou des zones tropicales d'Afrique (schistosomose urinaire, loase...), d'Amérique (cysticercose) ou d'Asie (distomatoses asiatiques) (13).

Les étiologies à rechercher en cas d'hyperéosinophilie ne sont donc pas les mêmes chez un patient n'ayant jamais quitté la France métropolitaine que chez un patient ayant séjourné ou vécu en zone intertropicale. De nombreuses analyses sont disponibles (recherche directe dans les selles, dans les urines et dans le sang, sérologies), il paraît alors indispensable que le prescripteur puisse adopter au moment de la prescription, une démarche logique, reproductible et orientée tout en respectant certaines conditions d'application.

C'est dans cette optique que nous avons établi des fiches d'aide à la prescription intitulées :

- *Hyperéosinophilie chez un patient n'ayant jamais quitté la France métropolitaine (Illustration 3).*
- *Hyperéosinophilie chez un patient ayant séjourné en zone tropicale (Illustration 4).*

Illustration 3 : Aide à la prescription devant une hyperéosinophilie chez un autochtone

 <p>Parasitologie - Mycologie</p>	AIDE A LA PRESCRIPTION DEVANT UNE HYPEREOSINOPHILIE CHEZ UN PATIENT N'AYANT JAMAIS QUITTE LA FRANCE METROPOLITAINE	PARA F5 P RES 001 A
		Date d'application: 01/02/2011

Cette démarche diagnostique ne concerne que les étiologies parasitaires d'hyperéosinophilie

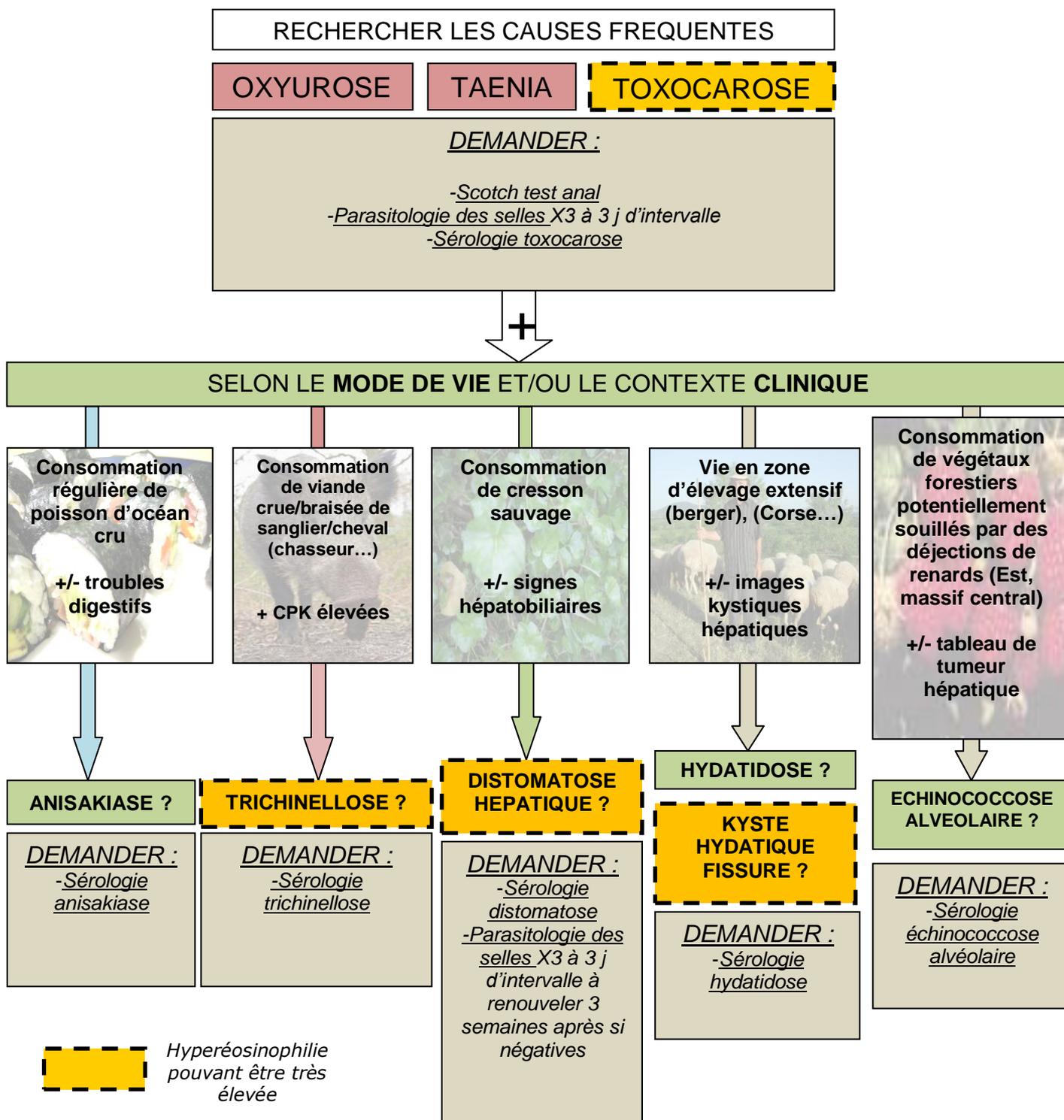


Illustration 4 : Aide à la prescription devant une hyperéosinophilie après séjour à l'étranger

 <p>Parasitologie - Mycologie</p>	<p>AIDE A LA PRESCRIPTION : HYPEREOSINOPHILIE CHEZ UN PATIENT APRES SEJOUR EN ZONE TROPICALE (hors myiases et causes exceptionnelles)</p>	<p>PARA F6 P RES 001 A</p>
		<p>Date d'application: 01/02/2011</p>



**Anguillulose, Ascaridiose,
Ankylostomosose ou autres
helminthoses intestinales
(oxyure, tenia...)
Distomatoses hépatiques
Cysticercose, Toxocarose, Hydatidose,
Trichinose, Anisakiase**

DEMANDER :
-Parasitologie des selles X3 à 3 j d'intervalle
(acheminer rapidement au laboratoire) à renouveler
3 semaines après si négatives

-Scotch test anal

-Sérologies (en fonction du contexte) : distomatose,
cysticercose, toxocarose, hydatidose, trichinose,
anisakiase

Si baignade en
eau douce

+/- hématurie

Brésil+++ Si baignade ou marche (Asie) en
eau douce

Schistosomose urinaire

DEMANDER:
-Parasitologie des urines après
effort physique renouveler 3
semaines après si négative

-Sérologie : schistosomose
-Biopsie vésicale si bilan
négatif et forte suspicion

Schistosomose intestinale

DEMANDER:
-Parasitologie des selles X3 à 3 j d'intervalle,
à renouveler 3 semaines après si négative

-Sérologie: schistosomose

-Biopsie de muqueuse rectale si bilan négatif
et forte suspicion

CHEZ UN RESIDENT OU APRES UN SEJOUR PROLONGE EN ZONE RURALE, EVOQUER EN PLUS

Afrique intertropicale

Nord de l'Amérique du
Sud

Golfe de Guinée

Loase

DEMANDER :
-Recherche de
microfilarémie à
12h

-Sérologie :
filariose

Onchocercose

DEMANDER :
-Sérologie : filariose
-biopsie cutanée exsangue

Filariose lymphatique

DEMANDER :
-Recherche de microfilarémie à 23h et/ou 12h
-Sérologie : filariose
-Recherche d'antigène circulant filarien (envoi à Toulouse)

1.2.2 Parasitoses tropicales nécessitant une prestation de conseils

Bien que très fréquente lors d'une parasitose, l'hyperéosinophilie sanguine n'est pas systématique, en effet la majorité des protozoaires n'occasionne pas ce point d'appel biologique et d'autres signes, cliniques en particulier, peuvent, en fonction du contexte, nécessiter une prescription d'examens de parasitologie directe.

La symptomatologie observée en parasitologie est rarement spécifique, une recherche de parasites ne doit donc pas être demandée devant un symptôme isolé, sans connaissance du contexte épidémiologique (notion de séjour à l'étranger, lieu, durée et conditions du séjour) et clinico-biologique (autres signes associés). Le dialogue entre le prescripteur et le biologiste prend alors toute son importance.

Des fiches d'aide à la prescription spécifiques aux parasitoses tropicales majeures ont donc été établies et sont présentées dans les chapitres correspondants :

« Aide à la prescription : recherche de paludisme »

« Aide à la prescription : recherche d'une leishmaniose viscérale »

« Aide à la prescription : recherche de trypanosomose humaine africaine »

« Aide à la prescription : recherche de filariose »

« Aide à la prescription : en cas de suspicion de parasitose digestive »

« Aide à la prescription : recherche de schistosomose urinaire »

1.3 AVIS ET INTERPRETATIONS

Les avis et interprétations sont une partie intégrante du rapport d'analyse. Ils ne s'imposent que s'ils apportent un éclairage particulier au client sur la signification et l'exploitation des résultats communiqués sur le compte-rendu d'analyse (2).

La Norme précise au paragraphe 5.8.3. j et k : « (...) le compte-rendu doit comprendre, sans y être limité, les éléments suivants : (...) l'interprétation des résultats, le cas échéant ; tout autre commentaire (...) »

Nous avons donc programmé, dans le logiciel GLIMS, des commentaires adaptés aux différentes situations rencontrées en pratique lors d'une recherche de parasites dans les selles et

permettant au clinicien d'exploiter le résultat rendu. Ils sont présentés dans le *Tableau 14* du chapitre post-analytique 3.2.6.3.

2. EXIGENCES LIEES AU PERSONNEL

2.1 PRE-ANALYTIQUE

Concernant l'activité de prélèvement, le document LAB LABM REF 02 distingue 2 situations (2) :

- Le prélèvement est réalisé par du personnel appartenant au laboratoire, l'ensemble des exigences du Paragraphe 5.4 de la Norme est applicable : les personnes en charge du prélèvement seront donc évaluées.
- Le prélèvement est réalisé par du personnel n'appartenant pas au laboratoire qui ne sera pas évalué mais qui devra avoir pris connaissance du manuel de prélèvement.

2.1.1 Personnel préleveur du laboratoire : habilitation des internes

Les prélèvements de parasitologie-mycologie réalisés au laboratoire sont la recherche de sarcoptes, le test à la cellophane adhésive, plus couramment dénommé : « Scotch[®]-test anal », la recherche de *Demodex* et les prélèvements mycologiques de la peau et des phanères. Cette activité est réalisée par les internes du service. Il s'agit de prélèvements nécessitant une compétence technique approfondie et pour lesquels la qualité de l'interrogatoire est très importante : certains renseignements sont susceptibles d'orienter la recherche et de faciliter l'interprétation (description clinique des lésions, origine géographique du patient, voyages, autres personnes atteintes dans l'entourage...).

Il est donc indispensable que les internes (en charge des prélèvements pour une période de 6 mois) reçoivent une formation pratique et théorique adaptée à chaque type de prélèvement et que cette formation puisse être documentée et prouvée.

Nous nous sommes inspirés de l'exemple du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Toulouse-Rangueil pour mettre en place des fiches d'habilitation propres à chaque interne et permettant de certifier la compétence du préleveur pour chaque type de geste effectué (*Illustration 5*).

La formation initiale est assurée à Limoges par un biologiste du service ou un interne déjà habilité. La durée de cette formation ne peut être définie au préalable puisque le nombre et le

type de prélèvements à réaliser au laboratoire sont très variables. L'acquisition des compétences nécessaires demande une formation théorique basée sur la maîtrise des modes opératoires (connaissance du matériel, informations à recueillir, gestes techniques...) et une expérience pratique : 1 prélèvement sera réalisé avec un formateur pour chaque type de prélèvement. Cette fiche sera remplie (date et signature) par le biologiste ou l'interne habilité en charge de la formation. La cellule qualité du Pôle a également prévu la mise en place de documents d'habilitation; notre fiche d'habilitation sera donc amenée à évoluer afin d'être intégrée dans la procédure générale du Pôle.

 Parasitologie - Mycologie	HABILITATION DES INTERNES aux prélèvements réalisés au laboratoire	
		Date d'application:

Nom de l'interne à habilitier :

Date de prise de fonction :

Cette fiche décrit les **compétences nécessaires** pour qu'un interne en biologie soit habilité à réaliser seul les prélèvements réalisés au laboratoire de parasitologie-mycologie.

Elle sera remplie pour chaque nouvel interne présent dans le service au fur et à mesure de l'acquisition des compétences. En fin de formation, elle fera office de certificat de qualification de l'interne.

I.FORMATION

Elle est assurée sous la responsabilité d'un biologiste du service ou d'un interne habilité.

Durée minimum de formation : 1 prélèvement effectué avec le formateur pour chaque type de prélèvement (gale, demodex, recherche de teigne...) après le début de la prise de fonction. Cette fiche sera remplie par un biologiste ou un interne habilité.

II.COMPETENCES EXIGEES

- Connaissance des modes opératoires :

PARA MO1 P PREA 004 A (gale)

Oui Non Réalisé validé par :

PARA MO2 P PREA 004 A (Scotch[®]-test anal)

Oui Non Réalisé validé par :

PARA MO3 P PREA 004 A (Demodex)

Oui Non Réalisé validé par :

PARA MO4 P PREA 004 A (mycose de la peau)

Oui Non Réalisé validé par :

PARA MO5 P PREA 004 A (prélèvement *Malassezia*)

Oui Non Réalisé validé par :

 Parasitologie - Mycologie	HABILITATION DES INTERNES aux prélèvements réalisés au laboratoire	
		Date d'application:

PARA MO6 P PREA 004 A (onychomycose)

Oui Non Réalisé validé par:

PARA MO7 P PREA 004 A (teignes)

Oui Non Réalisé validé par :

- Manipulations techniques pour prélèvement cutané :

- Interrogation pertinente du patient

Contact avec animal, origine géographique ou voyage à l'étranger, traitement antifongique et délai, lésions identiques dans l'entourage (ces informations sont systématiquement recueillies dans la fiche d'information qui sera jointe avec le prélèvement)

Oui Non validé par :

-Préparation correcte du matériel de prélèvement en fonction des demandes

Oui Non validé par :

-Port des gants

Oui Non validé par :

-Prélèvement de gale (respect des règles d'hygiène, questions au patient...)

Oui Non validé par :

 Parasitologie - Mycologie	HABILITATION DES INTERNES aux prélèvements réalisés au laboratoire	
		Date d'application:

-Manipulations techniques pour la réalisation du scotch anal :

-Vérification du respect par le patient des conditions de réalisation (pas de toilette anale...)

Oui Non validé par :

-Port des gants

Oui Non validé par :

-Réalisation du prélèvement

Oui Non validé par :

-Règles concernant l'étiquetage des prélèvements :

-Etiquetage des prélèvements en contrôlant l'identité du patient

Oui Non validé par :

-Archivage :

-Cahier de prélèvement correctement rempli:

Identité du patient renseignée

Oui Non validé par :

Nom et service du prescripteur renseignés

Oui Non validé par :

Nom du préleveur renseigné

Oui Non validé par :

Heure et date de prélèvement renseignées

Oui Non validé par :

Type de prélèvement effectué

Oui Non validé par :

-Obtention de la qualification :

Oui Non

validée par :

Le :

2.1.2 Personnel préleveur n'appartenant pas au laboratoire : manuel de prélèvements et catalogue des analyses

Lorsque le prélèvement est réalisé par du personnel n'appartenant pas au laboratoire, il convient que le laboratoire dispose d'une liste de diffusion exhaustive, démontrant que l'ensemble des personnes concernées par le prélèvement, a pris connaissance du Manuel de Prélèvement des échantillons primaires (spécimens) (1) (2).

En effet, dans le paragraphe 5.4.2. la Norme recommande un effort tout particulier concernant le manuel de prélèvement :

« Des instructions spécifiques relatives au prélèvement et à la manipulation des échantillons primaires doivent être documentées et mises en œuvre par la direction du laboratoire et être mises à la disposition des responsables du prélèvement des échantillons primaires. Ces instructions doivent figurer dans un manuel des échantillons primaires ».

Comme nous l'avons évoqué au chapitre « Prestation de conseils », la structure qualité du CHU de Limoges a mis en place un manuel de prélèvements complété par un catalogue des analyses directement consultable par tous les services reliés au réseau de l'hôpital sur Hermès avec l'intranet. Des mises au point sont régulièrement réalisées afin que ce catalogue soit en mesure de répondre aux attentes de la Norme.

D'après le paragraphe 5.4.3. le manuel de prélèvement des échantillons primaires doit comprendre les éléments suivants :

a) Des copies ou des références à

1. des listes d'analyses de laboratoire disponibles proposées,

2. des formulaires de consentement, le cas échéant,

3. des informations et des instructions fournies aux patients en rapport avec leur propre préparation avant le prélèvement des échantillons primaires, et

4. des informations données aux utilisateurs des prestations du laboratoire sur les indications médicales et le choix approprié des méthodes disponibles

b) Des procédures concernant

1. la préparation du patient (par exemple instructions destinées au personnel soignant et aux personnes effectuant les prélèvements)

Il semble indispensable, au regard de ces textes, de diffuser des informations concernant la préparation du patient avant un prélèvement. La cellule qualité a prévu un «espace laboratoire» sur Hermès afin que toutes ces instructions puissent être diffusées aux cliniciens. Nous avons mis en place des fiches d'instructions destinées aux préleveurs (infirmiers, médecins) et destinées aux patients (*Illustrations 6 et 7*). Concernant le secteur de parasitologie directe, le seul prélèvement qui nécessite une préparation spécifique du patient est le Scotch[®]-test anal réalisé lors d'une recherche d'oxyurose; pour cet examen, la mise en évidence d'éléments parasitaires dépend directement du respect par le patient de certaines conditions de prélèvement.

Pour les conditions de prélèvement, le document LAB GTA 12 conseille de se reporter aux références d'ANOFEL (12) ou au livre d'Ambroise-Thomas et Golvan (14).

 Parasitologie - Mycologie	PREPARATION DU PATIENT AU SCOTCH[®]- TEST ANAL (Test à la cellophane adhésive)	
		Date d'application:

INDICATIONS :

- Recherche d'oxyurose (*Enterobius vermicularis*)
- Recherche de cestodose à *Taenia sp.*

CONDITIONS DE REALISATION :

Cet examen est la méthode de choix pour mettre en évidence les œufs d'oxyures, cependant sa sensibilité dépend directement des conditions de réalisation du prélèvement.

Il est donc impératif de respecter les instructions suivantes :

- Le patient devra effectuer sa toilette anale la veille du prélèvement (le soir de préférence).
- Le prélèvement sera pratiqué le matin avant la toilette anale du patient et avant défécation.

IMPOSSIBILITE DE REALISATION :

- Prescription de suppositoires, en particulier chez le jeune enfant.

Il sera préférable de faire réaliser ce prélèvement au laboratoire de Parasitologie-Mycologie à partir de 9 h après avoir prévenu le service (poste 56160).

 <p>Parasitologie Mycologie</p>	Instructions destinées au patient concernant le SCOTCH®-TEST ANAL	
		Date d'application:

1. Description du geste

La recherche d'oxyures (petits vers blancs souvent à l'origine de démangeaisons anales nocturnes) ou de Tænia nécessite un prélèvement : le Scotch®-test anal.

Il sera effectué le matin au moyen de cellophane adhésive (Scotch®) appliquée pendant quelques secondes sur la marge de l'anus pour récupérer les œufs des vers potentiellement présents à ce niveau.

Ce prélèvement peut être réalisé au laboratoire de parasitologie-mycologie (à partir de 9h) ou dans le service d'hospitalisation.

2. Est-il associé à des phénomènes douloureux ?

Non, ce geste est indolore

3. Peut-il y avoir des complications éventuelles ?

Non

4. Précautions à prendre avant le geste

La sensibilité de cette recherche dépend directement des conditions de réalisation du prélèvement, c'est pourquoi il est indispensable que vous suiviez les instructions suivantes :

▸ **La veille au soir :**

- prendre une douche avec toilette anale
- éviter toute prise de suppositoire

▸ **le matin :**

- ne pas aller à la selle
- ne pas faire de toilette anale
- venir au laboratoire le plus tôt possible à partir de 9h (sauf si le prélèvement est réalisé par l'infirmière)

S'il s'agit d'un enfant n'ayant pas encore atteint l'âge de la propreté, essayez dans la mesure du possible de respecter les mêmes règles.

5. Ce qu'il faut en attendre et ne pas en attendre :

Ce prélèvement permet de mettre en évidence des œufs d'oxyure ou de Tænia, parasites pour lesquels un traitement efficace peut être administré. Cependant, une recherche négative n'exclut pas la présence d'un de ces parasites.

Si les précautions ci-dessus ne sont pas respectées, une recherche négative n'est pas significative.

2.2 ANALYTIQUE

2.2.1 Des contrôles internes de qualité pour une formation continue

La Norme insiste dans les paragraphes 5.1.9. et 5.1.11, sur la nécessité d'une formation continue. :

« un programme de formation continue doit être disponible pour toute les catégories de personnel. »

« La compétence de chaque membre du personnel pour remplir les tâches imparties doit être évaluée à l'issue de la formation, puis périodiquement par la suite (...) »

Le document LAB GTA 12 (4) précise que le personnel peut utiliser, pour maintenir sa qualification et sa compétence, des spécimens témoins, faire référence à des ouvrages bibliographiques et démontrer sa formation continue (interne ou externe). Il appartient au laboratoire de démontrer la manière dont il maintient la compétence de son personnel technique et qui peut être fondée sur l'autoévaluation.

Le secteur de parasitologie directe présente plusieurs particularités qui nous ont incitées à mettre en place une procédure de contrôles internes de qualité:

- La majorité des recherches parasitaires a recours à l'examen direct et repose sur l'identification au microscope optique (morphologie), la qualification des personnes effectuant ces lectures apparaît comme essentielle.
- De nombreuses parasitoses humaines sont peu fréquentes en France métropolitaine, il est alors important d'exercer l'œil du microscopiste en abordant celles-ci par le biais de contrôles internes réguliers.
- La recherche du paludisme est l'urgence diagnostique en parasitologie ; le pronostic vital du patient dépend alors de l'aptitude du laboratoire à mettre en évidence *Plasmodium falciparum*. Ce parasite sanguin sera donc abordé de façon privilégiée au cours de nos contrôles internes.

Ceux-ci sont effectués à tour de rôle par chacun des techniciens pouvant être amenés à prendre en charge un prélèvement dans le secteur de parasitologie directe.

Concernant la périodicité de ces contrôles, une fréquence trimestrielle a été prévue. Ils associent à chaque fois un échantillon de selles négatif ou positif (aux principaux protozoaires et helminthes) et un frottis sanguin, négatif ou positif (aux principaux parasites sanguins).

Comme pour tout prélèvement, ces contrôles sont enregistrés sur GLIMS et validés.

2.2.2 Autres mesures de formation

La formation continue est également assurée par la participation du personnel aux contrôles AFSSAPS et à des formations spécifiques (Bioformation...). Des mesures supplémentaires telles l'étude des cas cliniques mensuels du CDC (Centers for Disease Control) (15), ou un enseignement via « PARASITimages » seront prochainement envisagées. La traçabilité de toutes ces procédures de formation est une condition *sine qua non*.

2.2.3 Habilitation au secteur de parasitologie directe

Un autre élément prépondérant dans la qualité du processus analytique est la maîtrise, par le personnel, des techniques manuelles de concentration et de coloration préalables à l'examen microscopique.

Nous avons donc mis en place en priorité une procédure d'habilitation des internes ou des nouveaux techniciens affectés au secteur de parasitologie directe (*Illustration 8*).

 Parasitologie - Mycologie	HABILITATION EN PARASITOLOGIE DIRECTE	
		Date d'application:

Nom de l'interne à habilitier :

Date de prise de fonction:

Cette fiche décrit les compétences nécessaires pour qu'un interne en biologie soit habilité à prendre de façon autonome des activités spécifiées au sein du secteur de parasitologie directe dans le laboratoire de parasitologie-mycologie. Elle sera remplie pour chaque nouvel interne présent dans ce secteur.

I. FORMATION

Elle est assurée sous la responsabilité d'un technicien(ne) référent du secteur et du biologiste responsable du secteur.

Durée minimum de formation : 15 jours à 1 mois

Cette fiche sera remplie en concertation entre le technicien référent et le biologiste responsable du secteur.

II. COMPETENCES EXIGEES

-Manipulations techniques pour la recherche et l'identification des différents parasites en fonction du prélèvement. Tous les examens bénéficient d'une double lecture par l'interne et le technicien référent.

-Recherche et identification des parasites du sang et organes hématopoïétiques :

-PALUDISME

- | | | | |
|---------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------|
| -Frottis mince MGG | Oui <input type="checkbox"/> | Non <input type="checkbox"/> | <i>validé par :</i> |
| -BinaxNOW Malaria® | Oui <input type="checkbox"/> | Non <input type="checkbox"/> | <i>validé par :</i> |
| -Goutte épaisse | Oui <input type="checkbox"/> | Non <input type="checkbox"/> | <i>validé par :</i> |
| -Calcul de la parasitémie | Oui <input type="checkbox"/> | Non <input type="checkbox"/> | <i>validé par</i> |

 Parasitologie - Mycologie	HABILITATION EN PARASITOLOGIE DIRECTE	
		Date d'application:

-Recherche et identification d'ectoparasites (sarcopte, demodex...):

-Prélèvement Oui Non validé par :
 -Identification Oui Non validé par :

-Recherche d'oxyurose :

-Prélèvement Oui Non validé par :
 -Identification Oui Non validé par :

-Gestion du poste de travail :

-Maîtriser la gestion documentaire du poste Oui Non validé par :

-Hygiène, Sécurité, Elimination des déchets :

-Respecter les règles d'hygiène Oui Non validé par :
 -Connaître les règles de sécurité
 AES Oui Non validé par :
 Sécurité incendie Oui Non validé par :
 Risques infectieux et chimiques (feuilles de sécurité) Oui Non validé par :

-Elimination des déchets Oui Non validé par :

-Archivage :

-Conservation des échantillons
 Lieu de stockage Oui Non validé par :
 Durée Oui Non validé par :
 Température Oui Non validé par :

-Notions générales :

-Saisie des résultats Oui Non validé par :
 -Approche d'un Regard critique sur le prélèvement Oui Non validé par :
 -Regard critique sur le résultat Oui Non validé par :
 -Validation biologique Oui Non validé par :

2.3 POST-ANALYTIQUE

Le document LAB GTA 12 (4) insiste sur le rôle fondamental du biologiste dans l'interprétation du résultat en fonction du contexte épidémiologique et biologique du patient. Ces renseignements sont recueillis en amont, au moment du prélèvement ou au moment de la réception du prélèvement, par appel téléphonique (fiche de renseignement paludisme, cahier de renseignements cliniques) et permettent ainsi une validation biologique éclairée.

3. PROCEDURES TECHNIQUES

Les Paragraphes 5.4, 5.5, 5.6, et 5.7 de la Norme abordent les exigences techniques respectivement relatives aux procédures pré-analytiques, analytiques, à l'assurance qualité des procédures analytiques et aux procédures post-analytiques.

Concernant les procédures pré-analytiques (Paragraphe 5.4.), le document SH REF 02 (3) résume ces exigences en précisant que la qualité de l'examen de Biologie Médicale est mieux maîtrisée lorsque l'échantillon est prélevé au laboratoire. Ceci s'explique par la maîtrise de principes de base : vérification de l'identité du patient, validation de la prescription sur la base d'éléments cliniques pertinents, vérification du respect des conditions de réalisation du prélèvement, faible délai d'acheminement de l'échantillon et maîtrise de la phase post-analytique grâce aux renseignements cliniques disponibles.

Dans le cas où le laboratoire réalise le prélèvement, il veillera à disposer de dispositions appliquées pour la réalisation des prélèvements de spécimens (4). Les conditions de prélèvement doivent être spécifiées par le laboratoire (par exemple dans un guide ou catalogue). Le laboratoire pourra se reporter aux références d'ANOFEL ou au livre d'Ambroise-Thomas et Golvan (4).

3.1 LE PRELEVEMENT EST REALISE AU LABORATOIRE

Au laboratoire de parasitologie de Limoges, les prélèvements réalisés au laboratoire sont les prélèvements techniques nécessitant des compétences particulières et des connaissances épidémiologiques et cliniques approfondies. La qualité du résultat rendu est alors directement dépendante de la qualité de la procédure pré-analytique. La démarche analytique est réduite, pour ces recherches parasitaires, à la recherche d'éléments parasitaires de grande taille, facilement identifiables par un technicien averti au moyen d'un examen direct. La maîtrise de

cette analyse passe par l'identification des causes d'incertitude pouvant avoir une influence sur le résultat et la mise en place d'actions destinées à limiter cette incertitude.

3.1.1 Recherche de sarcoptes

La gale humaine est une ectoparasitose très contagieuse due à un acarien, *Sarcoptes scabiei* var *hominis*. Elle touche préférentiellement les couches les plus défavorisées des populations (16) et est fréquente dans les collectivités (hôpitaux, maisons de retraite, écoles...) (12) (16). Le diagnostic biologique se fait par recherche de sarcoptes à l'examen direct ; il n'est pas toujours réalisé car le diagnostic est souvent établi à partir des arguments cliniques et épidémiologiques. Il est cependant souhaitable de rechercher les sarcoptes chez un sujet isolé suspect de gale ou dans un contexte épidémique nécessitant d'affirmer le diagnostic (16). Le signe clinique classique est un prurit intense et généralisé causé par une réaction d'hypersensibilité. Il est associé à des lésions cutanées plus ou moins typiques dont les localisations préférentielles sont les espaces interdigitaux, la face antérieure des poignets, les zones péri-mamelonaires et péri-ombilicale et respectent en général le visage.

La mise en évidence du parasite est réputée difficile chez l'immunocompétent en raison du nombre réduit de sarcoptes hébergés. La sensibilité de l'examen direct dépend de plusieurs facteurs comme la présentation clinique et l'expérience du préleveur (16) (17) (*Tableau 5*). Lorsque les signes les plus évocateurs, sillons et vésicules perlées des espaces interdigitaux, sont présents, l'examen est généralement positif. Le prélèvement se fait par raclage cutané perpendiculairement au sillon à l'aide d'une curette ou d'un vaccinostyle (12) (16) (17). Les squames ainsi recueillies sont ensuite déposées dans une goutte de mélange éclaircissant (KOH 30% ou chloral-lactophénol) puis recouvertes d'une lamelle. Plusieurs prélèvements sont nécessaires pour augmenter la sensibilité (17). Les lames sont observées à l'objectif 10, une deuxième lecture retardée, pouvant laisser apparaître des éléments parasitaires par éclaircissement, est recommandée (14). Les femelles adultes et/ou les œufs sont facilement reconnaissables ; les premières sont ovalaires, présentent 4 paires de pattes et mesurent environ 300 µm, les œufs ont une coque épaisse et un diamètre longitudinal d'environ 150 µm. Les larves, œufs vides, débris et déjections (scybales) de sarcopte sont plus difficiles à identifier mais permettent de sensibiliser la recherche.

3.1.1.1 Mode opératoire

L'*Illustration 9* expose la version 2011 de notre mode opératoire.

 Parasitologie - Mycologie	RECHERCHE DE GALE	PARA MO1 P PREA 004 A
		Date d'application: 01/02/2011

INDICATION :

Suspicion de gale
Recherche de *Sarcoptes scabiei*

MATERIEL ET REACTIFS :

Salle de prélèvement :

- lame porte objet et lamelles de microscope
- chloral-lactophénol
- vaccinostyle stérilisé dans tube à hémolyse en verre :
*ne pas jeter après utilisation,
mettre dans le réactif désinfectant de la salle de prélèvement,*
- compresses
- lampe mobile
- gants
- papier de protection

Pièce technique de parasitologie :

- microscope

INFORMATIONS PREALABLES :

- Vérifier l'identité du patient et noter dans le cahier de prélèvement l'identité du patient, la date de naissance, la date du prélèvement, le service prescripteur, le type de prélèvement réalisé et l'identité du préleveur.
- Rassurer le patient en lui expliquant le déroulement du prélèvement.
- Rechercher des informations permettant d'argumenter la suspicion de gale :
 - Prurit, exacerbation nocturne
 - Antécédents ? si oui, y a-t-il eu un traitement et évaluer l'observance
 - contexte social : profession (personnel soignant à risque), vie en collectivité
 - personnes atteintes de gale dans l'entourage proche (famille) ou au travail, si oui, depuis quand ?

 Parasitologie - Mycologie	RECHERCHE DE GALE	PARA MO1 P PREA 004 A
		Date d'application: 01/02/2011

TECHNIQUE DE PRELEVEMENT :

- Mettre des gants.
- Installer un papier de protection sur la table pour que le patient y dépose ses mains.
- Préparer les lames.
- Repérer des lésions caractéristiques (sillons, vésicules perlées) en s'aidant d'une lampe à fort éclairage. Les lésions peuvent être excoriées, eczématisées.
Attention en cas de squames croûteuses : se méfier d'une gale norvégienne, hypercontagieuse.
Regarder en priorité :
 - Sur la paume des mains, entre les doigts, le poignet, les avant-bras et le tronc.
 - Sur la plante des pieds, les jambes et les aisselles chez les nourrissons.
- Soulever le toit de la vésicule ou du sillon à l'aide de la pointe du vaccinostyle, puis gratter assez fortement le plancher de la lésion avec le côté du vaccinostyle. En cas de squames croûteuses, gratter simplement de manière à les récupérer à l'aide du vaccinostyle.
- Le prélèvement est déposé dans une goutte de chloral-lactophénol sur une lame en verre de microscope. Afin de récupérer la totalité du prélèvement, gratter le vaccinostyle sur le bord de la lame puis ramener le prélèvement au centre de la lame à l'aide d'une lamelle.
- Renouveler le prélèvement sur plusieurs lésions, après avoir essuyé le vaccinostyle à l'aide d'une compresse (le chloral-lactophénol étant irritant pour la peau).
- Lire aussitôt la lame au microscope en faisant attendre le patient.

LECTURE :

- Rechercher un élément parasitaire (la forme adulte, la forme larvaire, ses œufs ou ses déjections, voire un morceau de patte...).
- Lire la totalité de la lame au microscope optique à objectif x 10.
- Si le prélèvement est positif,
 - en informer le patient, le personnel de santé qui l'accompagne.
 - téléphoner au médecin.
 - indiquer sur le résultat les éléments observés de *Sarcoptes scabiei* (œufs, larves, adultes, déjections).
- **Si le prélèvement est négatif,**
 - **en refaire un autre sur des lésions différentes**
 - téléphoner le résultat de la lecture au service demandeur
 - **faire une 2^{ème} lecture des prélèvements quelques heures plus tard** (jusqu'à 24 heures) après éclaircissement d'un prélèvement trop épais, avant de rendre un résultat négatif.
- Attention : ne pas jeter les lames après une première lecture.



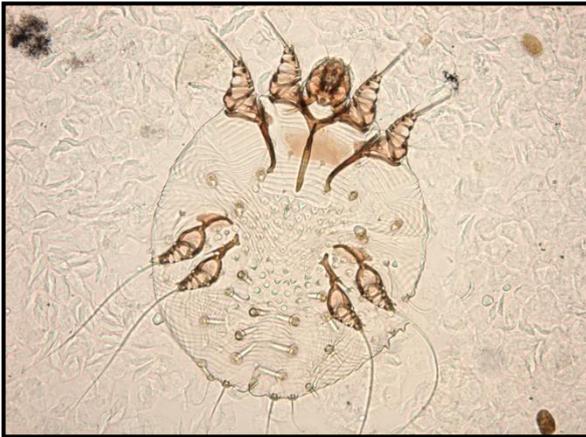
Parasitologie -
Mycologie

RECHERCHE DE GALE

PARA MO1 P PREA 004 A

Date d'application:
01/02/2011

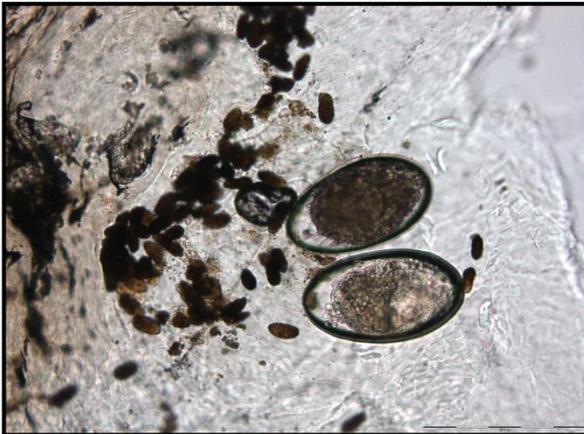
*Sarcopte adulte=300µm (4 paires de pattes)
(les formes larvaires présentent 3 paires de pattes)*



*Sarcopte adulte (4 paires de pattes)
avec une bulle d'air*



2 œufs (150µm) contenant une larve+ multiples déjections



Débris d'œufs + déjections



 Parasitologie - Mycologie	RECHERCHE DE GALE	PARA MO1 P PREA 004 A
		Date d'application: 01/02/2011

Patte de Sarcopte



ELIMINATION DES MATERIAUX UTILISES :

Après la deuxième lecture, les lames négatives pourront être jetées dans l'emballage (NF) jaune pour déchets à côté des microscopes.

DOCUMENTS DE REFERENCE :

Anofel, *Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales*, Elsevier Masson, 2007

3.1.1.2 Incertitude de mesure et maîtrise du risque d'erreur

Les facteurs susceptibles d'influencer le résultat d'une recherche de sarcoptes peuvent être ciblés grâce à la règle des 5M (*Tableau 5*) ; le niveau d'influence est ensuite évalué par l'attribution d'un score (1 pour un faible niveau d'influence, 3 pour un niveau intermédiaire et 9 pour un niveau d'influence élevé). On observe alors que le niveau d'influence de la main d'œuvre (personnel) est élevé à toutes les étapes de l'analyse, en effet nous avons vu précédemment que la compétence du préleveur est déterminante dans la qualité du résultat. Afin de minimiser au maximum le risque d'erreur, le laboratoire de parasitologie de Limoges a mis en place des mesures d'habilitation de l'interne, celui-ci prend en charge la totalité de la recherche de sarcopte (du prélèvement au rendu du résultat par appel téléphonique). Le mode opératoire appliqué à Limoges décrit, en référence aux recommandations ANOFEL, les modalités de prélèvement en précisant les informations cliniques et épidémiologiques qui seront utiles à l'interne et au biologiste dans l'approche diagnostique. De plus, un second prélèvement en cas de négativité ainsi qu'une deuxième lecture différée des lames négatives permettent de limiter les faux négatifs.

Des photographies des différents éléments parasitaires observables, permettant de conclure à une recherche de gale positive (même s'ils sont vus de manière isolée), illustrent le mode opératoire dans un but pédagogique.

La validation initiale de cette méthode de recherche est avant tout basée sur le respect des données bibliographiques. Certains indices statistiques permettent tout de même de procéder à une évaluation continue de la recherche telle qu'elle est réalisée au laboratoire.

Sur l'ensemble des 332 recherches de sarcoptes effectuées du 01/01/2008 au 28/01/2011, 117 se sont avérées positives, soit 35% de prélèvements positifs. Ce taux ne représente pas une sensibilité car toutes les recherches négatives n'étaient pas forcément réalisées chez des patients infectés (suspicion clinique par excès, diagnostic d'exclusion). La sensibilité diagnostique au CHU de Limoges est donc supérieure à 35%.

Le rendement théorique de l'examen direct est faible, même entre des mains expérimentées, nous pouvons donc considérer la prise en charge au laboratoire comme satisfaisante (18).

Tableau 5 : Recherche de sarcopte, facteurs d'incertitude et maîtrise du risque d'erreur

<i>Pré-analytique</i>		Niveau d'influence	Mesures mises en place
Main d'œuvre	<i>Compétence du préleveur : reconnaissance des lésions typiques, qualité de l'interrogatoire</i>	9	<i>Prélèvement au laboratoire, mode opératoire détaillé Habilitation des internes</i>
Méthode	<i>Grattage : nombre et type de lésions prélevées, force du grattage</i>	9	<i>Habilitation / Deuxième prélèvement si négatif</i>
Milieu	<i>Chloral-lactophénol : délai d'éclaircissement des squames</i>	3	<i>Deuxième lecture différée systématique des négatifs</i>
Matériel	<i>vaccinostyle</i>	1	...
Matière	<i>Squames</i>	1	...
<i>Analytique</i>		Niveau d'influence	Mesures mises en place
Main d'œuvre	<i>Microscopiste : qualification (reconnaissance des différents éléments), concentration</i>	9	<i>Mode opératoire illustré, habilitation</i>
Méthode	<i>Lecture des lames au 10</i>	3	<i>Mode opératoire, habilitation</i>
Milieu			...
Matériel	<i>Microscope</i>	3	<i>Maintenance</i>
Matière			...
<i>Post-analytique</i>		Niveau d'influence	Mesures mises en place
Main d'œuvre	<i>Biologiste ou interne : connaissance des renseignements cliniques et épidémiologiques</i>	9	<i>Le préleveur communique le résultat interprété par téléphone</i>
Méthode			
Milieu			
Matériel	<i>Système informatique de laboratoire</i>	1	...
Matière			

3.1.2 Test à la cellophane adhésive ou Scotch[®]-test anal

Ce prélèvement est réalisé pour la mise en évidence d'*Enterobius vermicularis*, nématode intestinal cosmopolite, responsable de l'oxyurose. Il est plus rarement prescrit, pour la recherche d'œufs de Ténias.

L'oxyurose est très répandue, surtout chez l'enfant, on estime que presque tous les enfants sont à un moment donné touchés par cette parasitose (12). Les oxyures adultes vivent dans la région caeco-appendiculaire et les femelles gravides migrent la nuit vers la marge anale pour y pondre des milliers d'œufs. La contamination se fait ensuite par ingestion des œufs émis dans le milieu extérieur.

La fixation des femelles au niveau de la marge anale peut provoquer un prurit anal vespéral qui est le plus fréquent des symptômes et donc des motifs prescription. Cependant cette parasitose est en général asymptomatique. Une hyperéosinophilie sanguine inexplicée associée ou non à des troubles digestifs peut aussi amener le clinicien à prescrire un test à la cellophane adhésive (*Illustration 3*). Malheureusement, l'intérêt du Scotch[®]-test anal est souvent oublié par le prescripteur qui se contente fréquemment de réaliser une recherche de parasites dans les selles moins efficace pour mettre en évidence *Enterobius vermicularis*. Les 14 tests à la cellophane adhésive réalisés en 2009 à Limoges (un seul positif) illustrent la méconnaissance de l'examen.

Afin de limiter cet oubli, nous avons rappelé au prescripteur l'importance du test par le biais des aides à la prescription et de certains de nos commentaires pré-établis (*Tableau 14*).

3.1.2.1 Conditions de réalisation

La recherche des œufs caractéristiques pondus sur la marge anale permet une identification de cette parasitose. La meilleure technique est le test à la cellophane adhésive de Graham (12) qui consiste à appliquer contre les plis radiés de l'anus la face collante d'un ruban adhésif transparent (*Illustration 10*). Celui-ci, une fois collé sur une lame porte objet est examiné au microscope. La sensibilité de cette recherche dépend directement des conditions de réalisation du prélèvement qui doit être effectué le matin avant toute toilette locale et toute défécation (12).

3.1.2.2 Mode opératoire

L'*Illustration 10* expose la version 2011 de notre mode opératoire.

 <p>Parasitologie - Mycologie</p>	SCOTCH[®]-TEST ANAL (Test à la cellophane adhésive de Graham)	PARA MO2 P PREA 004A
		Date d'application: 01/02/2011

INDICATIONS :

Diagnostic d'oxyurose (*Enterobius vermicularis*)
Diagnostic de cestodose à *Taenia sp.*

MATERIEL :

- Gants
- Table d'examen
- Papier protecteur
- Lame porte objet de microscope
- Ruban adhésif transparent (Scotch[®])
- Ciseaux

INFORMATIONS PREALABLES :

- Vérifier l'identité du patient et noter dans le cahier de prélèvement l'identité du patient, la date de naissance, la date du prélèvement, le service prescripteur, le type de prélèvement réalisé et l'identité du préleveur.
- Vérifier que les informations relatives à la préparation de cet examen ont bien été remises au patient et suivies par celui-ci.
- Si le patient est mineur, ne réaliser le prélèvement qu'en présence d'un parent ou d'une autre personne soignante.
- Rassurer le patient en lui expliquant le déroulement du prélèvement.

TECHNIQUE DE PRELEVEMENT :

En cas de recherche d'oxyure, le prélèvement s'effectue le matin chez un patient n'ayant pas eu de toilette anale et n'ayant pas encore émis de selles. Si ces conditions ne sont pas réunies, faire revenir le patient un autre jour si possible.

- Indiquer le nom du patient sur la lame.
- Mettre le patient en position genu-pectorale sur la table d'examen protégée par un papier. Pour les jeunes enfants, les installer en position de décubitus latéral, les genoux ramenés sur le ventre.
- Découper un morceau de Scotch[®] transparent d'une longueur légèrement inférieure à celle d'une lame porte-objet et coiffer l'extrémité arrondie d'un tube de 10 cc en plaçant la partie adhésive vers l'extérieur.
- Mettre des gants.
- Appliquer ce montage à la marge de l'anus après avoir déplié les plis radiés de l'anus puis déposer le scotch sur une lame en évitant au maximum les bulles d'air.
- Oter les gants.
- Aider le patient à se relever.
- Le faire patienter le temps de la lecture.



Parasitologie -
Mycologie

**SCOTCH®-TEST
ANAL
(Test à la cellophane
adhésive de Graham)**

**PARA MO2 P PREA 004
A**

Date d'application:
01/02/2011

LECTURE :

- Lire au microscope objectif x 10 de manière à repérer les œufs d'oxyures (*Enterobius vermicularis*) ou de *Taenia sp.*

Nombreux œufs d'oxyures sur Scotch®



Œuf d'oxyure sur examen direct des selles



Œuf de Taenia sp. (50µm)



ELIMINATION DES MATERIAUX UTILISES :

- Après la deuxième lecture, les lames négatives pourront être jetées dans l'emballage (NF) jaune pour déchets à côté des microscopes.

DOCUMENTS DE REFERENCE :

Y. J. Golvan, P. Ambroise-Thomas, LES NOUVELLES TECHNIQUES EN PARASITOLOGIE, 1984, FLAMMARION

3.1.3 Recherche de *Demodex folliculorum*

3.1.3.1 Commensal ou pathogène ?

Le demodex est un ectoparasite cosmopolite qui appartient à l'embranchement Arthropodes, à la classe des Arachnides, à l'ordre des acariens et à la famille des Démodécidés. chez l'Homme, deux espèces sont habituellement isolées : *Demodex folliculorum* qui vit dans le follicule pileux, et *Demodex brevis* retrouvé dans les glandes sébacées du visage. L'adulte mesure 300 à 400 µm de long sur 40 µm de large, il est vermiforme, possède une tête rattachée à une partie antérieure comprenant quatre paires de pattes très courtes et une partie postérieure allongée. La larve, de plus petite taille est initialement apode, acquiert 6 pattes en 3-4 jours (19).

Si les demodex sont bien connus en pathologie vétérinaire, en revanche leur caractère pathogène dans les dermatoses humaines est sujet à controverse. Des études ont montré que ce parasite était présent dans 18 à 80% des cas d'acné rosacée, dans 45% des blépharites inflammatoires et 42% des folliculites (19). Cependant, pour certains auteurs, la présence d'une lésion cutanée constitue un terrain favorable au développement du parasite, initialement présent sur la peau saine (20). Certains arguments ont alors été proposés pour établir son rôle pathogène, comme la présence d'un nombre important de demodex intra-folliculaires, ou une amélioration clinique rapide lors d'un traitement d'épreuve par un anti-acarien (19).

Pour la recherche en cas de blépharite, il est nécessaire d'arracher 4 ou 5 cils par paupière au moyen d'une pince à épiler. Les cils et les débris adjacents doivent être observés dans une goutte de sérum physiologique ou de chloral-lactophénol (permettant de conserver les préparations) entre lame et lamelle au microscope à l'objectif 10 puis 40.

Le rôle du *Demodex* dans la blépharite doit être discuté en fonction de leur abondance à la base des cils. En effet la présence de nombreux *Demodex* par cil (3 ou plus) suggère fortement leur implication dans l'étiologie de la blépharite. En revanche, un nombre plus réduit doit faire envisager une autre étiologie (21).

En cas de rosacée, le diagnostic de *Demodex* peut être fait par biopsie de la surface de la peau ou par grattage des squames cutanées.

3.1.3.2 Mode opératoire

L'illustration 11 expose la version 2011 de notre mode opératoire.

	RECHERCHE DE DEMODEX FOLLICULORUM	PARA MO3 P PREA 004 A
		Date d'application: 01/02/2011

INDICATION :

Recherche de *demodex folliculorum*
Démodicie des cils (blépharite chronique)
Eruption papulo-pustuleuse du visage

MATERIEL :

Salle de prélèvements :

Pinces à épiler à extrémités plates
Compresse
Curettes
Lames porte-objets et lamelles de microscope
Chloral-lactophénol

Pièce de parasitologie :

Microscope à contraste de phase

INFORMATIONS PREALABLES :

- Vérifier l'identité du patient et noter dans le cahier de prélèvement l'identité du patient, la date de naissance, la date du prélèvement, le service prescripteur, le type de prélèvement réalisé et l'identité du préleveur.
- Rassurer le patient en lui expliquant le déroulement du prélèvement.

TECHNIQUE DE PRELEVEMENT :

En cas de blépharite (démodicie des cils)

- Repérer des cils dont la base paraît engluée dans une substance jaunâtre (aspect inflammatoire): ce sont ceux-là qui sont à prélever en priorité. Si les cils paraissent normaux, prélever au hasard 4 cils par paupière (supérieure et inférieure) et par œil.
- Les cils sont arrachés à l'aide de la pince à épiler, en maintenant la paupière à l'aide de la compresse pour rendre le geste moins douloureux.
- Déposer les cils prélevés dans une goutte de chloral-lactophénol sur une lame porte-objet, en séparant sur 2 lames différentes les cils de l'œil droit et de l'œil gauche.
- Recouvrir d'une lamelle.
- Indiquer sur les lames : le nom du patient et œil droit ou œil gauche.

En cas d'éruption papulo-pustuleuse

- Prélever la lésion à l'aide d'une curette ou d'un vaccinostyle.
- Déposer le matériel prélevé dans une goutte de chloral-lactophénol sur une lame porte-objet.
- Recouvrir d'une lamelle.



LECTURE :

- Lire immédiatement la totalité des lames au microscope objectif x 10 ou au contraste de phase x 20.
- Compter le nombre de *Demodex folliculorum* et le rapporter pour chaque oeil au nombre de cils prélevés (Cette notion quantitative est importante car la présence de *Demodex* est fréquente chez des personnes asymptomatiques et son rôle pathogène n'est pas clairement démontré).
- En cas de recherche négative et/ou de prélèvements épais, relire les lames après avoir laissé s'éclaircir le prélèvement.

Demodex à côté d'un cil



Demodex sur un cil



ELIMINATION DES MATERIAUX UTILISES :

Les lames négatives pourront être jetées dans l'emballage (NF) jaune pour déchets à côté des microscopes.

DOCUMENTS DE REFERENCE :

Y. J. Golvan, P. Ambroise-Thomas, LES NOUVELLES TECHNIQUES EN PARASITOLOGIE, 1984, FLAMMARION

3.1.4 Recherche d'onchocercose

La recherche de cette filariose cutanée concerne principalement des sujets ayant vécu longtemps en zone rurale d'Afrique intertropicale où elle représente encore une cause importante de cécité. Elle nécessite le prélèvement de fragments de peau ellipsoïdes (biopsie cutanée exsangue) déposés dans un verre de montre qui contient du sérum physiologique (12). L'observation à la loupe binoculaire permet ensuite de mettre en évidence les microfilaires.

Ce prélèvement invasif et technique n'est réalisé que par les biologistes du service. Son mode opératoire a également été créé et intégré dans notre système de documentation.

3.2 LE PRELEVEMENT N'EST PAS REALISE AU LABORATOIRE

3.2.1 Gestion des non-conformités

Lorsque le prélèvement n'est pas réalisé au laboratoire, il est difficile de maîtriser l'ensemble des facteurs d'incertitude pouvant avoir une influence sur la qualité du résultat. Même si le manuel de prélèvements permet de limiter les erreurs au moment du recueil de l'échantillon, la pratique nous démontre qu'il est difficile de les supprimer et qu'il est fréquent de recevoir des prélèvements non conformes. Dans ce cas, le biologiste ne doit pas accepter l'échantillon, sauf cas particulier de prélèvement précieux (urgent ou non renouvelable) (3).

La Norme précise dans le chapitre 4.9 la nécessité de mettre en place une politique d'identification et de maîtrise des non-conformités :

« La direction du laboratoire doit mettre en place une politique et une procédure à mettre en œuvre en cas de non-conformité quelconque de ses analyses par rapport à ses propres procédures (...) cette politique et cette procédure doivent garantir que (...) le personnel chargé de résoudre le problème est identifié, les mesures à prendre sont définies, (...) les analyses sont interrompues, (...) les actions correctives sont immédiatement entreprises, (...) la responsabilité pour autoriser la reprise des analyses est définie et, chaque non-conformité est documentée et enregistrée (...) »

A Limoges, une procédure détaillant la liste des non-conformités relatives à chaque parasitose et la conduite à tenir en fonction des situations (non-conformité mineure ou majeure) est mise à jour régulièrement.

Chaque prélèvement non conforme est enregistré sur le logiciel GLIMS par le personnel, le compte-rendu précise la non-conformité et le prescripteur est contacté pour correction de

l'erreur. Si l'analyse est malgré tout réalisée (après accord du biologiste), le résultat est rendu sous réserve avec un commentaire adapté du biologiste.

3.2.2 Recherche de paludisme

En France métropolitaine en 2009, à partir des 2200 cas déclarés au Centre National de Référence, le nombre de cas de paludisme d'importation a été estimé à 4000 (22). Les pays de contamination sont majoritairement situés en Afrique subsaharienne (90%) et les cas de paludisme sont dus dans 82% des cas à *Plasmodium falciparum* (l'espèce potentiellement mortelle). *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale* sont chacun incriminés dans 6-7% des cas et *Plasmodium malariae* dans 2% des cas (23). Il faut souligner que les accès graves représentaient 8,6% de l'ensemble des accès palustres en 2009. De manière quasi systématique, les accès graves, et *a fortiori* mortels, sont associés à un retard de la prise en charge médicale. Le diagnostic du paludisme d'importation reste donc en toutes circonstances un diagnostic d'urgence.

Par ailleurs, une donnée épidémiologique récente doit être prise en compte ; une cinquième espèce : *Plasmodium knowlesi* a été reconnue comme responsable d'accès palustres potentiellement graves chez l'Homme (22) (23). Ce *Plasmodium* simien, présent en Asie du Sud-est a été mis en cause, depuis les années 2000, dans de nombreuses infections humaines aux Philippines, en Thaïlande, au Laos, en Chine et à Singapour. En 2008, trois cas de paludisme d'importation à *P.knowlesi* ont été diagnostiqués en Suède, Grande-Bretagne et aux Etats-Unis (23). En 2010, le CHU de Toulouse a mis en évidence le premier cas d'importation en France. A ce jour, seule la PCR permet de faire le diagnostic de cette espèce cytologiquement proche de *P. malariae* (23).

A l'échelle du praticien, médecin généraliste, urgentiste, les suspicions d'accès palustre restent rares. Une enquête de l'AFSSAPS montre qu'en 2004, sur 3341 laboratoires, 67% n'ont diagnostiqué aucun cas de paludisme et seulement 5% plus de 5 cas (24). Dans ces conditions, seule une attitude systématique, à savoir la recherche de plasmodies devant toute fièvre au retour depuis moins de 2 mois d'une zone d'endémie combinée à l'utilisation de techniques de diagnostic simples et performantes assurent une prise en charge optimale (23).

3.2.2.1 Pré-analytique

En cas de paludisme à *P. falciparum*, le pronostic vital du patient dépend directement de la rapidité d'administration par le soignant d'un traitement adapté et donc de la rapidité du diagnostic au laboratoire.

C'est pourquoi, devant un accès palustre potentiel, tous les moyens possibles doivent être mis en œuvre pour que le laboratoire rende au clinicien un résultat optimal dans les plus brefs délais.

3.2.2.1.1 Aide à la prescription

En pratique, le principal problème pouvant retarder le clinicien dans sa prise de décision de rechercher un paludisme est de savoir si le lieu où le patient symptomatique a séjourné est une zone d'endémie palustre et donc à risque.

Pour accompagner le médecin, nous avons établi une fiche d'aide à la prescription (*Illustration 12*) où les informations épidémiologiques données ne se veulent pas exhaustives mais ont pour but de mettre en évidence les principales situations au cours desquelles une recherche est indispensable.

L'autre intérêt de cette fiche est de préciser au prescripteur les modalités pré-analytiques à respecter afin que l'échantillon de sang parvienne dans les mains de la personne effectuant la recherche dans les plus brefs délais tout en respectant les conditions de conformité.

 <p>Parasitologie - Mycologie</p>	AIDE A LA PRESCRIPTION : Recherche directe de PALUDISME	PARA F1 P RES 001 A
		Date d'application: 01/02/2011

**DEVANT TOUTE FIEVRE AU RETOUR D'UN SEJOUR EN ZONE
D'ENDEMIIE**

**LA RECHERCHE DIRECTE DE PALUDISME DOIT ETRE EFFECTUEE EN
URGENCE**

- Prévenir le laboratoire de parasitologie de 8h à 17h au 53916 (après 17h prévenir le poste de garde de bactériologie au 56161).
- Donner au laboratoire les renseignements clinico-épidémiologiques concernant la durée du séjour,
 - le lieu de séjour,
 - la date de retour,
 - les signes cliniques associés,
 - la chimioprophylaxie (molécule, observance)
- Noter sur le bon ces renseignements, le nom et le n° de tél. du prescripteur
- Attention, le prélèvement devra être remis en main propre (prévenir le coursier)

Demander :

- « paludisme recherche directe » (frottis, goutte épaisse, antigénémie) (prélever 2 tubes EDTA)

La sérologie paludisme est inutile (souvent négative lors d'un accès palustre) sauf suspicion de paludisme viscéral évolutif ou pour le diagnostic rétrospectif d'une fièvre.

QUELLES SONT LES PRINCIPALES ZONES A RISQUE ?

Toute la ceinture intertropicale :

- AFRIQUE+++** (en ville comme à la campagne) : 90% des cas
- SUD EST ASIATIQUE**
- CONTINENT SUD AMERICAIN** (Amazonie surtout)
- MOYEN ORIENT (INDE)**

Territoires français : Guyane française et Mayotte

*Pour tout renseignement, appeler le laboratoire (53916) ou
http://www.invs.sante.fr/beh/2010/21_22/beh_21_22_2010.pdf*

3.2.2.1.2 Fiche de renseignements

Le dialogue entre le clinicien et le biologiste est essentiel au moment d'une recherche de paludisme. Certains renseignements cliniques, épidémiologiques et biologiques vont permettre au biologiste d'évaluer, avant même la phase analytique, le risque d'accès palustre et le cas échéant d'orienter son diagnostic d'espèce.

Le signe clinique majeur lors d'un accès palustre est la fièvre, elle est isolée dans 20% des cas (24) ou associée à d'autres symptômes peu spécifiques tels que des troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhées) ou un syndrome grippal (asthénie, céphalées, myalgie, toux). L'absence de fièvre est rare mais possible chez certains patients (24). De ce fait, devant tout symptôme chez un patient de retour d'un séjour en zone d'endémie, une recherche de paludisme devra être réalisée en urgence (12) (24).

Les renseignements épidémiologiques essentiels pour évaluer le risque de paludisme d'importation sont les pays où le patient a séjourné et la date de retour en France. En effet, plus de 90% des cas de paludisme d'importation sont consécutifs à un séjour dans un pays d'Afrique intertropicale, les cas restants sont pour la majorité d'entre eux contractés dans les autres zones intertropicales du globe. Le lieu de séjour permettra également d'aider le biologiste à faire un diagnostic d'espèce puisque *P. vivax* est présent en Asie, Amérique et Afrique de l'Est et *P. ovale* en Afrique de l'Ouest (22). En France, 97% des accès palustres à *P. falciparum* se manifestent dans les 2 premiers mois suivant le retour (22), ce qui rend peu probable (mais toujours envisageable) un accès au-delà de cette période. Pour les autres espèces, des accès peuvent survenir plus longtemps après le retour (jusqu'à plusieurs années pour *P. malariae*).

La notion de chimioprophylaxie est également importante dans l'approche diagnostique. En effet, lorsque celle-ci est inadaptée ou mal prise, une faible parasitémie pourra rendre compliquée la mise en évidence du parasite.

La thrombopénie, présente dans 60 à 85% des accès, est un argument diagnostique de taille à rechercher systématiquement.

Tous ces renseignements sont collectés dans une fiche (*Illustration 13*) remplie lors de chaque recherche de paludisme et qui sera conservée 18 mois.

Illustration 13 : Fiche de renseignements lors d'une recherche de paludisme

 <p>Parasitologie - Mycologie</p>	<p>RENSEIGNEMENTS à demander lors de la RECHERCHE du PALUDISME</p>	<p>PARA E1 P POSTA 010 A</p>
		<p>Date d'application: 01/02/2011</p>

Lors de toute demande de recherche de paludisme, téléphoner pour obtenir les renseignements indiqués sur la feuille jointe.

IDENTITE DU PATIENT :

IDENTITE DE L'INTERNE/BIOLOGISTE :

NOM : Prénom :

NOM :

Naissance : N° d'analyse :

Prénom :

Pays de résidence (12 derniers mois) :

Voyage : Pays :

Départ : .../.../....

Retour : .../.../....

Autres pays visités et date :

.....
.....

SYMPTOMES MOTIVANT LA DEMANDE :

SI FIEVRE, DATE : .../.../....

THROMBOPENIE : OUI / NON

CHIMIOPROPHYLAXIE :

Médicament :

Posologie :

Suivie 4 semaines après le retour : OUI / NON

COMMENTAIRES :

3.2.2.2 Analytique

3.2.2.2.1 Procédure et modes opératoires

La stratégie diagnostique doit répondre aux recommandations de la conférence nationale de consensus révisée en 2007 c'est à dire être réalisable 24 heures sur 24 et fournir une réponse en moins de 2 heures.

Idéalement, la recherche doit associer une technique microscopique de concentration : goutte épaisse rapide ou QBC[®] Malaria Test, dotée d'une très bonne sensibilité et un frottis mince qui assure une identification correcte des espèces (24). Les tests de diagnostic rapide se positionnent comme une technique de deuxième ligne (25).

L'avènement des techniques récentes de biologie moléculaire permet d'avoir une nouvelle approche diagnostique du paludisme grâce à un gain de sensibilité (seuil de 0,005 à 0,5 parasites/ μ L) et de spécificité (23) (26). Néanmoins, les techniques microscopiques avec concentration (goutte épaisse ou QBC[®]) restent les méthodes de choix pour le diagnostic d'urgence du paludisme de par leur rapidité d'exécution.

Un travail comparant la PCR aux techniques microscopiques dans le diagnostic du paludisme d'importation a analysé les données provenant de 15 études qui regroupaient 2416 sujets ; 1108 étaient positifs en microscopie et 1204 l'étaient par PCR, ce qui correspond à une sensibilité globale des méthodes microscopiques de 92% (23) (27).

Au CHU de Limoges, les données épidémiologiques de 2009 sont comparables aux données nationales avec 78% d'accès palustres à *P. falciparum* sur les 9 cas déclarés (2 accès à *P. vivax*) ; l'absence d'accès graves peut être attribuée à une prise en charge précoce.

La recherche de paludisme au laboratoire fait l'objet d'une procédure particulière d'urgence de jour comme de nuit pour laquelle nous avons réalisé un logigramme (*Illustration 16*) nous y associons la réalisation de 3 techniques :

- La lecture au microscope du frottis mince coloré au May-Grünwald-Giemsa avec une durée de coloration au Giemsa 10% de 5 minutes.
- La lecture au microscope de la goutte épaisse.
- 1 test commercialisé de diagnostic rapide (BinaxNow Malaria[®]) permettant la recherche d'antigènes de *Plasmodium* dans le sang.

Pour chacune de ces méthodes nous avons réactualisé, référencé les modes opératoires (*Illustrations 17, 18, 19*) puis procédé à leur évaluation en vue d'une validation.

Illustration 14 : Photographie d'un frottis mince avec 3 trophozoïtes de Plasmodium falciparum

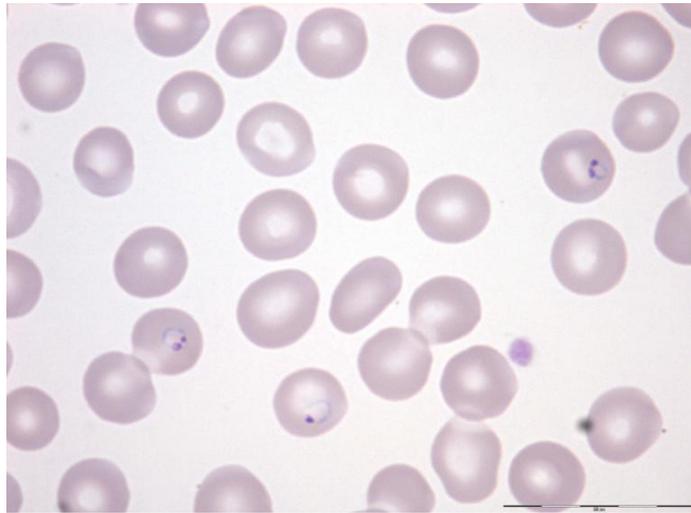


Illustration 15 : Photographie d'une goutte épaisse avec nombreux trophozoïtes de Plasmodium falciparum

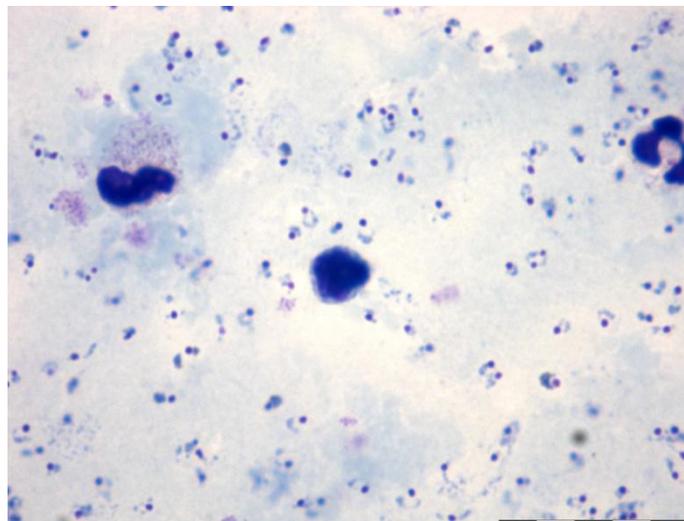
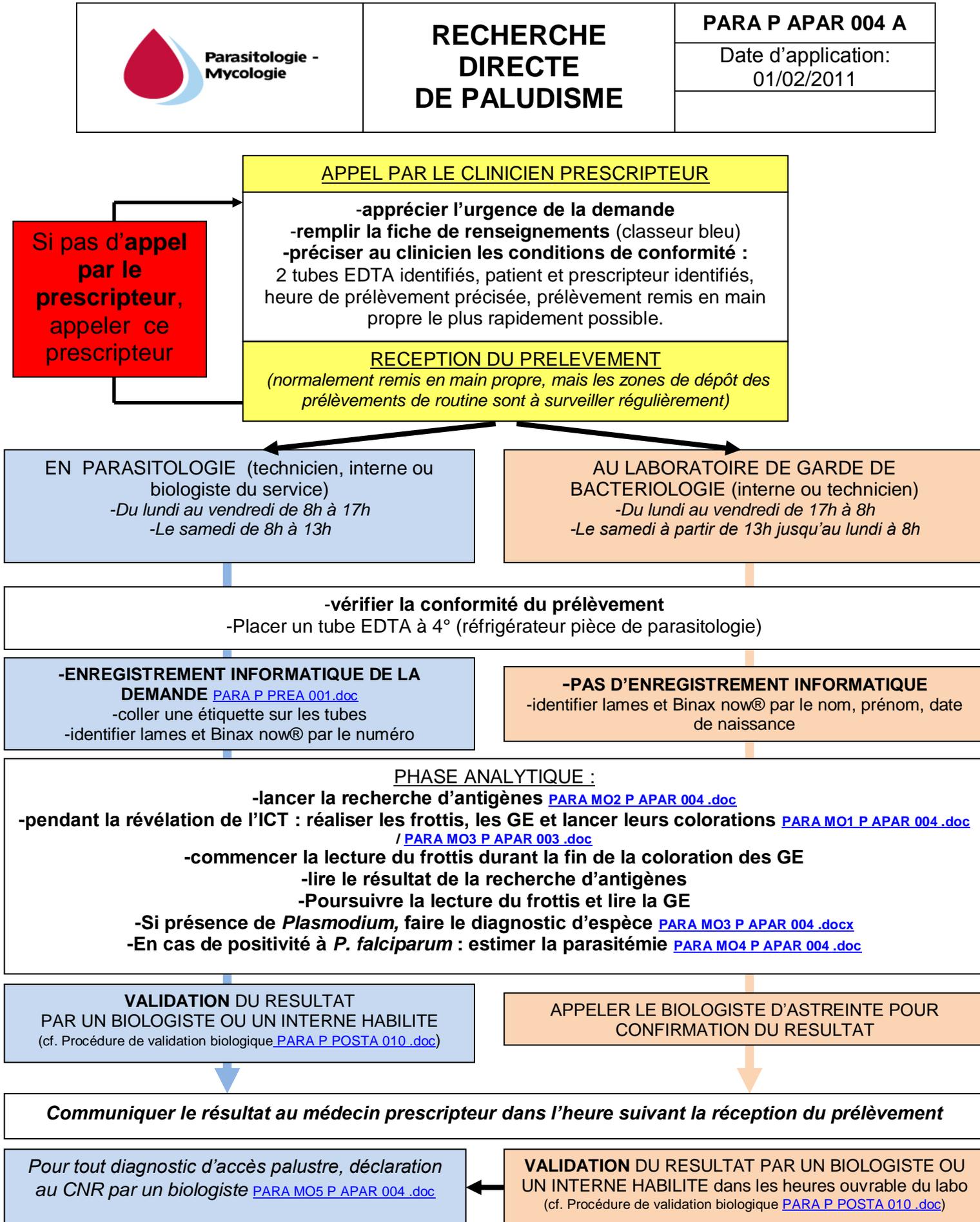


Illustration 16 : Procédure de recherche de paludisme (logigramme)



 <p>Parasitologie - Mycologie</p>	FROTTIS SANGUIN ET COLORATION COURTE AU MAY GRÜN WALD GIEMSA (MGG)	PARA MO1 P APAR 004 A
		Date d'application: 01/02/2011

INDICATIONS :

Recherche de paludisme

Prélèvement apporté rapidement au laboratoire du fait de l'urgence de l'examen, remis en main propre à un personnel du laboratoire, accompagné d'une demande avec renseignements épidémiologiques et cliniques (voyage, date du retour, chimioprophylaxie, fièvre ...)

MATERIEL :

Pour la réalisation du frottis mince :

- Lames à bords rodés et plage dépolie
- Lamelles 22X32
- Micropipette réglable de 0 à 20 µL et embouts adaptés
- Gants en latex

Pour la réalisation de la coloration de MGG :

- Boîtes de pétri avec chevalets pour support de lames
- Dispositif d'aspiration de 3mL et de 1mL
- Tube plastique 15mL pour réaliser la dilution

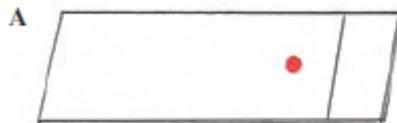
REACTIFS :

- May-Grünwald à température ambiante au dessus de la paillasse de parasitologie
- Giemsa à température ambiante au dessus de la paillasse de parasitologie
- PBS conservé dans le réfrigérateur du secteur de parasitologie
- Alcool ménager

TECHNIQUE :

Réalisation du frottis sanguin mince :

- Ecrire sur la plage dépolie (au crayon à papier) le nom du patient, la date et l'heure ou le numéro d'analyse si le demande a été enregistré dans le logiciel du laboratoire
- Mettre les gants
- Dégraisser la lame à l'alcool
- Après avoir mélangé le tube EDTA par 5 retournements successifs, déposer 2 µL de sang à côté du bord dépoli de la lame, en évitant la formation de bulles (A)

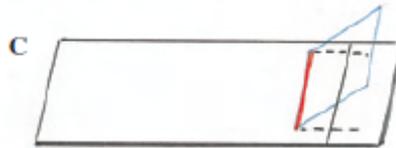


- Poser le petit bord de la lamelle au contact de la lame, à gauche de la goutte de sang, l'angle formé à droite étant de 45° environ pour un frottis mince(B) ; plus l'angle est petit, plus le frottis est mince. Maintenir cet angle et le contact avec une légère pression jusqu'à la fin de l'opération (inverser pour les gauchers)

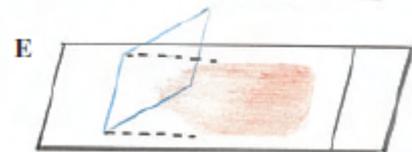
Rq : lors d'une recherche de filariose, de leishmaniose ou de trypanosomose, réaliser un frottis plus épais.



- Faire glisser la lamelle vers la goutte de sang, à son contact il se répartit régulièrement par capillarité le long du bord de la lamelle (C)



- Faire glisser alors la lamelle vers la gauche, jusqu'au bout, d'un mouvement assez lent et régulier en maintenant le contact et la pression nécessaire pour que le sang s'étale en une couche mince, uniforme derrière la lamelle (D). Un bon frottis est contenu entièrement dans la lame (bords et franges) (E)



- **Sécher immédiatement** en agitant à l'air par des mouvements d'éventail vifs

ASPECTS POSSIBLES DU FROTTIS



Frottis trop long et trop épais. La goutte de sang a été trop grosse.



Frottis trop long et trop épais. La goutte de sang est trop grosse, et la lamelle trop large.



Frottis effiloché. Mauvais contact de la lamelle sur la lame.



Bon frottis.

 Parasitologie - Mycologie	FROTTIS SANGUIN ET COLORATION COURTE AU MAY GRÜNWARD GIEMSA (MGG)	PARA MO1 P APAR 004 A
		Date d'application: 01/02/2011

Coloration du frottis :

Coloration MGG courte (cf. Validation de la technique de recherche de paludisme [PARA P APAR 014 A.doc](#)), cette méthode est utilisée dans la recherche de paludisme :

La coloration s'effectue sur les lames déposées sur des baguettes dans des boîtes de Pétri. Recouvrir complètement les lames avec les différents réactifs déposés à l'aide des dispositifs d'aspiration :

- May Grunwald (MG) : **2 minutes** (1,5mL)
- Pendant ce temps d'attente, préparer une dilution de Giemsa à 10% dans un tube plastique de 15mL (1mL de Giemsa dans 9mL de PBS).
- Ajouter sur le MG 1,5mL de **PBS** : **1 minute**
- Rejeter le colorant MG + PBS, dans la boîte à coloration mais ne pas rincer la lame.
- Déposer le **Giemsa à 10%** : **5 minutes** (2,5mL)
- Rincer longuement à l'eau courante.
- Essuyer l'arrière des lames avec du papier absorbant imbibé d'alcool ménagé dilué
- Sécher en appliquant du papier absorbant sur les frottis (sans frotter)
- Finir de sécher les lames par des mouvements d'éventail.
- Examiner au microscope à immersion avec l'objectif 100.

La coloration **MGG longue (cf. PARA MO2 P APAR 003 A)** s'effectue de la même façon, mais le temps de pose du Giemsa dilué est de 20 mn.

Cette méthode est utilisée pour les parasites plus difficilement colorables (recherche de filariose, recherche de leishmaniose viscérale, recherche de Trypanosomoses...) ou pour des recherches mycologiques.

LECTURE :

- Vérifier la qualité de la coloration: absence de tâches, couleur rose/orangée des hématies, coloration en violet des noyaux des polynucléaires et des lymphocytes, petites granulations violettes des neutrophiles, grosses granulations roses des éosinophiles. En cas de mauvaise qualité, réaliser un nouveau frottis mince coloré.
- En cas de recherche de paludisme et/ou de babésiose, lire le frottis avec une goutte d'huile à immersion au grossissement 100 (200 champs minimum). Cette lecture doit se faire en priorité dans une zone où les hématies sont bien étalées et séparées afin de mettre en évidence les trophozoïtes et/ou gamétocytes et/ou schizontes.
- En cas de recherche de microfilaires, lire la totalité du frottis au grossissement 10 (sans oublier les franges).

REFERENCES :

Cahier de formation biologie médicale BIOFORMA N°23, parasites sanguins, Décembre 2001
Y. J. Golvan, P. Ambroise-Thomas, LES NOUVELLES TECHNIQUES EN PARASITOLOGIE, 1984, FLAMMARION

 <p>Parasitologie - Mycologie</p>	REALISATION ET COLORATION DE GOUTTE EPAISSE	PARA MO3 P APAR 003 A
		Date d'application: 01/02/2011

INDICATIONS :

Recherche de paludisme

Recherche de filariose

Recherche de babésiose

Recherche réalisée sur tube de sang total EDTA

MATERIEL :

- Lames à bords rodés et plage dépolie
- Boîtes de Pétri avec chevalets pour support de lame
- Dispositifs d'aspiration de 3mL et de 1mL
- Micropipette réglable de 0 à 20µL et embouts adaptés
- Tubes Plastique 15mL
- Tubes à hémolyse
- Bécher
- Sèche cheveux
- Platine chauffante (pièce de parasitologie)
- Gants

REACTIFS :

- Giemsa à température ambiante au dessus de la paillasse de parasitologie
- PBS conservé dans le réfrigérateur du secteur de parasitologie
- Saponine à 2% dans de l'eau physiologique. Des aliquotes de 500 µL en tubes à hémolyse sont stockés à 4°C (conservation 1 an). Une réserve est au congélateur (même réfrigérateur à -20°C (tiroir n°2) (conservation : 2 ans).

TECHNIQUE :

Réalisation de la goutte épaisse :

- Mettre les gants.
- Ecrire sur la plage dépolie le nom du patient, la date et l'heure ou le numéro d'analyse si la demande a déjà été enregistrée dans le logiciel du laboratoire.
- Déposer 15 µL de sang au 1/3 de 2 lames à bords rodés et plage dépolie.
- Etaler en tournant avec le coin d'une autre lame ou lamelle 22x32 de façon à obtenir une tache d'environ 1 cm de diamètre.
- Mettre aussitôt à sécher sur une platine chauffante réglée à 46°C pendant 3-4 minutes. Retirer la lame dès que l'évaporation est terminée.



Coloration de la goutte épaisse :

La coloration s'effectue à plat sur les lames déposées sur des baguettes dans des boîtes de Pétri.

- Préparer (dans un tube plastique de 15mL) 10mL de colorant de Giemsa dilué au 1/10 ème dans le PBS
- Y ajouter 5 gouttes de saponine (gouttes d'environ 25µL).
- Recouvrir complètement chaque lame avec cette solution et laisser colorer pendant 20 minutes.

- Rincer précautionneusement dans un b cher avec de l'eau déminéralisée : plonger la lame dans l'eau, l'y laisser le temps que le colorant soit éliminé. Renouveler l'eau 1 fois si besoin
- Sécher en dirigeant le sèche-cheveux sur l'arrière de la lame.

LECTURE :

- La goutte doit être bien sèche.
- Lire au microscope optique au grossissement x10 (recherche de microfilaries) et x100 avec une goutte d'huile à immersion (recherche de protozoaires sanguicoles).
- Vérifier la qualité de la coloration par la présence de lymphocytes et de polynucléaires colorés en violet et l'absence de tâches, le fond doit être rose pale.
- Rechercher la présence de trophozoïtes et/ou gamétocytes et/ou schizontes ou de microfilaries selon la recherche.
- Lire au minimum 200 champs.

REFERENCES :

Brenier-Pinchart MP, Pinel C, Grillot R et Ambroise-Thomas P. Le diagnostic du paludisme dans les régions non endémiques : valeurs, limites et complémentarité des méthodes actuelles. Ann Biol Clin 2000 ;58 :310-15

Y. J. Golvan, P. Ambroise-Thomas, « LES NOUVELLES TECHNIQUES EN PARASITOLOGIE », 1984, FLAMMARION.

 Parasitologie - Mycologie	RECHERCHE D'ANTIGENES BinaxNow Malaria®	PARA MO2 P APAR 004 A
		Date d'application: 01/02/2011

INDICATIONS :

Diagnostic du paludisme

La recherche s'effectue à partir de sang sur tube EDTA (bouchon violet)

MATERIEL :

- micropipette réglable de 0 à 20 µL et embouts adaptés (secteur de parasitologie)

REACTIFS :

- coffret Binax now® Malariae (conservé à température ambiante au dessus de la paillasse de parasitologie)

TECHNIQUE :

- **Sortir la carte** test de sa pochette juste avant de l'utiliser.
- Ouvrir la carte et la poser à plat sur la surface de travail.
- **Mélanger le tube de sang** par retournements successifs (6 fois).
- A l'aide de la pipette, déposer lentement **15 µL de sang total EDTA au niveau de la zone violette du buvard** (coté droit du dispositif).
- Mettre ensuite **2 gouttes du réactif contenu dans le petit flacon A sous la zone violette** (laisser la première goutte pénétrer avant d'ajouter la deuxième). Ne pas ajouter de réactif A directement sur le tampon violet.
- **Laisser migrer le sang lysé rouge le long de la bandelette** de test jusqu'à sa limite supérieure. Remarque : Si la migration du sang est bloquée à mi-chemin après 1 minute, ajouter une goutte de réactif A sous la zone violette de dépôt du sang.
- Juste avant que le sang n'atteigne la base du tampon blanc sur le haut de la bandelette, laisser tomber lentement **4 gouttes du réactif A sur le haut du coté gauche du dispositif.**
- **Retirer la protection adhésive** du bord droit du dispositif quand le sang arrive en haut de la bandelette test.
- **Refermer la carte** et bien appuyer le long du bord droit de la fenêtre de résultats.

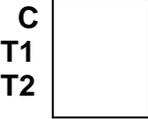
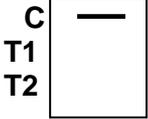
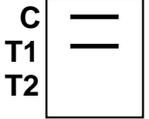
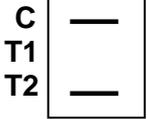
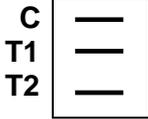
LECTURE :

La notice recommande la lecture du kit à 15 mn, cependant les bandes peuvent apparaître plus rapidement voire après 15 mn. Il est donc préférable de surveiller régulièrement la révélation du test (avant et après la lecture des lames).

Le résultat ne sera valide que si la bande C apparaît (bande contrôle).

L'interprétation se fera en fonction des résultats du frottis, de la goutte épaisse et du contexte épidémiologique [PARA P POSTA 010 .doc](#)

 Parasitologie - Mycologie	RECHERCHE D'ANTIGENES BinaxNow Malaria®	PARA MO2 P APAR 004 A
		Date d'application: 01/02/2011

				
Test non valide	Test négatif (Faux négatif possible)	Positif à <i>P. falciparum</i> (Faux positif possible)	Positif à <i>P. ovale</i> ou <i>P. vivax</i> ou <i>P. malariae</i> voire infection mixte (2 de ces espèces)	Positif à <i>P. falciparum</i> ou infection mixte

C : bande contrôle

T1 : met en évidence l'antigène HRP-2 spécifique de *P. falciparum*

T2 : met en évidence un antigène pan-plasmodique (aldolase)

La présence de toute ligne, même très faible, est à prendre en considération. Attention, la sensibilité du test dépend de l'espèce concernée et de la parasitémie. Des faux négatifs sont possibles (mutants HRP-2, faible parasitémie...) ainsi que des faux positifs (Facteur rhumatoïde...) ; se reporter à la notice du coffret.

REFERENCES :

Gabriella A. Farcas et Al., Evaluation of the Binax Now® ICT Test versus PCR and microscopy for the detection of Malaria in return travellers, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 69(6), 2003, pp. 589-592

ANNEXE :

Notice du coffret BinaxNow Malariae®

3.2.2.2.2 Validation des méthodes

Pour ces techniques qualitatives dont l'utilisation est recommandée par les sociétés savantes, une validation basée essentiellement sur la vérification bibliographique de leurs performances était envisageable (5). Les résultats de nos contrôles de qualité externes (AFSSAPS) pouvant suffire à prouver la compétence du laboratoire.

Cependant, nous avons estimé que ces contrôles externes de qualité (frottis sanguins colorés) permettaient de rendre compte du niveau d'expertise du microscopiste (élément déterminant dans la recherche du paludisme), mais ne prenaient pas en compte la sensibilité propre des techniques utilisées au laboratoire. Cette notion ne pouvant satisfaire notre volonté d'assurer au patient et au prescripteur la concordance de nos résultats avec les données de la littérature, nous avons décidé de procéder à une vérification initiale sur site plus approfondie.

Ceci répondant d'ailleurs à l'exigence du paragraphe 5.5.2 de la Norme :

" Les validations doivent être aussi approfondies que nécessaire pour répondre aux besoins de l'application ou du domaine d'application concerné(e).

La vérification continue sera basée sur la mise en place de contrôles internes de qualité (chapitre 3.2.2.2.3) et sur le suivi des contrôles externes AFSSAPS.

3.2.2.2.2.1 Vérification initiale sur site

- Echantillons inclus dans la vérification :

Notre vérification sur site a été réalisée à partir des 47 échantillons adressés au laboratoire pour recherche de paludisme du 01/01/2010 au 27/09/2010 et sur lesquelles ont été effectuées simultanément les 3 techniques (frottis mince, goutte épaisse, BinaxNow Malaria®).

Nous avons conclu, durant cette période, à **12 échantillons positifs** : 10 à *P. falciparum*, 1 à *P. ovale* et 1 à *P. malariae* (pour celui-ci, la recherche d'antigènes avec le BinaxNow Malaria® était négative).

D'autre part, **34 échantillons** avaient été rendus **négatifs** et **1 échantillon avait présenté des résultats discordants** avec des recherches microscopiques sur frottis et goutte épaisse

négatives mais une recherche d'antigènes positive. La sensibilité de la recherche d'antigènes étant inférieure à celle de la goutte épaisse, cette situation correspond à 2 hypothèses :

- Faux positif BinaxNow Malaria[®] possible en cas de présence de facteur rhumatoïde (23) (28).
- Patient traité pour accès palustre avec persistance d'antigènes dans le sang (jusqu'à 15 jours après) (23).

Il est évident que les renseignements cliniques et épidémiologiques sont alors indispensables. Pour ce cas précis, le patient, vivant en France et d'origine africaine, avait consulté aux urgences pour frissons (sans fièvre observée au moment de la consultation) 4 jours après son retour de Guinée ; le médecin urgentiste nous précise l'absence d'accès palustre et de traitement antérieurs. Dans ce contexte, le biologiste conseille au clinicien une surveillance par un contrôle biologique rapproché.

- Confirmation des résultats (méthode):

Le paludisme d'importation n'est pas une maladie à déclaration obligatoire, cependant le laboratoire procède à la déclaration systématique de chaque accès palustre au CNR de La Pitié-Salpêtrière à Paris ainsi qu'à l'envoi des échantillons positifs (frottis mince coloré, goutte épaisse et tube de sang total conservé à 4°C). Nos **12 échantillons positifs** (ainsi que le diagnostic d'espèce) ont donc pu être confirmés par cette procédure.

Pour confirmer nos **recherches négatives**, nous avons eu recours à 2 méthodes :

- Une méthode prospective basée sur le suivi des résultats d'autres examens biologiques réalisés en parallèle (hémoculture, ponction lombaire...) et prouvant l'implication d'un autre agent infectieux ou d'une autre étiologie dans la fièvre ; l'évolution clinique favorable du patient permettant ensuite d'éliminer l'hypothèse d'un accès palustre occulte associé et donc de considérer ces échantillons comme de vrais négatifs.
- Pour les échantillons n'ayant pu bénéficier de cette confirmation (absence d'autre examen biologique demandé par le clinicien, absence d'étiologie retrouvée), la congélation à -80°C des échantillons négatifs et de l'échantillon discordant a permis de procéder à leur envoi différé au laboratoire de parasitologie du CHU de Rangueil à Toulouse pour un contrôle par biologie moléculaire. Ce laboratoire est accrédité selon la Norme NF EN ISO 15189 et

la technique utilisée est la PCR LightCycler Roche® dont les performances sont optimales (23) (26).

Sur les 34 échantillons négatifs et l'échantillon discordant, un seul n'a pu être vérifié par aucune de ces 2 méthodes : le patient concerné, perdu de vue, n'ayant pas eu d'autre examen microbiologique et l'échantillon sanguin n'ayant pas été congelé. Il a donc été exclu de l'étude.

L'évaluation de la sensibilité, de la spécificité et de la corrélation entre les 3 techniques a ensuite été réalisée à partir des 46 échantillons retenus.

Recherches positives (Tableau 6) :

Tous nos envois au CNR du paludisme de La Pitié-Salpêtrière à Paris ont été confirmés avec un diagnostic d'espèce correct.

Sur ces 12 échantillons, les frottis et les gouttes épaisses ont été rendus tous positifs (d=12 vrais positifs) alors que la recherche d'antigènes était faussement négative (b=1) lors d'un accès à *P. malariae*.

Tableau 6 : Recherches de paludisme positives du 1^{er} janvier au 27 septembre 2010

Recherches de paludisme positives du 1^{er} janvier au 27 septembre 2010						
Dossier	FROTTIS	GOUTTE EPAISSE	BinaxNow®	conclusion	trophozoïtes/ µL	plaquettes G/L
100001010	positif	positif	négatif	<i>P. malariae</i>		109
100152128	positif	positif	positif	<i>P. falciparum</i>	12000	130
100187412	positif	positif	positif	<i>P. ovale</i>		ND
100194413	positif	positif	positif	<i>P. falciparum</i>	53000	48
100196356	positif	positif	positif	<i>P. falciparum</i>	40000	249
100218067	positif	positif	positif	<i>P. falciparum</i>	8000	169
100238390	positif	positif	positif	<i>P. falciparum</i>	80000	50
100242976	positif	positif	positif	<i>P. falciparum</i>	288	367
100257365	positif	positif	positif	<i>P. falciparum</i>	102000	48
100270971	positif	positif	positif	<i>P. falciparum</i>	27000	115
100279161	positif	positif	positif	<i>P. falciparum</i>	6000	121
100279844	positif	positif	positif	<i>P. falciparum</i>	48	240
			1 Faux Négatif			

Recherches négatives et recherche discordante (Tableaux 7 et 8):

L'enquête prospective a permis de retrouver **chez 16 patients** une autre étiologie imputable à la symptomatologie (pneumopathie, péritonite, salmonellose, réactivation EBV, cryptosporidiose, méningite à entérovirus, poussée lupique...).

Pour 7 autres patients, seule l'évolution clinique et biologique favorable en l'absence de traitement ont permis de confirmer les recherches négatives.

Les 11 échantillons restants, pour lesquels le contexte épidémiologique-clinique était très évocateur d'un accès palustre, ont été vérifiés par PCR au CHU de Rangueil à Toulouse :

- 10 ont été confirmés comme négatifs
- 1 était discordant (positif à *Plasmodium sp.* mais négatif avec les amorces spécifiques), il a été retenu comme positif ; il s'agissait de l'échantillon initialement discordant (frottis/goutte épaisse négatives/recherche d'antigènes positive). Un nouvel interrogatoire de ce patient a permis de révéler que les symptômes (fièvre...) avaient débuté avant son retour de Guinée et donné lieu à un traitement par un médicament local à base d'Artemisine expliquant ainsi la négativité de nos examens microscopiques.

Tableau 7 : Recherches de paludisme négatives du 1^{er} janvier au 27 septembre 2010

Recherches de paludisme négatives au CHU LIMOGES du 01 janvier au 27 septembre 2010					
Dossier	épidémiologie	motif	plaquettes G/L	étiologie finale/PCR	évolution clinique
100004720		fièvre	522		favorable
100010359		fièvre	526	pneumopathie	favorable
100041105		fièvre	316		favorable
100043294			342		favorable
100045950		fièvre	230	Plaie <i>S. aureus</i> +Pyo.	favorable
100061824		fièvre	40	<i>S. myéloprolifératif</i>	
100084478	retour<2 mois	cytolysé hépatique	157		favorable
100091710		fièvre	311		favorable
100102126	retour 1 an	convulsions		idiopathique	favorable
100106562	retour<2 mois	cytolysé hépatique	290	Hépatite B évolutive	favorable
100109613			225		favorable
100115601		fièvre	315	Poussée lupique	favorable
100125665		fièvre	529	Réactivation EBV	favorable
100128766	Algérie il y a 4 ans	anémie	363	Drépanocytose	
100129798	Algérie il y a 4 ans	anémie	363	Drépanocytose	
100132814	Mayotte il y a 7 mois	thrombopénie			favorable
100154912	Afrique du Nord	fièvre/douleurs abdo	186	pyélonéphrite	
100160679		fièvre/diarrhée	301	Lupus	favorable
100173214	Congo il y a 1 mois	fièvre	399	?	PERDU DE VUE
100180405	Madagascar il y a 8 mois	fièvre/abcès foie	287	Péritonite	favorable
100193381	Cameroun il y a 5j	fièvre/céphalées	165	Méningite entérovirus	favorable
100199947		fièvre/diarrhée	122	salmonellose	favorable
100205032	Mayotte il y a 4 ans	fièvre	515	péritonite	favorable
100212545	Guadeloupe	fièvre/thrombopénie	?	PCR-	
100213695	thaïlande	fièvre/myalgies	264	PCR-	
100220147	Brésil,balades+piqûres	fièvre	391	PCR-	
100223507	Congo il y a 1 semaine	céphalées	171	PCR-	
100225756	Cameroun il y a 3ans	fièvre/anémie	228	PCR-	
100234403	Niger	fièvre/diarrhée	407	PCR-	
100236669	Gabon durant 2 ans	convulsions (connu)	405	PCR-	
100238835	Inde	Fièvre	369	PCR-	
100240451	Burkina Faso il y a 3j	diarrhée+fièvre	400	Cryptosporidiose	favorable
100243442	vit Congo	fièvre intermittente	223	PCR-	
100269601	Guinée il y a 8 jours	fièvre/douleurs abdo	235	PCR-	

Tableau 8 : Résultat de paludisme discordant

Résultat discordant: Test rapide positif/frottis et Goutte épaisse négatifs					
100253994	Guinée il y a 6 jours	nausées	233	PCR +	fièvre

Au total, on disposait réellement de 33 échantillons non infectés ($M^- = 33$) et 13 échantillons infectés ($M^+ = 13$).

Concernant le frottis mince et la goutte épaisse, nous avons rendu 33 vrais négatifs ($a=33$) et 1 faux négatif ($b=1$ faux négatif dû au traitement). Pour le BinaxNow Malaria[®], nous avons rendu 33 vrais négatifs ($a=33$) et 1 faux négatif ($b=1$ faux négatif à *P. malariae*).

- Evaluation du seuil de détection (Tableau 9):

Le seuil de détection ne fait pas partie des éléments à évaluer pour la validation d'une méthode qualitative (5). Nous avons cependant choisi de l'aborder pour la recherche du paludisme où cette notion peut s'avérer importante au moment de la validation biologique d'un résultat.

Au cours de faibles parasitémies, il est possible que le frottis et/ou le test de diagnostic rapide soit négatifs. La goutte épaisse permet alors de rendre une parasitémie (souvent très faible) à partir du décompte du nombre de trophozoïtes pour 500 leucocytes et, par extrapolation, un nombre de trophozoïtes / μL de sang.

En travaillant à partir d'échantillons faiblement parasités, il est donc possible d'obtenir des valeurs seuils de positivité (en trophozoïtes / μL) pour chaque technique qui pourront ensuite être comparées aux données bibliographiques.

Sur nos 12 échantillons positifs à *Plasmodium*, 2 étaient faiblement parasités (48/μL et 288/μL). La surveillance biologique à J3 des patients traités pour accès à *P. falciparum* nous a permis d'obtenir d'autres échantillons faiblement parasités (48/μL, 77/μL, 13/μL et 160/μL).

Tableau 9 : Approche du seuil de détection grâce au suivi post-thérapeutique

Patients traités bénéficiant d'un suivi post thérapeutique à J3 du 1^{er} janvier au 27 septembre 2010					
Dossier	FROTTIS	GOUTTE EPAISSE	BinaxNow®	conclusion	Trophozoïtes / μL
100197565	négatif	positif	positif	<i>P. falciparum</i>	48
100219537	négatif	positif	Non fait	<i>P. falciparum</i>	77
100242014	négatif	positif	Non fait	<i>P. falciparum</i>	13
100259367	positif	positif	Non fait	<i>P. falciparum</i>	160

3.2.2.2.2 Interprétation des résultats

Frottis mince coloré au MGG et goutte épaisse :

Les **sensibilités diagnostiques** du frottis mince et de la goutte épaisse (probabilité que la recherche donne un résultat positif en présence de *Plasmodium*) sont dans cette vérification de **92%** ce qui est satisfaisant au regard des données de la littérature puisque la sensibilité d'un frottis mince coloré au MGG est de 70 à 80% (toutes parasitémiées confondues) (25). Elle sont d'ailleurs sous-estimées si on tient compte du fait que le seul faux négatif, pour ces deux techniques, présentait une parasitémie à la limite de détection en PCR causée par un traitement (cas rare en pratique).

L'analyse supplémentaire des résultats des échantillons faiblement parasités (suivi après 3 jours de traitement) met en évidence 3 frottis négatifs mais qui correspondent à des taux inférieurs au seuil de détection décrit dans la littérature (48, 77 et 13 parasites/μL pour un seuil de 100-300/μL) (23) ; on s'aperçoit de plus que 2 frottis ont permis de détecter des trophozoïtes pour des valeurs inférieures ou à la limite du seuil (48 et 160 parasites/μL). On remarque également que les gouttes épaisses sont positives alors que la densité parasitaire est proche du seuil de détection décrit dans la littérature (48, 77 et 13 parasites/μL pour un seuil de

10 à 20/ μ L) (23) (29) (30) (31) et que le frottis mince se négative. Nos techniques du frottis mince et de goutte épaisse présentent donc un seuil de détection satisfaisant.

Les **spécificités diagnostiques** du frottis et de la goutte épaisse (probabilité que la recherche donne un résultat négatif en l'absence du parasite) sont de **100%** ce qui est excellent.

Si on étudie la présence ou l'absence de parasite (hors suivi post-thérapeutique), la **concordance** entre le frottis mince et la technique de la goutte épaisse est de **100%**. La concordance entre le frottis mince et le BinaxNow Malaria[®] est de **96%**, tout comme celle entre la goutte épaisse et le BinaxNow Malaria[®]. Les causes de discordance sont acceptables puisqu'elles correspondent à un accès palustre à *P. malariae* non détecté par le BinaxNow Malaria[®] et à la présence d'un traitement instauré avant le diagnostic, à l'origine du frottis et de la goutte épaisse négatifs.

Au regard de ces résultats, nous pouvons conclure à la validité analytique du frottis mince et de la goutte épaisse.

BinaxNow Malaria[®] :

La **sensibilité diagnostique** du test BinaxNow Malaria[®] est de **92%** ce qui est satisfaisant au regard des données de la littérature car le seul faux négatif observé correspond à un accès à *P. malariae*, espèce pour laquelle le test est connu pour être peu performant (30). La **spécificité diagnostique** s'élève à 100% ce qui est excellent.

Si on étudie la présence ou l'absence de parasite (hors suivi post-thérapeutique), la **concordance** entre le BinaxNow Malaria[®] et les techniques microscopiques est de **96%** ; les discordances correspondent, pour un échantillon, à la mise en évidence de l'accès à *P. malariae* par le frottis et la goutte épaisse et, pour un autre échantillon, à la positivité du BinaxNow Malaria[®], en raison de la persistance d'antigènes dans le sang après traitement, alors que les parasites n'étaient plus détectables en microscopie. Ces discordances mettent surtout en évidence la complémentarité de nos techniques.

Au regard de ces résultats, nous pouvons conclure à la validité analytique du BinaxNow malaria[®].

D'après le guide GTA 04 (5), les résultats de la vérification doivent faire l'objet d'un document cohérent et clair, avec une acceptation formelle de la validité opérationnelle des techniques. Ce document doit comporter la présentation de la technique, la détermination des paramètres à vérifier, la détermination des objectifs à atteindre, la compilation et le traitement statistique des données obtenues et la décision quant à la validité opérationnelle de la technique.

Le document SH FORM 44, disponible sur le site du Cofrac, est destiné à servir de formulaire de présentation des résultats de validation de méthode qualitative (7).

Les illustrations suivantes (*Illustrations 20, 21 et 22*) ont donc été élaborées à partir des résultats obtenus, sur le modèle de ce formulaire.

Illustration 20 : Validation du frottis mince coloré au MGG dans la recherche de paludisme

LOGO Cofrac	FICHE DE VALIDATION du frottis sanguin mince coloré au May-Grünwald-Giemsa pour la recherche de paludisme (portée B étendue)	Référence : SH FORM 44 Indice de révision : 00 Date d'application : 15/04/11
------------------------	---	--

*Note : le laboratoire se référera au tableau du § 9.2.1 du Document Cofrac SH GTA 04 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B) et complétera **une fiche par examen de biologie médicale**.*

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE : Frottis sanguin mince coloré au May-Grünwald-Giemsa dans la recherche de paludisme
--

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande :	Trophozoïtes/gamétocytes/schizontes de <i>Plasmodium</i>
Principe de la Mesure :	Recherche directe du parasite dans les hématies par un microscopiste. L'étalement des hématies sur lame et la coloration de celle-ci au May-Grünwald-Giemsa permettent de visualiser et d'identifier les différentes espèces de <i>Plasmodium</i> .
Méthode de mesure :	Qualitative par recherche au microscope (objectif 100) au minimum 30 minutes par du personnel habilité
Marquage CE (Oui/Non)	Non (oui pour les réactifs)
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	

LOGO Cofrac	FICHE DE VALIDATION du frottis sanguin mince coloré au May-Grünwald-Giemsa pour la recherche de paludisme (portée B étendue)	Référence : SH FORM 44 Indice de révision : 00 Date d'application : 15/04/11
------------------------	--	--

MISE EN OEUVRE	
Opérateurs (Habilitation) :	Collet Jean-Philippe (interne niveau 2 habilité) Martin Michèle (technicienne) Internes habilités Biologistes
Procédure de validation :	<p>Le laboratoire procède à la déclaration systématique de chaque accès palustre au CNR de La Pitié-Salpêtrière à Paris ainsi qu'à l'envoi des échantillons positifs (frottis mince coloré, goutte épaisse et tube de sang total). Nos 12 échantillons positifs (ainsi que le diagnostic d'espèce) ont donc pu être confirmés par cette procédure.</p> <p>Pour confirmer nos recherches négatives, nous avons eu recours à 2 méthodes :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Une méthode prospective basée sur le suivi des résultats d'autres examens biologiques réalisés en parallèle (hémoculture, ponction lombaire...) et prouvant l'implication d'un autre agent infectieux ou d'une autre étiologie dans la fièvre ; l'évolution clinique favorable du patient permettant ensuite d'éliminer l'hypothèse d'un accès palustre occulte associé et donc de considérer ces échantillons comme de vrais négatifs. - Pour les échantillons n'ayant pu bénéficier de cette confirmation (absence d'autre examen biologique demandé par le clinicien, absence d'étiologie retrouvée...), la congélation à -80°C des échantillons négatifs et de l'échantillon discordant a permis de procéder à leur envoi différé au laboratoire de parasitologie du CHU de Rangueil à Toulouse pour un contrôle par biologie moléculaire (PCR LightCycler Roche®).
Procédure de gestion de la portée flexible :	
Période d'évaluation :	Du 01/01/2010 au 27/09/2010
Date de mise en service :	
Autorisation par :	

LOGO Cofrac	FICHE DE VALIDATION du frottis sanguin mince coloré au May-Grünwald-Giemsa pour la recherche de paludisme (portée B étendue)	Référence : SH FORM 44 Indice de révision : 00 Date d'application : 15/04/11
------------------------	---	--

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs :	Sang sur tube EDTA	Manuel de prélèvement, catalogue des analyses, aide à la prescription, gestion des non conformités
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Confection d'un frottis sanguin mince	Mode opératoire, habilitation
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	Techniciens, internes, biologistes	Procédures d'habilitation
Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,...) :	-Respect des temps de fixation/coloration -Conditions de coloration : pH 7,2 à 7,4 -Zone de lecture au calme	-Fixation/coloration chronométrées -Utilisation de tampon PBS -Aménagement des locaux
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	-May-Grünwald Biolyon® FR09766 -Giemsa Biolyon® FR09265	Marqués CE Contrôle interne (témoin positif) PARA MO1 P QUA 011 A
Matériau de références (témoins) :	Qualité de la coloration	Coloration des hématies et leucocytes Contrôles internes positifs
Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	Micropipette réglable (0 à 20µL) Microscopes	Maintenance

* item à renseigner si nécessaire

LOGO Cofrac	FICHE DE VALIDATION du frottis sanguin mince coloré au May-Grünwald-Giemsa pour la recherche de paludisme (portée B étendue)	Référence : SH FORM 44 Indice de révision : 00 Date d'application : 15/04/11
------------------------	--	--

COMPARAISON DE METHODES	
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire :	Goutte épaisse et BinaxNow Malaria®
Nombre de mesures :	46
Descriptif de l'échantillon étudié :	13 échantillons infectés et 33 non infectés
Méthode d'exploitation des résultats (études des concordances) :	Pourcentage de résultats identiques (présence ou absence)
Résultats et interprétations des discordances :	<p>La concordance entre le frottis et la technique de la goutte épaisse est de 100%.</p> <p>La concordance entre le frottis et le BinaxNow Malaria® est de 96%.</p> <p>Les causes de discordance sont acceptables puisqu'elles correspondent à un accès palustre à <i>P. malariae</i> non détecté par le BinaxNow Malaria® et à la présence d'un traitement instauré avant le diagnostic et à l'origine de la persistance d'antigènes dans le sang et d'un frottis négatif.</p>
Conclusions et dispositions :	<p>Ces discordances sont en accord avec les données bibliographiques (études indépendantes et fournisseur BinaxNow Malaria®).</p> <p>Elles mettent surtout en évidence la complémentarité de nos 3 techniques qui sont toujours réalisées conjointement.</p>

ROBUSTESSE	
Données bibliographiques :	Non applicable
Résultats :	Non applicable
Conclusions et dispositions :	Non applicable

STABILITE	
Données bibliographiques :	Non applicable
Résultats :	Non applicable
Conclusions et dispositions :	Non applicable

Commentaires éventuels :

A partir du suivi post-thérapeutique à J3 de certains patients nous avons également tenté d'évaluer le seuil de détection (parasites/ μ L) en comparaison avec la goutte épaisse (voir résultats).

Illustration 21 : Validation de la goutte épaisse dans la recherche de paludisme

LOGO Cofrac	FICHE DE VALIDATION de la goutte épaisse pour la recherche de paludisme (portée B étendue)	Référence : SH FORM 44 Indice de révision : 00 Date d'application : 15/04/11
------------------------	--	--

*Note : le laboratoire se référera au tableau du § 9.2.1 du Document Cofrac SH GTA 04 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B) et complétera **une fiche par examen de biologie médicale**.*

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE :
Goutte épaisse colorée au Giemsa dans la recherche de paludisme

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande :	Trophozoïtes/gamétocytes de <i>Plasmodium</i>
Principe de la Mesure :	Recherche directe du parasite par un microscopiste. La confection d'une goutte épaisse sur lame puis la lyse des hématies avec de la saponine permettent de concentrer les parasites ; la coloration au Giemsa permet la visualisation de trophozoïtes libres voire de gamétocytes. La différenciation des espèces de Plasmodium est possible mais demande une grande expérience.
Méthode de mesure :	Qualitative par recherche au microscope (objectif 100) au minimum 30 minutes (ou 200 champs) par du personnel habilité Le microscopiste recherche des trophozoïtes à partir de leur noyau violet et de leur cytoplasme bleu, ils peuvent prendre plusieurs formes (« parachute », « point d'exclamation » ou « annulaire ») ; des gamétocytes peuvent aussi être observés.
Marquage CE (Oui/Non)	Non (oui pour les réactifs)
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	

LOGO Cofrac	FICHE DE VALIDATION de la goutte épaisse pour la recherche de paludisme (portée B étendue)	Référence : SH FORM 44 Indice de révision : 00 Date d'application : 15/04/11
------------------------	--	--

MISE EN OEUVRE	
Opérateurs (Habilitation) :	Collet Jean-Philippe (interne niveau 2 habilité) Martin Michèle (technicienne) Internes habilités Biologistes
Procédure de validation :	<p>Le laboratoire procède à la déclaration systématique de chaque accès palustre au CNR de La Pitié-Salpêtrière à Paris ainsi qu'à l'envoi des échantillons positifs (frottis coloré, goutte épaisse et tube de sang total). Nos 12 échantillons positifs (ainsi que le diagnostic d'espèce) ont donc pu être confirmés par cette procédure.</p> <p>Pour confirmer nos recherches négatives, nous avons eu recours à 2 méthodes :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Une méthode prospective basée sur le suivi des résultats d'autres examens biologiques réalisés en parallèle (hémoculture, ponction lombaire...) et prouvant l'implication d'un autre agent infectieux ou d'une autre étiologie dans la fièvre ; l'évolution clinique favorable du patient permettant ensuite d'éliminer l'hypothèse d'un accès palustre occulte associé et donc de considérer ces échantillons comme de vrais négatifs. - Pour les échantillons n'ayant pu bénéficier de cette confirmation (absence d'autre examen biologique demandé par le clinicien, absence d'étiologie retrouvée...), la congélation à -80°C des échantillons négatifs et de l'échantillon discordant a permis de procéder à leur envoi différé au laboratoire de parasitologie du CHU de Rangueil à Toulouse pour un contrôle par biologie moléculaire (PCR LightCycler Roche®).
Procédure de gestion de la portée flexible :	
Période d'évaluation :	Du 01/01/2010 au 27/09/2010
Date de mise en service :	
Autorisation par :	

LOGO Cofrac	FICHE DE VALIDATION de la goutte épaisse pour la recherche de paludisme (portée B étendue)	Référence : SH FORM 44 Indice de révision : 00 Date d'application : 15/04/11
------------------------	--	--

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs :	Sang sur tube EDTA	Manuel de prélèvement, catalogue des analyses, aide à la prescription, gestion des non conformités
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Confection de la goutte	Mode opératoire, habilitation
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	Techniciens ou internes	Procédures d'habilitation
Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,...) :	-Respect du temps de coloration -Rinçage -Zone de lecture au calme	-Coloration chronométrées -Rinçage dans un béccher adapté -Aménagement des locaux
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	-Giemsa Biolyon® FR09265 -Saponine S 2149	Marqués CE Contrôle interne (témoin positif) PARA MO1 P QUA 011 A
Matériau de références (témoins) :	Qualité de la coloration	Contrôle de l'absence de tâches Contrôle des leucocytes
Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	Micropipette réglable (0 à 20µL) Microscopes	Maintenance

* item à renseigner si nécessaire

LOGO Cofrac	FICHE DE VALIDATION de la goutte épaisse pour la recherche de paludisme (portée B étendue)	Référence : SH FORM 44 Indice de révision : 00 Date d'application : 15/04/11
------------------------	--	--

COMPARAISON DE METHODES	
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire :	Frottis sanguin mince coloré au MGG et BinaxNow Malaria®
Nombre de mesures :	46
Descriptif de l'échantillon étudié :	13 échantillons infectés et 33 non infectés
Méthode d'exploitation des résultats (études des concordances) :	Pourcentage de résultats identiques (présence ou absence)
Résultats et interprétations des discordances :	<p>La concordance entre la technique de la goutte épaisse et celle du frottis est de 100%.</p> <p>La concordance entre la goutte épaisse et le Binax Now Malaria® est de 96%.</p> <p>Les causes de discordance sont acceptables puisqu'elles correspondent à un accès palustre à <i>P. malariae</i> non détecté par le Binax et à la présence d'un traitement instauré avant le diagnostic et à l'origine de la persistance d'antigènes dans le sang et d'une goutte épaisse négative.</p>
Conclusions et dispositions :	<p>Ces discordances sont en accord avec les données bibliographiques (études indépendantes et fournisseur BinaxNow Malaria®).</p> <p>Elles mettent surtout en évidence la complémentarité de nos 3 techniques qui sont toujours réalisées conjointement.</p>

ROBUSTESSE	
Données bibliographiques :	Non applicable
Résultats :	Non applicable
Conclusions et dispositions :	Non applicable

STABILITE	
Données bibliographiques :	Non applicable
Résultats :	Non applicable
Conclusions et dispositions :	Non applicable

Commentaires éventuels :

A partir du suivi post-thérapeutique à J3 de certains patients nous avons également tenté d'évaluer le seuil de détection (nombre de parasites/ μ L) (voir résultats) ces résultats confirment la sensibilité supérieure de la goutte épaisse.

LOGO Cofrac	FICHE DE VALIDATION du BinaxNow Malaria® pour la recherche de paludisme (portée A standard)	Référence : SH FORM 44 Indice de révision : 00 Date d'application : 15/04/11
------------------------	---	---

*Note : le laboratoire se référera au tableau du § 9.2.1 du Document Cofrac SH GTA 04 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B) et complétera **une fiche par examen de biologie médicale**.*

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE :
BinaxNow Malaria®

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande :	Antigène spécifique de <i>Plasmodium falciparum</i> (HRP-II) et un antigène pan-spécifique: aldolase (commun à toutes les espèces de <i>Plasmodium</i>).
Principe de la Mesure :	Test immuno-chromatographique utilisant des anticorps monoclonaux immobilisés sur une membrane permettant de détecter, dans des échantillons de sang total, un antigène spécifique de <i>Plasmodium falciparum</i> (HRP-II) et/ou un antigène pan-spécifique : l'aldolase (commun à toutes les espèces de <i>Plasmodium</i>).
Méthode de mesure :	<p>Qualitative par lecture visuelle</p> <p>La lecture doit se faire 15 minutes après fermeture du kit. Tout résultat devra être validé par l'apparition de la ligne de contrôle (C).</p> <p>La présence de toute ligne de test même très faible indique un résultat positif.</p>
Marquage CE (Oui/Non)	oui
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	

LOGO Cofrac	FICHE DE VALIDATION du BinaxNow Malaria® pour la recherche de paludisme (portée A standard)	Référence : SH FORM 44 Indice de révision : 00 Date d'application : 15/04/11
------------------------	---	--

MISE EN OEUVRE	
Opérateurs (Habilitation) :	Collet Jean-Philippe (interne niveau 2 habilité) Martin Michèle (technicienne) Internes habilités Biologistes
Procédure de validation :	<p>Le laboratoire procède à la déclaration systématique de chaque accès palustre au CNR de La Pitié-Salpêtrière à Paris ainsi qu'à l'envoi des échantillons positifs (frottis mince coloré, goutte épaisse et tube de sang total). Nos 12 échantillons positifs (ainsi que le diagnostic d'espèce) ont donc pu être confirmés par cette procédure.</p> <p>Pour confirmer nos recherches négatives, nous avons eu recours à 2 méthodes :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Une méthode prospective basée sur le suivi des résultats d'autres examens biologiques réalisés en parallèle (hémoculture, ponction lombaire...) et prouvant l'implication d'un autre agent infectieux ou d'une autre étiologie dans la fièvre ; l'évolution clinique favorable du patient permettant ensuite d'éliminer l'hypothèse d'un accès palustre occulte associé et donc de considérer ces échantillons comme de vrais négatifs. - Pour les échantillons n'ayant pu bénéficier de cette confirmation (absence d'autre examen biologique demandé par le clinicien, absence d'étiologie retrouvée...), la congélation à -80°C des échantillons négatifs et de l'échantillon discordant a permis de procéder à leur envoi différé au laboratoire de parasitologie du CHU de Rangueil à Toulouse pour un contrôle par biologie moléculaire (PCR LightCycler Roche®).
Procédure de gestion de la portée flexible :	
Période d'évaluation :	Du 01/01/2010 au 27/09/2010
Date de mise en service :	
Autorisation par :	

LOGO Cofrac	FICHE DE VALIDATION du BinaxNow Malaria® pour la recherche de paludisme (portée A standard)	Référence : SH FORM 44 Indice de révision : 00 Date d'application : 15/04/11
------------------------	---	---

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs :	Sang sur tube EDTA	Manuel de prélèvement, catalogue des analyses, aide à la prescription, gestion des non conformités
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :		Mode opératoire, habilitation
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	Techniciens ou internes	Procédures d'habilitation
Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,...) :	-Conservation à température ambiante -Respect du délai de 15 mn -Bon éclairage lors de la lecture	-Conservation à température ambiante -Révélation chronométrées
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	REF 660-000	Marqué CE
Matériau de références (témoins) :	Ligne de contrôle	Si absente, test non valide
Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	Micropipette réglable (0 à 20µL) Microscopes	Maintenance

* item à renseigner si nécessaire

LOGO Cofrac	FICHE DE VALIDATION du BinaxNow Malaria [®] pour la recherche de paludisme (portée A standard)	Référence : SH FORM 44 Indice de révision : 00 Date d'application : 15/04/11
------------------------	---	--

COMPARAISON DE METHODES	
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire :	Frottis sanguin mince coloré au MGG et goutte épaisse
Nombre de mesures :	46
Descriptif de l'échantillon étudié :	13 échantillons infectés et 33 non infectés
Méthode d'exploitation des résultats (études des concordances) :	Pourcentage de résultats identiques (présence ou absence)
Résultats et interprétations des discordances :	<p>La concordance du BinaxNow Malaria[®] avec le frottis est de 96%. La concordance du BinaxNow Malaria[®] avec la goutte épaisse est de 96%.</p> <p>Les causes de discordance sont acceptables puisqu'elles correspondent à un accès palustre à <i>P. malariae</i> non détecté par le Binax (espèce pour laquelle le test est peu performant) et à la présence d'un traitement instauré avant le diagnostic et à l'origine de de recherches microscopiques négatives avec persistance d'antigènes dans le sang.</p>
Conclusions et dispositions :	<p>Ces discordances sont en accord avec les données bibliographiques (études indépendantes et fournisseur BinaxNow Malaria[®]).</p> <p>Elles mettent surtout en évidence la complémentarité de nos 3 techniques qui sont toujours réalisées conjointement.</p>

ROBUSTESSE	
Données bibliographiques :	Non applicable
Résultats :	Non applicable
Conclusions et dispositions :	Non applicable

STABILITE	
Données bibliographiques :	oui
Résultats :	Non applicable
Conclusions et dispositions :	Non applicable

3.2.2.2.3 Contrôles internes de qualité

Le contrôle qualité constitue la validation continue du processus analytique et fait suite à la validation initiale de la méthode (5) (6). Il doit s'envisager en fonction des différents contextes auxquels est confronté le biologiste ainsi que des différentes spécialités de la Biologie Médicale. Sa mise en œuvre doit être simple, assurer une sécurité nécessaire et suffisante, à un coût raisonnable, être rapide dans la détection des anomalies, sans alerte inutile (6).

La difficulté concernant ces méthodes qualitatives qui recherchent des pathologies relativement rares est de disposer d'échantillons parasitologiques « vrais ». Ceci ne permet donc pas d'envisager un contrôle qualité avec des fréquences comparables à celles des analyses à résultats quantitatifs. En France, en l'absence de recommandations, le choix de la périodicité du contrôle est du ressort du biologiste (6). Pour la parasitologie, des frottis chargés en parasites peuvent être utilisés.

Les contrôles externes AFSSAPS permettent d'évaluer la compétence du microscopiste sans toutefois rendre compte de la capacité de nos réactifs à mettre en évidence le parasite puisqu'ils sont basés sur la lecture d'un frottis sanguin déjà coloré au MGG. Nous nous sommes donc efforcés de mettre en place des contrôles internes capables de valider notre coloration MGG.

Deux problèmes majeurs étaient à prendre en compte ; tout d'abord la faible incidence des accès palustres à Limoges et la durée de vie limitée des trophozoïtes dans les échantillons de sang total.

Le seul moyen de conserver des contrôles positifs non colorés est de fixer au méthanol des frottis de sang impaludé puis de les stocker à -80°C. Cette méthode est directement accessible sur le site du CDC Dpdx (15) à partir duquel nous avons mis en place un mode opératoire de préparation des contrôles internes (*Illustration 23*). Il paraît logique de réaliser un contrôle interne lors de chaque changement de flacon de MGG ou pour tout problème remettant en cause la qualité de la coloration. Le suivi de ces contrôles est notifié dans la fiche du réactif.

 Parasitologie - Mycologie	PREPARATION DES CONTROLES QUALITE INTERNES PALUDISME POUR COLORATION MGG	PARA MO1 P QUA 011 A
		Date d'application: 01/02/2011
		Page 117 sur 187

INDICATIONS :

Contrôle qualité de chaque nouveau flacon de colorant dans le cadre de la vérification continue des méthodes de recherche directe de paludisme.

Vérification technique décidée par le biologiste.

*Ce mode opératoire décrit la réalisation et la conservation de frottis sanguins positifs aux différentes espèces de **Plasmodium**.*

MATERIEL :

- sang EDTA d'un patient positif à *Plasmodium*
- lames à bord dépoli
- lamelles

REACTIFS :

- méthanol pur

TECHNIQUE :

- Sélectionner le sang EDTA (prélèvement < 1h) d'un patient positif à une espèce de *Plasmodium* ; la recherche de paludisme devra avoir permis de mettre en évidence au moins 1 trophozoïte tous les 2 à 3 champs.
- Noter l'espèce plasmodiale et la parasitémie sur chaque lame.
- Faire autant de frottis sanguins que nécessaires cf **PARA MO1 P APAR 004 A.doc**
- Faire sécher les frottis à température ambiante en les aérant (comme un éventail).
- Fixer les frottis par trempage dans du méthanol à 100% et laisser sécher.
- Conserver les lames à -80°C dans la boîte réservée à cet effet (située dans le congélateur 1BHFR 08 :3 porte en partant du haut, tiroir du milieu à droite).
- Avant utilisation, sortir une lame et laisser évaporer la condensation.

LECTURE :

- Vérifier, après coloration cf **PARA MO1 P APAR 004 A.doc**, la positivité de la lame pour valider les colorants et remplir la fiche réactif MGG.

REFERENCES :

http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/PDF_Files/malaria_staining_benchaid.pdf

3.2.2.2.4 Evaluation externe de la qualité

3.2.2.2.4.1 Contrôles AFSSAPS

L'évaluation externe de la qualité de notre recherche directe de paludisme s'appuie sur la réalisation et le suivi des contrôles AFSSAPS.

Par le biais de frottis minces colorés, le paludisme est la parasitose sanguine la plus souvent abordée au cours de ces contrôles. C'est alors la capacité du personnel à mettre en évidence le parasite au microscope, à faire un diagnostic d'espèce et à estimer une parasitémie qui est évaluée. L'exploitation des résultats depuis 2000 n'a révélé aucune erreur concernant la mise en évidence de *Plasmodium* et le diagnostic d'espèce.

Tableau 10 : Résultats des contrôles externes AFSSAPS (frottis minces)

ANNEE	REPONSES DU LABORATOIRE	REPONSES ATTENDUES
2000 PAR2	<i>P. falciparum</i> (trophozoïtes)	<i>P. falciparum</i> (trophozoïtes)
2001 PAR1	Absence de parasite	Absence de parasite
2002 PAR1	<i>P. ovale</i> (trophozoïtes, gamétocytes)	<i>P. ovale</i> (trophozoïtes, gamétocytes)
2003 PAR1	<i>Loa Loa</i> (microfilaires)	<i>Loa Loa</i> (microfilaires)
2003 PAR2	<i>Trypanosoma brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
2004 PAR1	<i>P. falciparum</i> (trophozoïte, schizontes)	<i>P. falciparum</i> (trophozoïte, schizontes, gamétocytes)
2004 PAR2	<i>P. falciparum</i> (trophozoïtes)	<i>P. falciparum</i> (trophozoïtes)
2005 PAR1	<i>P. ovale</i> (trophozoïtes, gamétocytes)	<i>P. ovale</i> (trophozoïtes, gamétocytes)
2005 PAR2	<i>Leishmania donovani</i> (promastigotes)	<i>Leishmania donovani</i> (promastigotes)
2006 PAR1	<i>P. falciparum</i> (trophozoïtes)	<i>P. falciparum</i> (trophozoïtes, gamétocytes)
2007 PAR1	<i>P. malariae</i> (trophozoïtes, schizontes, gamétocytes)	<i>P. malariae</i> (trophozoïtes, schizontes, gamétocytes)
2008 PAR1	<i>P. falciparum</i> (trophozoïtes)	<i>P. falciparum</i> (trophozoïtes)
2009 PAR1	<i>P. falciparum</i> (trophozoïtes)	<i>P. falciparum</i> (trophozoïtes)
2010 PAR1	<i>P. falciparum</i> (trophozoïtes)	<i>P. falciparum</i> (trophozoïtes)

3.2.2.2.4.2 Confirmation par le Centre National de Référence

La déclaration de nos accès palustres au CNR de la Pitié-Salpêtrière ainsi que l'envoi de lames colorées et d'un tube EDTA permet une confirmation continue de nos diagnostics d'espèce.

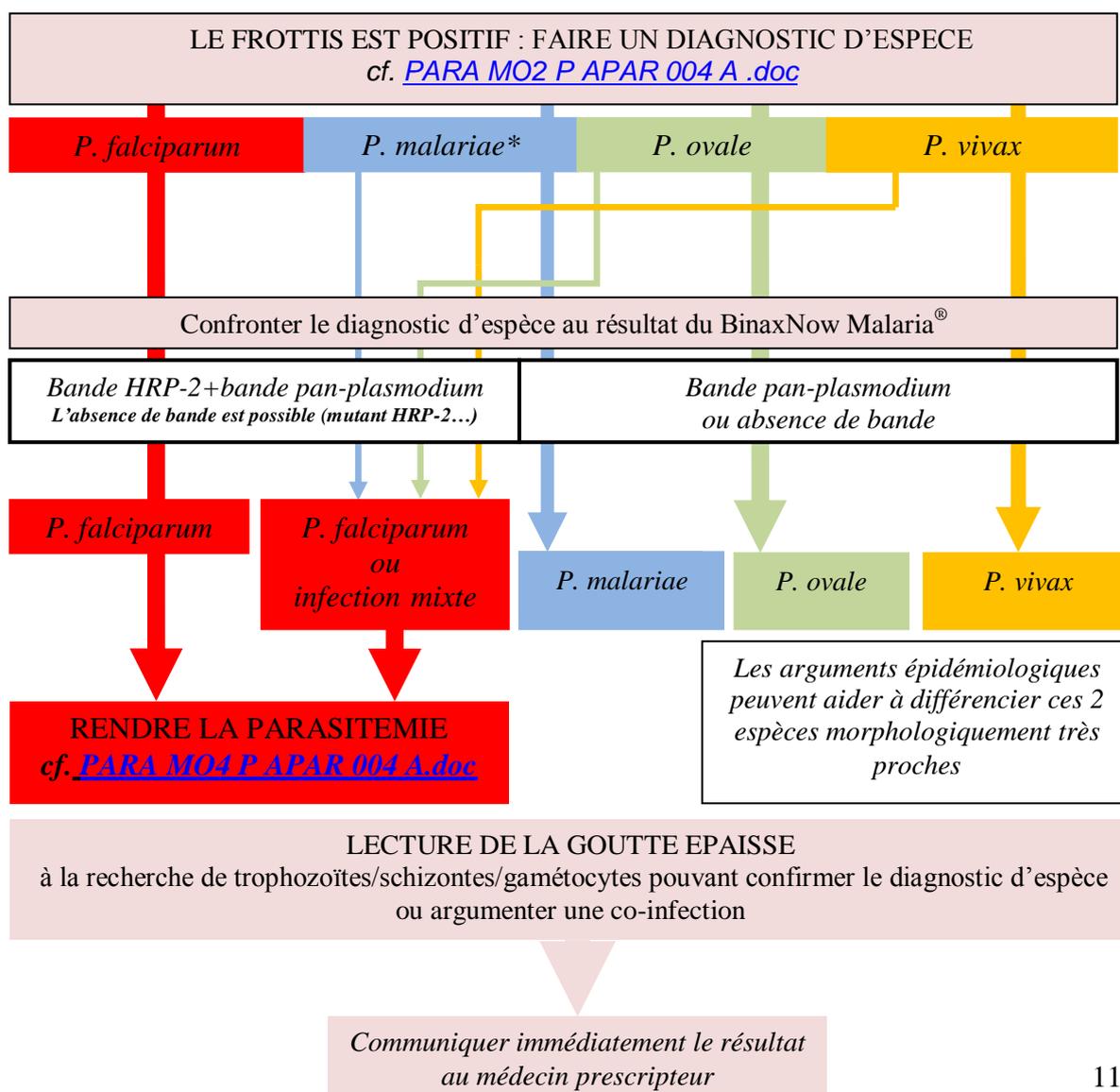
3.2.2.3 Post-analytique

Les résultats discordants observés pour un échantillon au cours de la vérification sur site illustrent l'importance du contexte épidémiologique, de la clinique et des informations recueillies lors de la phase pré-analytique.

Ces renseignements permettent au biologiste d'évaluer un risque d'accès palustre, et en fonction de celui-ci, d'interpréter les résultats de manière adaptée. L'avis rendu au clinicien pourra s'avérer déterminant dans la suite de la prise en charge. Certains renseignements permettent également d'évaluer la gravité de l'accès palustre.

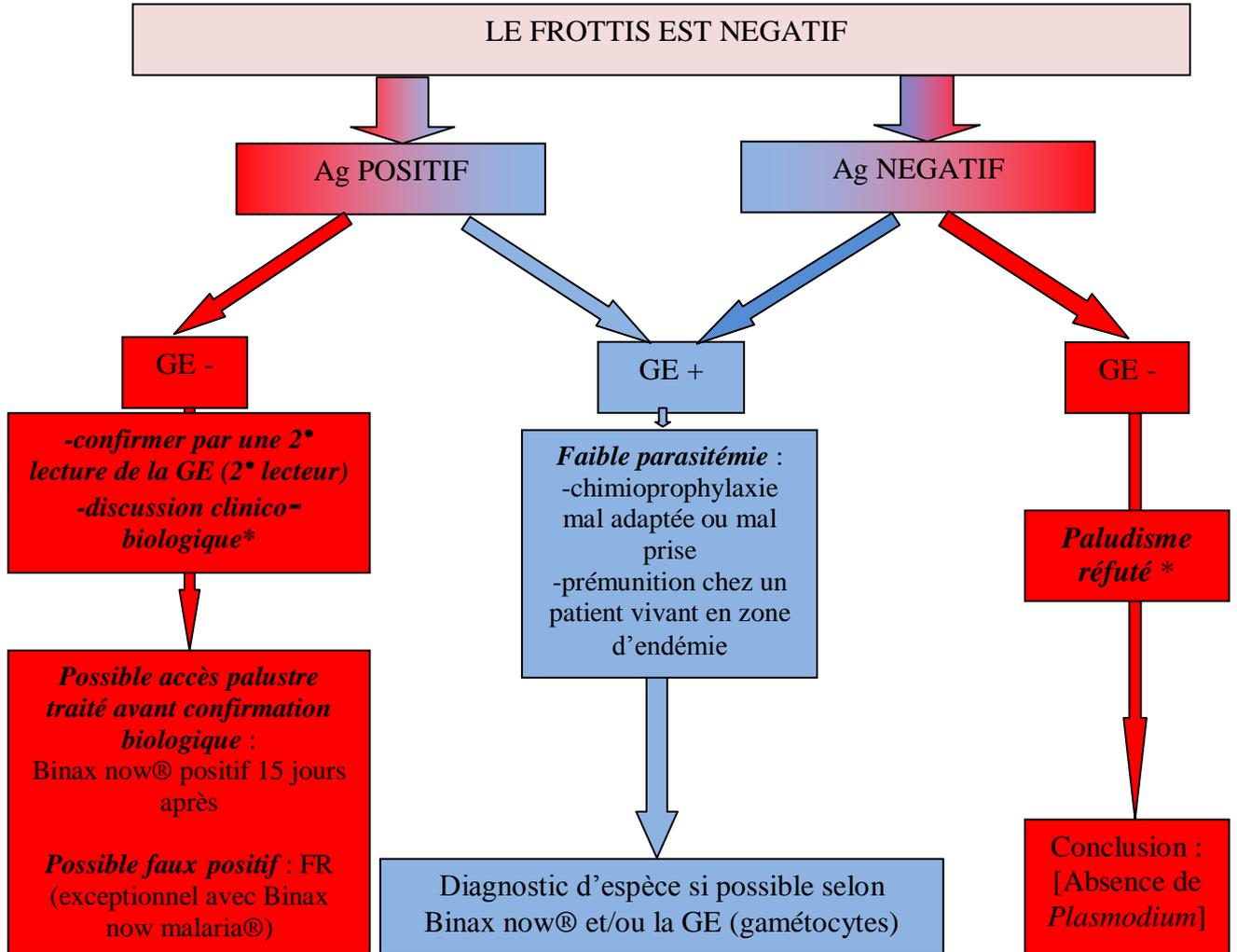
Devant l'importance de la phase post-analytique, nous avons rédigé une procédure de validation biologique des résultats permettant de rendre une interprétation et un avis au prescripteur. Les 2 logigrammes suivants (*Illustrations 24 et 25*) sont issus de cette procédure.

Illustration 24 : Logigramme décisionnel devant un frottis mince positif



*Si parasitémie ≥2% et/ou signes de gravité, évoquer *P. knowlesi*

Illustration 25 : Logigramme décisionnel devant un frottis mince négatif



Communiquer immédiatement le résultat au médecin prescripteur

*En cas de recherche négative avec forte suspicion épidémiologique, une surveillance clinique rapprochée et un deuxième prélèvement seront proposés au prescripteur

3.2.3 Recherche de leishmaniose viscérale

Les leishmanioses sont des affections dues à des protozoaires flagellés du genre *Leishmania*, elles sont transmises à l'Homme par des petits moucheron : les phlébotomes.

Seule la forme viscérale touche les organes hématopoïétiques, le parasite se multipliant dans le sang et la moelle (33). Celle-ci connaît comme agents pathogènes : *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani* et *Leishmania archibaldi*. Le diagnostic est évoqué à partir d'arguments épidémiologiques, cliniques et biologiques (33). Les principaux foyers de leishmaniose viscérale sont localisés dans le pourtour méditerranéen, au Moyen-Orient, en Afrique de l'Est, en Inde et sur le continent sud-américain ; une triade classique associe fièvre folle, splénomégalie et pâleur. La pancytopénie est typique mais s'installe progressivement. L'incidence mondiale des formes viscérales est de 500 000 cas par an dont 90% sont recensés dans seulement 5 pays (Inde, Népal, Bangladesh, Soudan, Brésil) (12) (34).

En France, le Centre National de Référence des *Leishmania* situé à Montpellier, recense depuis 1999 les cas de leishmanioses viscérales autochtones. Entre 1999 et 2003, 118 cas de leishmaniose viscérale ont été recensés avec des variations de 18 à 30 cas par an (34). Parmi ces cas, 40% concernent des sujets co-infectés par le VIH et 22% des enfants de moins de 6 ans (34). Les principales régions françaises de contamination sont celles bordant la méditerranée où la maladie est zoonotique, due à *Leishmania infantum* et a pour réservoir le chien.

3.2.3.1 Pré-analytique

3.2.3.1.1 Aide à la prescription

Comme pour de nombreuses parasitoses rares, l'étape pré-analytique est essentielle, le retard au diagnostic étant le plus souvent la conséquence d'une méconnaissance ou d'un oubli de cette pathologie. Le diagnostic de leishmaniose viscérale se base sur des éléments d'orientation cliniques et biologiques que nous avons synthétisés dans une aide à la prescription (*Illustration 26*), celle-ci répond également à l'exigence de la Norme quant aux conseils à donner au prescripteur à propos du choix des analyses disponibles.

C'est la ponction de moelle osseuse qui est la plus souvent contributive (12). Néanmoins la recherche peut aussi être réalisée à partir du sang veineux, des ganglions, du foie, des muqueuses digestives ou de liquide bronchiolo-alvéolaire (12).

 <p>Parasitologie - Mycologie</p>	AIDE A LA PRESCRIPTION : Recherche d'une leishmaniose viscérale	PARA F4 P RES 001 A
		Date d'application: 01/02/2011
		Page 122 sur 187

**-NOTION DE SPLENOMEGALIE NON ETIQUETEE + FIEVRE
- ET/OU PANCYTOPENIE (Anémie, leucopénie++)
+/- ADENOPATHIE
+/-HEPATOMEGALIE**

Rq : Les jeunes enfants et les immunodéprimés sont plus fréquemment concernés

+

SEJOUR EN ZONE D'ENDEMIE
**-BASSIN MEDITERRANEEN (France : Corse, PACA, Cévennes l'été)
-ASIE (Chine, Inde, Bangladesh...)
-EST AFRICAIN
-AMERIQUE DU SUD (Brésil ...)**
Pour plus de renseignements, appeler le laboratoire au 53916

Demander :

- « **Leishmaniose recherche directe** » sur sang EDTA pour recherche directe et PCR ou sur mœlle osseuse pour recherche directe (sur frottis), PCR+culture (sur 1 tube EDTA et citraté)
- « **Leishmaniose sérologie** » (*une sérologie négative n'exclut pas le diagnostic*)

3.2.3.2 Analytique

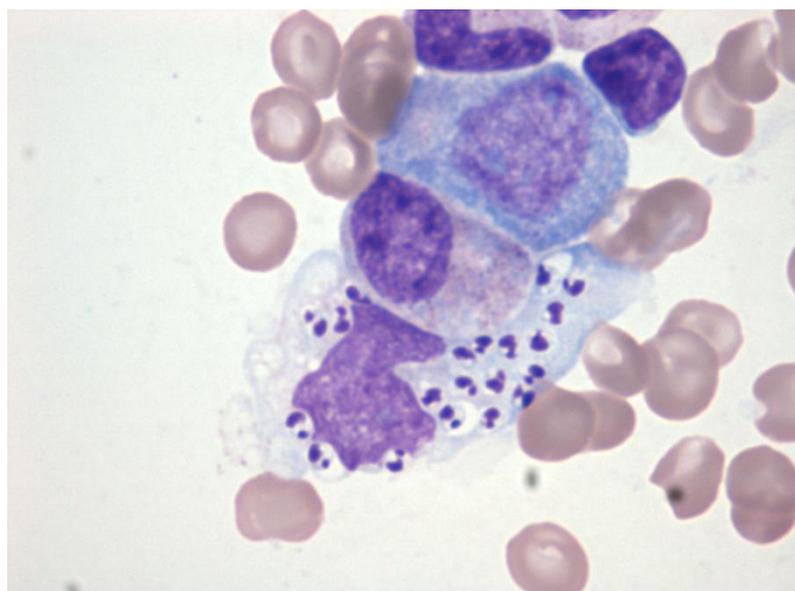
3.2.3.2.1 Procédure diagnostique du laboratoire

Classiquement, le diagnostic de certitude repose sur la visualisation du parasite sur un prélèvement de moelle osseuse coloré au May-Grünwald-Giemsa avec une sensibilité diagnostique qui dépasse 90% (35).

Le prélèvement de sang périphérique coloré au May-Grünwald-Giemsa après leucocytocentrifugation permet d'avoir une sensibilité intéressante chez le malade immunodéprimé (12) (34).

Au microscope, les parasites se présentent sous forme amastigote en position typiquement intra-macrophagique mais souvent extracellulaire ; leur petite taille (2 à 5µm) et l'appariement d'un noyau rond pourpre et d'un kinétoplaste punctiforme sont typiques.

Illustration 27 : Photographie de formes amastigotes intra-macrophagiques de Leishmania



La réalisation de cultures en association avec l'examen direct est recommandée (36). En effet, elles permettent de redresser certains diagnostics mais aussi d'identifier l'espèce par caractérisation biochimique des isolats.

Le diagnostic moléculaire, basé sur la détection et l'analyse des acides nucléiques du parasite dans le sang ou la moelle, complète les approches parasitologiques et sérologiques

dans le diagnostic initial et a une place essentielle dans le suivi post-thérapeutique (34). La sensibilité de cette technique approche les 100% sur la moelle comme sur le sang (35).

La positivité de la sérologie constitue une très forte présomption diagnostique. La technique de référence est l'immunofluorescence indirecte sur promastigotes de culture. Cette technique est de plus en plus supplantée par les tests ELISA. L'immuno-empreinte ou Western-Blot est très sensible et spécifique, il s'agit d'un test de confirmation réservé à des laboratoires spécialisés (34).

La sensibilité approche 100% chez l'immunocompétent par les techniques les plus performantes, elle est moindre en cas de SIDA mais reste supérieure à 80% (35).

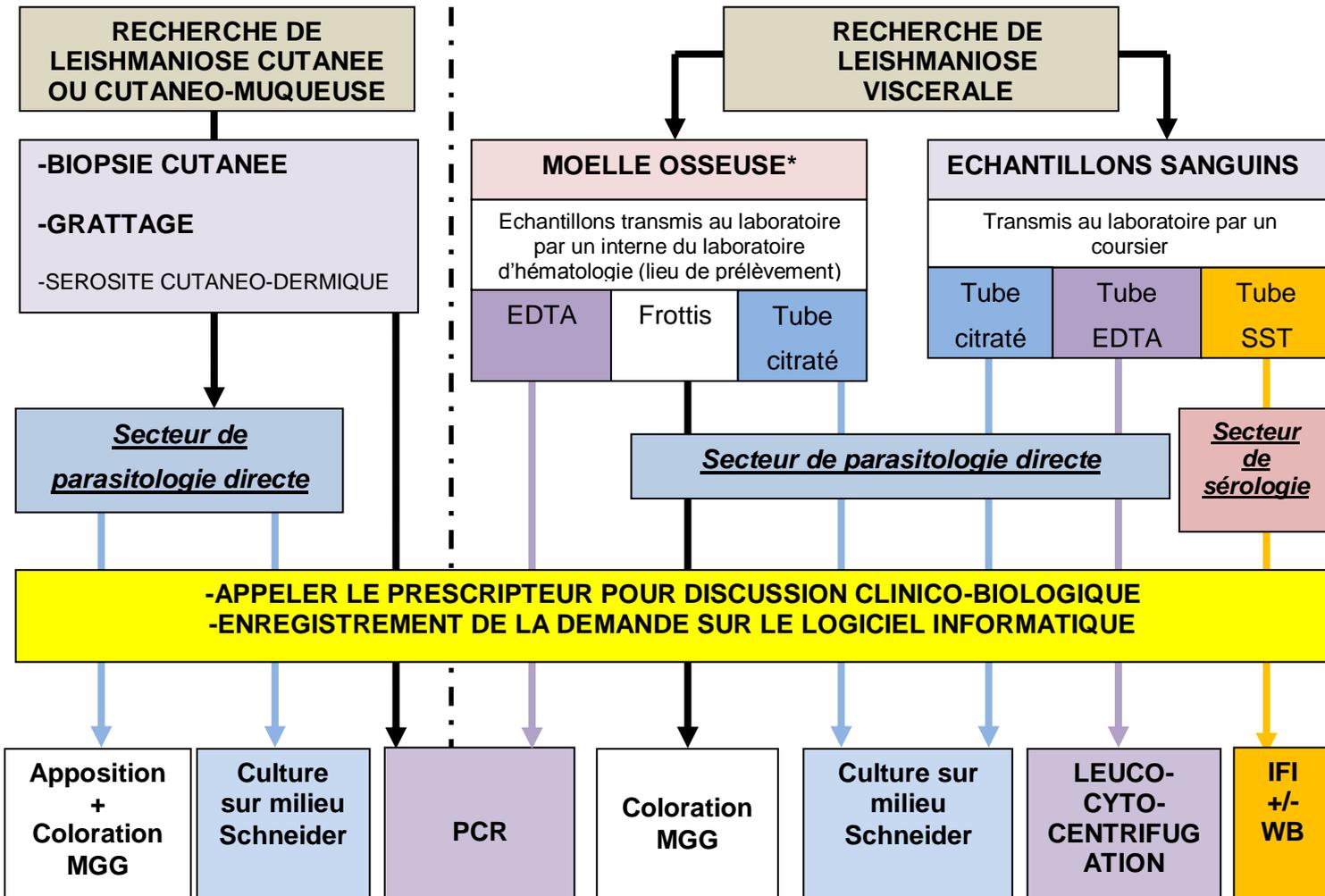
Notre procédure de recherche de leishmaniose viscérale fait partie de la procédure de recherche de parasites sanguicoles. En référence à l'état actuel des données scientifiques, nous utilisons au laboratoire une recherche directe du parasite sur frottis de moelle osseuse coloré au May-Grünwald-Giemsa et/ou sur sang après leucocytocentrifugation. Nous y associons des cultures répétées sur milieu de Schneider, une technique sérologique par immunofluorescence indirecte ainsi qu'une technique de biologie moléculaire.

Le logigramme de l'*Illustration 28* résume la démarche diagnostique appliquée au laboratoire au cours des phases pré-analytique et analytique.

Le mode opératoire de la leucocytocentrifugation (*Illustration 29*) a été mis à jour en référence à la méthode décrite dans le cahier de formation de Biologie Médicale BIOFORMA N°23 : *parasites sanguins* (37). Concernant notre méthode de culture sur milieu de Schneider, notre mode opératoire s'inspire du livre de Jean-Pierre Dedet : *Les leishmanioses* (38).

 Parasitologie - Mycologie	RECHERCHE DE LEISHMANIOSES	PARA F1 P APAR 003 A
		Date d'application: 01/02/2011
		Page 125 sur 187

RECEPTION DES ECHANTILLONS



**En cas de prélèvement de MO non réalisable ou de forte suspicion, le biologiste proposera au prescripteur une PCR sur sang EDTA après LEUCOCYTOCENTRIFUGATION pour éviter la ponction de MO*

IFI= immunofluorescence indirecte
WB= western blot
PCR= Polymerase chaine reaction
MGG= May-Grünwald-Giemsa

UNE RECHERCHE DE LEISHMANIOSE VISCERALE est également réalisable sur ponction ganglionnaire voire d'autres prélèvements (LBA, biopsie digestives...)

 Parasitologie - Mycologie	LEUCOCYTO CENTRIFUGATION	PARA MO7 P APAR 003 B
		Date d'application: 01/02/2011
		Page 126 sur 187

INDICATIONS :

Cette technique est notamment utilisée pour la recherche de leishmanies.

Elle s'effectue sur :

- Sang prélevé sur EDTA (5mL) (ou citrate)
- Moelle osseuse en cas de prélèvement dilué : sur anticoagulant (EDTA ou citrate)

MATERIEL :

- Boîtes de Pétri avec chevalets pour support de lame (pièce parasitologie)
- Filtre Sartorius® (0,2µm) et seringue stérile de 2mL
- Cytocentrifugeuse cytospin 3 SHANDON (pièce mycologie)
- Matériel cytospin (cytoclips, carte filtrante, chambres jetables) dans le placard D de la pièce mycologie
- Tube à hémolyse
- Dispositif d'aspiration 1mL
- Micropipette réglable 200 à 1000µL (pièce de sérologie)
- Lames à bords rodés et plage dépolie (pièce parasitologie)
- Microscope optique

REACTIFS :

- Solution hémolysante pour leucocyto-centrifugation filtrée (cf. fiche réactif)
- May Grunwald à température ambiante au dessus de la paillasse de parasitologie
- Giemsa à température ambiante au dessus de la paillasse de parasitologie
- PBS conservé dans le réfrigérateur du secteur de parasitologie (95 00 106)
- Solution stérile NaCl à 0,9% flacon de 250mL

TECHNIQUE :

- Dans un tube à hémolyse, récupérer 1mL de la solution hémolysante filtrée (0,2µm).
- Ajouter 500µL de sang (100µL si recherche effectuée sur moelle).
- Mélanger doucement par retournements jusqu'à hémolyse complète (1mn).
- Prélever, avec la micropipette réglable, un volume de ce mélange qui sera fonction du nombre de leucocytes (à récupérer sur cyberlab) :



Leucocytes/ μ L	Quantité de sang hémolysé à centrifuger en μ L
1000-3000	500
3000-4000	350
5000-6000	300
9000-12000	200
> 12000	150

- Déposer ce volume dans deux chambres jetables de la cytospin, puis fermer avec le bouchon
- Monter 2 dispositifs pour centrifugation : inclure une lame de microscope et la carte filtrante entre le cytoclip et la chambre jetable.
- Placer les dispositifs dans la cuve de la cytospin.
- Refermer la cuve.
- Centrifuger 12 minutes à 2000tours/minute.
- Retirer précautionneusement les lames.
- Sécher les lames à température ambiante et colorer au May-Grünwald-Giemsa (cf MO MGG).
- Observer longuement (30 minutes) au microscope, avec l'objectif x100 à immersion en recherchant les formes amastigotes intra ou extra cellulaires.

Si la recherche est positive, remplir la fiche de déclaration en suivant la procédure directement accessible sur le site internet du CNR Leishmaniose-Montpellier <http://www.parasitologie.univ-montp1.fr/> et surveiller la culture pour envoi la souche au CNR ou de l'ADN parasitaire (typage).

REFERENCES :

Cahier de formation biologie médicale BIOFORMA N°23, parasites sanguins, Décembre 2001

3.2.3.2.2 Validation des méthodes

La leishmaniose viscérale est exceptionnelle en France métropolitaine et la validation des méthodes repose avant tout sur une vérification bibliographique des performances.

Cependant, l'analyse rétrospective des résultats obtenus au laboratoire au cours des années 2008, 2009 et 2010 nous permet d'étudier la corrélation de nos méthodes. De plus, en considérant l'association : examen direct de la moelle osseuse et cultures comme la méthode de référence (36), nous pouvons calculer la sensibilité des autres techniques.

Pendant ces trois années, sur les 28 recherches réalisées, seulement 15 ont respecté l'association de l'examen direct de la moelle osseuse et de la culture. Sur ces 15 recherches, un cas de leishmaniose viscérale infantile autochtone a été authentifié en 2009. La positivité de la PCR et de l'immunofluorescence indirecte permettent de conclure à une sensibilité de 100% pour ces deux techniques. La corrélation de nos 4 méthodes est de 100%.

Devant le faible nombre de recherches et l'unique cas de leishmaniose viscérale, il est évident que cette évaluation est à poursuivre et que les résultats doivent être interprétés avec une certaine mesure.

Dans le suivi post-thérapeutique, la PCR sur sang périphérique a été la seule réalisée en raison de sa plus grande sensibilité reconnue dans la littérature.

3.2.3.3 Post-analytique

Le résultat est validé par un biologiste qui, en fonction des éléments pré-analytiques et analytiques, interprétera le résultat sur le compte-rendu.

3.2.4 Recherche de trypanosomose humaine africaine

La trypanosomose humaine africaine, aussi appelée « maladie du sommeil », est due à un protozoaire flagellé sanguicole *Trypanosoma brucei* dont il existe 2 sous-espèces de répartition géographique différente (*T. b. gambiense* en Afrique de l'Ouest et *T. b. rhodesiense* en Afrique de l'Est) (12). Les vecteurs sont des diptères du genre *Glossina* plus connus sous le nom de mouches tsé-tsé. Cette parasitose est strictement africaine et ne peut être contractée qu'en Afrique subsaharienne principalement dans les zones rurales reculées.

En France, son diagnostic est exceptionnel, une étude rétrospective portant sur 50 laboratoires de parasitologie durant les années 1980-2004 révèle que seuls 24 cas ont été recensés (39).

La rareté de la maladie en France ne justifie en aucun cas une prise en charge diagnostique de seconde ligne. En effet, cette pathologie qui a une présentation clinique peu spécifique (fièvre, asthénie, prurit, adénopathies...) évolue constamment, en l'absence de traitement, vers une phase méningo-encéphalitique aboutissant à un état grabataire et un coma d'évolution fatale. De plus, au début du XXI siècle, de nombreux pays d'Afrique centrale et de l'Ouest connaissent des flambées épidémiques d'infections à *T. b. gambiense* (40).

On comprend alors la nécessité de mettre en place, au sein du laboratoire de parasitologie, des mesures destinées à optimiser, en cas de besoin, la recherche de cette parasitose.

3.2.4.1 Pré-analytique

3.2.4.1.1 Motifs de la recherche

Il est très difficile pour un médecin de France métropolitaine d'évoquer une parasitose aussi exceptionnelle. C'est l'association de plusieurs arguments cliniques, épidémiologiques et biologiques qui doit mener le clinicien à la suspecter.

Les diverses études conduites sur les signes cliniques de la trypanosomose humaine africaine, leur fréquence et leur proportion sont encore aujourd'hui peu fiables (41).

L'incubation est de durée variable : de quelques jours à plusieurs années et la notion de piqure infectante, à l'origine d'une réaction inflammatoire locale « trypanome » est souvent oubliée au moment de l'interrogatoire. La réaction du système réticulo-histiocytaire peut être à l'origine d'adénopathies, d'hépatomégalie et de splénomégalie et la maladie évolue schématiquement en 2 périodes qui se chevauchent : la phase lymphatico-sanguine et la phase méningo-encéphalitique de polarisation cérébrale.

Pendant la phase lymphatico-sanguine, la fièvre est le symptôme le plus constant (12), l'apparition de ganglions cervicaux mobiles, indolores et élastiques est un signe évocateur, l'hépatosplénomégalie est modérée. Des manifestations cutanées sont observables, parmi elles, le prurit est la plus fréquente (12) ; des œdèmes de la face et des trypanides (éruptions polycycliques) sont inconstants mais évocateurs. Au cours de cette phase, il est possible d'isoler le parasite dans le sang et/ou les ganglions.

Lors de la phase méningo-encéphalitique, le parasite a traversé la barrière hémato-méningée et envahit le système nerveux central, le malade peut présenter en plus des symptômes précédents, des troubles de la conscience, de la motricité, de la sensibilité, des troubles neuro-endocriniens ainsi qu'une altération du cycle veille/sommeil donnant son nom à la maladie. Les parasites peuvent être retrouvés grâce à leur mobilité dans le culot de centrifugation du liquide céphalo-rachidien (LCR).

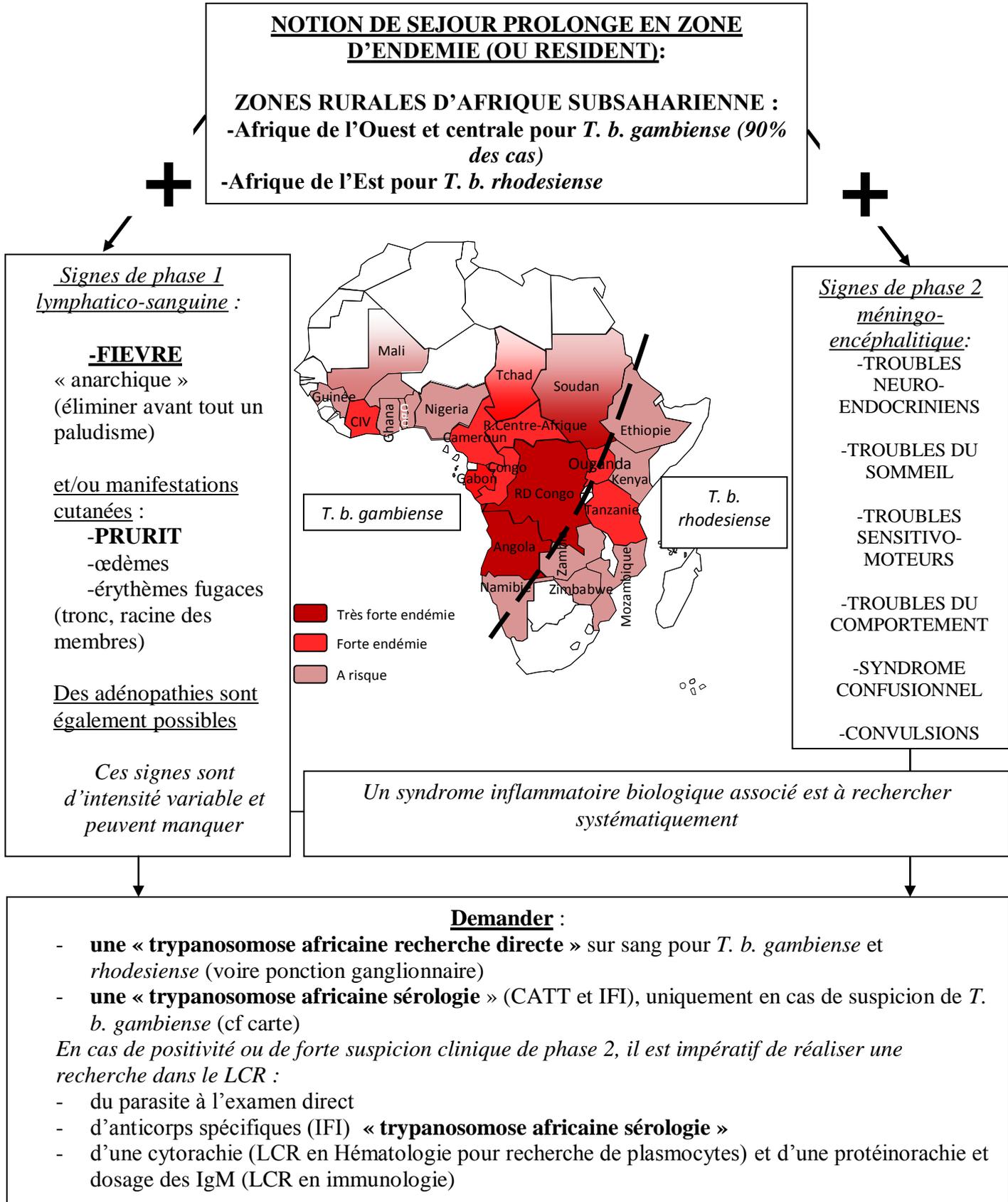
3.2.4.1.2 Rôle fondamental du biologiste

Le biologiste a un rôle déterminant dans la prise en charge de cette maladie puisque la seule façon de la diagnostiquer est de démontrer la présence du parasite chez l'hôte humain (41) (42). En cas de positivité du sang ou d'un ganglion, l'étude du LCR est indispensable pour établir le stade de la maladie et en fonction de celui-ci le traitement à administrer. Cette étude devra systématiquement associer la recherche directe du parasite, la recherche d'une cytorachie (≥ 5 cellules par μL), la recherche d'une protéinorachie (≥ 0.4 g/L), en cas de positivité d'une seule ou plusieurs d'entre elles, le diagnostic de phase méningo-encéphalitique pourra être établi (42).

Lors de la phase pré-analytique, la région d'Afrique où le patient a vécu est une information essentielle car elle permettra de suspecter plus ou moins une des 2 sous-espèces et donc d'envisager différemment l'interprétation des tests sérologiques qui mettent mieux en évidence *T. b. gambiense*.

Les signes cliniques étant peu spécifiques et inconstants au cours de la trypanosomose humaine africaine (42), il est indispensable d'orienter le clinicien par des conseils et une aide à la prescription (*Illustration 30*) indiquant les principaux éléments épidémiologiques, cliniques et biologiques à prendre en compte ainsi que les analyses à prescrire en fonction du contexte.

 <p>Parasitologie - Mycologie</p>	<p>AIDE A LA PRESCRIPTION :</p> <p>Recherche de trypanosomose humaine africaine</p>	<p>PARA F3 P RES 001 A</p>
		<p>Date d'application: 01/02/2011</p>
		<p>Page 131 sur 187</p>



3.2.4.2 Analytique

3.2.4.2.1 Procédure du laboratoire

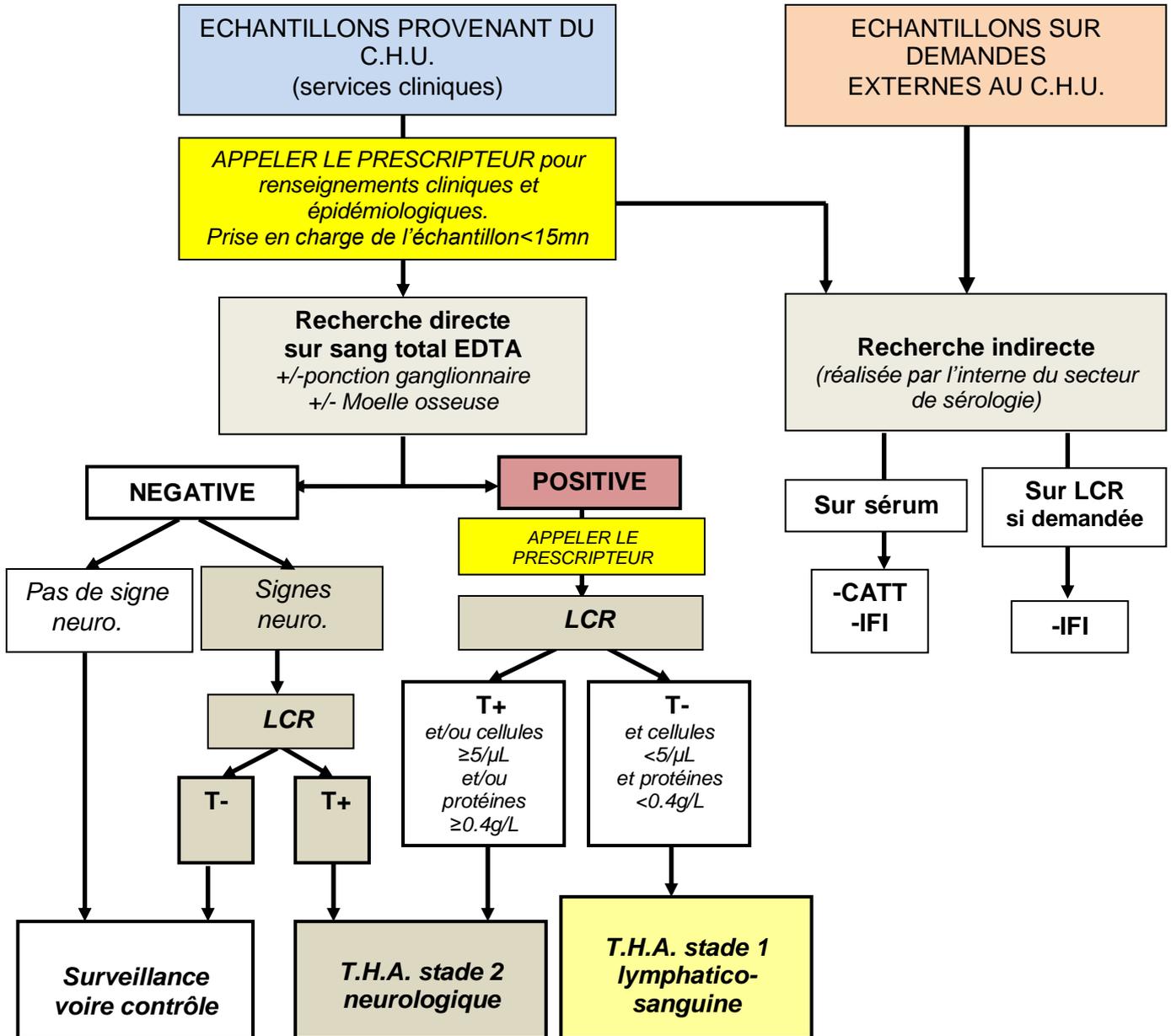
Le diagnostic ne peut être affirmé que si les signes de suspicion sont confirmés par la mise en évidence de trypanosomes dans le sang ou dans la lymphe. La recherche directe de parasites dans le sang au cours de dépistages de masse est souvent décevante, en raison de faux négatifs dus aux vagues de parasitémie (41). Il est alors nécessaire d'employer des méthodes de concentration des trypanosomes. Les méthodes indirectes telles que la détection d'anticorps sont utiles pour établir une suspicion et, dans les dépistages de masse, pour la présélection de sujets susceptibles d'être infectés.

Une fois la réalité de l'infection par le trypanosome établie, il convient de pratiquer le diagnostic de phase ou de stade. Celui-ci est indispensable, car les médicaments administrés au cours du stade méningo-encéphalitique sont très toxiques et/ou difficiles à administrer (41). La présence de trypanosomes dans le LCR et les réactions induites par cette présence sont alors recherchées.

Nous avons choisi d'associer à notre procédure de recherche de parasites sanguicoles, un arbre décisionnel (*Illustration 31*) déterminant la succession des choix des tests réalisés au laboratoire lors d'une recherche de trypanosomose humaine africaine. Il a été vérifié par le Docteur Bernard Bouteille et intègre la réalisation de méthodes sérologiques (CATT et IFI) souvent réalisées de manière isolée pour d'autres laboratoires de parasitologie.

Illustration 31 : Procédure de recherche de trypanosomose humaine africaine (logigramme)

 Parasitologie - Mycologie	RECHERCHE DE TRYPANOSOMOSE HUMAINE AFRICAINE	PARA F2 P APAR 003 A
		Date d'application: 01/02/2011
		Page 133 sur 187



LCR = Liquide Céphalo-Rachidien
 T- = Recherche de trypanosome négative
 T+ = Recherche de trypanosome positive
 CATT= Card Agglutination Trypanosomiasis Test
 IFI= ImmunoFluorescence Indirecte
 T.H.A.= Trypanosomose Humaine Africaine

3.2.4.2.2 Techniques réalisées au laboratoire et leur vérification bibliographique

3.2.4.2.2.1 Recherche du parasite au microscope

Depuis la découverte de *Trypanosoma brucei gambiense* par Dutton (1902), la confirmation directe de la présence de parasites par l'examen microscopique du sang et/ou d'autres liquides biologiques représente aujourd'hui le « gold standard » des techniques de diagnostic biologique (41). La recherche au microscope, toute imparfaite qu'elle soit, doit toujours être faite, pour deux raisons essentielles : les tests sérologiques ont une marge d'erreur, et surtout la thérapeutique est fondée sur des produits toxiques, notamment au stade 2. La capacité du trypanosome à envahir tous les liquides corporels a conduit à examiner le sang, le suc ganglionnaire, le LCR mais aussi, de façon plus anecdotique, la moelle osseuse ou encore les hydrocèles (41). Le nombre de parasites détectés ne joue pas un rôle déterminant dans le diagnostic car il fluctue au cours de l'infection.

Illustration 32 : Photographie de Trypanosoma brucei sur frottis mince coloré au May-Grünwald-Giemsa



Les données de la littérature concernant l'évaluation des performances des différentes méthodes diagnostiques sont peu nombreuses et ont été menées sur le terrain. Elles montrent des résultats parfois disparates. Un document de référence, rédigé à la suite des recommandations de la réunion d'experts organisée par Tropical Diseases Research/Organisation mondiale de la santé à Londres en février 2006 (41), synthétise l'ensemble des résultats de ces études. Il en ressort que les techniques de concentration du

parasite comme la cyto centrifugation en tube capillaire, la technique du QBC[®] et la chromatographie par minicolonne échangeuse d'anions (mAECT) sont bien plus sensibles que l'examen direct du sang à l'état frais (6 000 à 10 000 parasites par mL) ou le frottis sanguin coloré (10 000 parasites par mL). Le seuil de détection pourrait aller jusqu'à 16 trypanosomes par mL pour les deux premières et 3-4 trypanosomes par mL pour la mAECT, technique la plus sensible mais dont le coût élevé est un frein à son utilisation.

Au laboratoire, la recherche dans le sang est réalisée en priorité par la technique de la centrifugation en tube capillaire associée à l'examen direct à l'état frais, au frottis sanguin coloré et à la goutte épaisse. Son utilisation étant motivée par la maîtrise de la technique par le Docteur Bernard Bouteille et un coût moindre.

Sur le LCR la technique de la double centrifugation est utilisée considérée par l'OMS comme la technique la plus sensible (41). Les modes opératoires de ces techniques de concentration ont été rédigés en référence au cahier BIOFORMA N°23 (37), vérifiés puis approuvés.

3.2.4.2.2.2 Les techniques de recherche indirecte

- L'agglutination directe ou Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT)

Ce test, effectué sur sang total ou sérum, repose sur la détection sérologique d'anticorps dirigés contre un type dominant d'antigène variant (variant antigen type, VAT) de la glycoprotéine variante de surface (VSG). L'antigène du CATT est constitué de *T. b. gambiense* LiTat 1.3 purifiés (il n'est pas efficace dans la maladie à *T. b. rhodesiense*).

Initialement validé chez 155 patients infectés par *T. b. gambiense*, comparés à 247 sujets sains et 54 patients porteurs d'une autre parasitose, ce test est fourni par l'Institut de médecine tropicale Prince Léopold d'Anvers. La sensibilité du CATT (de 92 à 100%), sa spécificité (de 90 à 95%) et la stabilité des réactifs sont constamment améliorés. Cependant, des faux positifs peuvent être dus à une infection par des trypanosomes animaux ou des Leishmanies et des faux négatifs sont possibles lors d'infections trop récentes. Il doit donc être complété par des tests parasitologiques de confirmation avant d'entreprendre un traitement (41).

- Le test d'immunofluorescence indirecte (IFI)

En laboratoire, c'est la technique de choix en raison de sa sensibilité élevée malgré une procédure complexe et une lecture délicate (41).

La méthode peut être utilisée sur du sérum ou du LCR. Elle a été améliorée par Magnus et al. (1978) en utilisant l'antigène lyophilisé LiTat 1.3 préparé à l'Institut de médecine tropicale Prince Léopold d'Anvers ainsi que le conjugué d'anticorps anti-IgG humain gamma spécifique marqué à la fluorescéine et produit par *Pasteur Diagnostics*.

L'évaluation sur site des méthodes directes n'est pas envisageable du fait de l'impossibilité de disposer au laboratoire d'échantillons contenant des trypanosomes vivants. Concernant les méthodes indirectes, une évaluation sur site ne pourrait se faire qu'avec des échantillons prélevés sur des patients séropositifs.

La validation de nos méthodes repose donc avant tout sur la vérification bibliographique.

3.2.4.3 Post-analytique

L'*Illustration 31* détaille, en plus du processus analytique, une partie de la démarche post-analytique. Le résultat est validé par un biologiste qui, en fonction des éléments pré-analytiques et analytiques, interprétera le résultat sur le compte-rendu.

3.2.5 Recherche de filarioses

Les filarioses sont observées en France chez des voyageurs qui sont essentiellement des migrants (17).

La loase est transmise par piqûre du chrysops en Afrique centrale forestière. Elle se manifeste par du prurit, un sillon cutané érythémateux, des œdèmes fugaces et migrateurs et le passage de la filaire adulte sous la conjonctive ou la peau (12) (17).

L'onchocercose est transmise par piqûre d'une simulie en Afrique subsaharienne principalement. Pour les touristes, elle peut être révélée par un prurit intense, des nodules cutanés ou par des formes aiguës à type de lymphœdème de membres (17).

La filariose lymphatique est transmise par piqûre d'un moustique en Afrique subsaharienne, dans le continent indien, dans le sud de l'Asie du Sud et quelques îles de l'Océanie. Elle provoque des lymphangites dites rétrogrades (de la racine du membre vers son extrémité), une chylurie puis plusieurs années plus tard des œdèmes des membres inférieurs, supérieurs et des organes génitaux réalisant un éléphantiasis. Cette pathologie est rencontrée principalement chez les autochtones ayant passé de nombreuses années en brousse (12) (17).

3.2.5.1 Pré-analytique

Les principaux éléments devant motiver une recherche de filariose sont l'hyperéosinophilie chez une personne ayant vécu longtemps en zone à risque (rurale), des manifestations cutanées pouvant être associées ou non. L'hyperéosinophilie est très fréquente et souvent élevée (12) (17).

Les signes cliniques sont peu spécifiques, ils peuvent être absents ou au contraire spectaculaires ; les renseignements épidémiologiques ont donc une importance majeure dans l'approche diagnostique et donc lors de la phase pré-analytique.

Concernant les filarioses sanguicoles, les microfilaires apparaissent dans le sang selon une périodicité qu'il faut respecter au moment du prélèvement pour optimiser le rendement diagnostique de l'examen parasitologique :

- en cas de suspicion de loase (*Loa loa*), le prélèvement sanguin devra être réalisé vers 12h (37).
- en cas de suspicion de filariose lymphatique (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*), la périodicité étant variable en fonction des espèces et des variétés, il est préconisé de réaliser un prélèvement vers 12h et un prélèvement vers 23h (37).

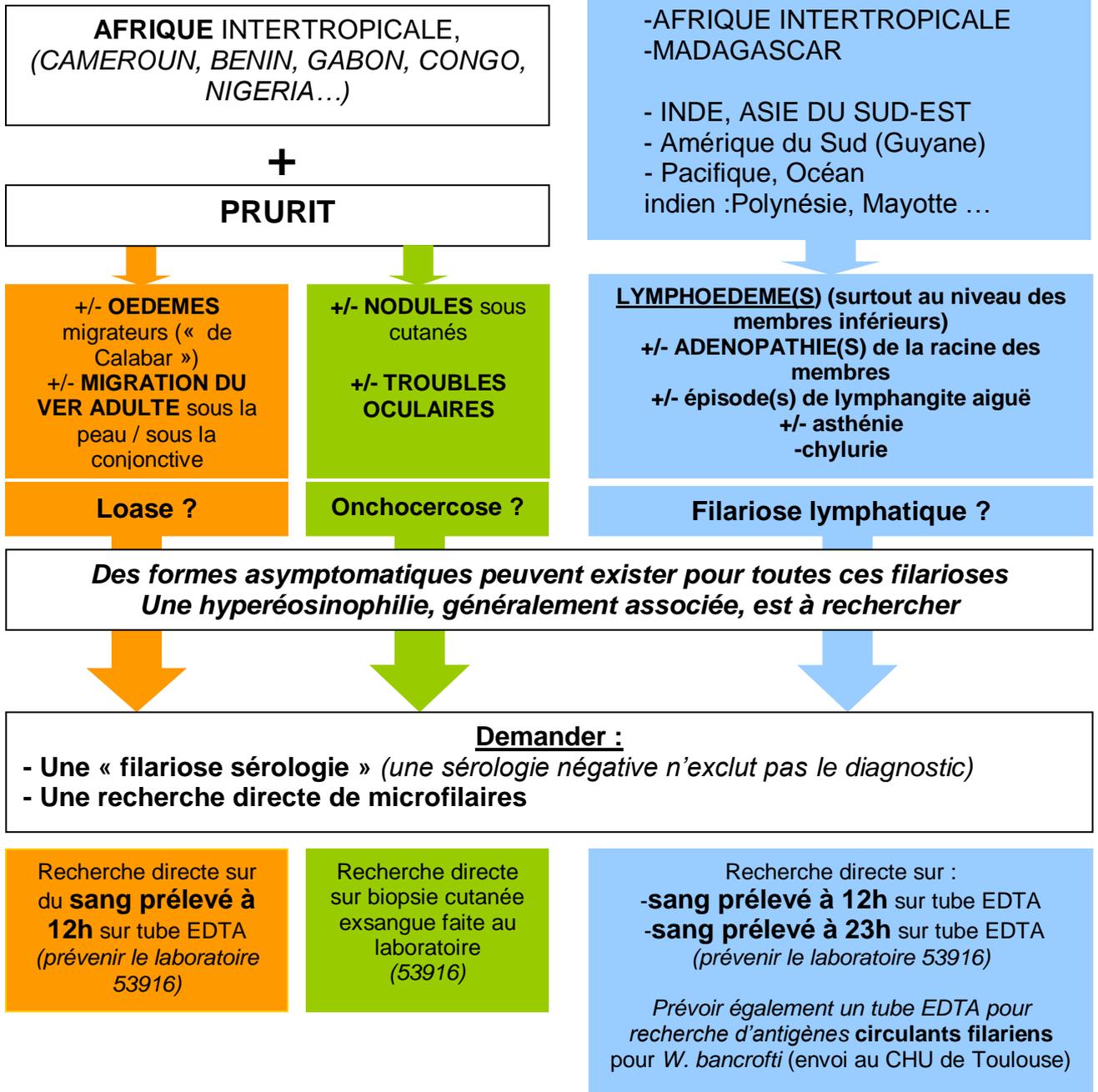
Concernant l'onchocercose, le diagnostic direct repose sur la biopsie cutanée exsanguée réalisée au laboratoire.

3.2.5.1.1 Aide à la prescription

Nous avons élaboré une aide à la prescription (*Illustration 33*) destinée à orienter le prescripteur dans le choix des analyses disponibles, en fonction du contexte clinico-épidémiologique.

 Parasitologie - Mycologie	AIDE A LA PRESCRIPTION : Recherche de FILARIOSE	PARA F2 P RES 001 A
		Date d'application: 01/02/2011
		Page 138 sur 187

NOTION DE SEJOUR PROLONGE



3.2.5.2 Analytique

3.2.5.2.1 Procédure du laboratoire

Le diagnostic de certitude des filarioses à microfilaires sanguicoles se fait en deux temps (37) :

- Recherche de microfilaires dans le sang
- Identification de l'espèce en cause par l'étude morphologique après coloration

Dans certains cas, il sera utile de pratiquer une numération des microfilaires. Quant au diagnostic sérologique, il ne peut être qu'un élément d'appoint, utile dans les formes pauci-parasitaires.

La recherche de microfilaires à Limoges associe l'examen du sang à l'état frais, entre lame et lamelle à la technique de leucoconcentration (lyse par la saponine) permettant de sensibiliser la recherche (12). La réalisation d'un frottis mince et d'une goutte épaisse colorés permettent le diagnostic d'espèce.

Dans le cadre de notre politique de maîtrise documentaire, nous avons révisé le mode opératoire de notre technique de leucoconcentration (*Illustration 34*) en vérifiant sa conformité au cahier BIOFORMA (37).

Nous avons également établi un document illustré permettant d'adopter une démarche pratique pour le diagnostic d'espèce des trois principales filaires sanguicoles pathogènes chez l'Homme : *Loa loa*, *Wuchereria bancrofti* et *Brugia malayi*.

 Parasitologie - Mycologie	CONCENTRATION DES FILAIRES PAR HEMOLYSE A LA SAPONINE	PARA MO5 P APAR 003 A
		Date d'application: 01/02/2011
		Page 140 sur 187

INDICATIONS :

Ce mode opératoire est utilisé pour la recherche de microfilaires sanguicoles et conserve les microfilaires vivantes :

- *Loa loa* (Afrique)
- *Wuchereria bancrofti* (Afrique, Inde...)
- *Wuchereria bancrofti* (var Pacifica)
- *Brugia malayi*
- *Mansonella perstans*

Recherche réalisée sur tube de sang total EDTA

MATERIEL :

- Tube plastique de 50mL
- Pipettes graduées de 15mL
- Poires d'aspiration 3mL
- Centrifugeuse (secteur de parasitologie)
- Lames porte-objets de 76x26 mm, bords non rodés et rodés
- lamelles 22 x 22 mm

REACTIFS :

- Eau physiologique
- PBS conservé dans le réfrigérateur du secteur de parasitologie (95 00 106)
- Saponine à 2% dans de l'eau physiologique. Des aliquotes de 500 µL en tubes à hémolyse sont stockés à 4°C (conservation 1 an). Une réserve est au congélateur (même réfrigérateur à -20°C (tiroir n°2) (conservation : 2 ans).
- May-Grünwald à température ambiante au dessus de la pailasse de parasitologie
- Giemsa à température ambiante au dessus de la pailasse de parasitologie

TECHNIQUE :

Dans un tube plastique de 50mL, mettre :

- 5mL de sang total
- En fonction de la quantité de sang dont on dispose, on peut augmenter ou réduire le volume traité.
- 10mL d'eau physiologique (ou 2 volumes)
- Retourner pour bien mélanger
- Rajouter progressivement, tout en agitant, 5 gouttes de la solution de saponine à 2% et retourner le tube plusieurs fois jusqu'à obtenir un sang d'aspect laqué (rajouter des gouttes si nécessaire)
- Centrifuger 10 minutes à 1500 t/min.
- Rejeter le surnageant, sans retourner complètement le tube et essuyer les parois avec un papier absorbant.
- Ajouter une goutte d'eau physiologique
- Examiner le culot sur des lames à bords non rodés jusqu'à épuisement au microscope au grossissement x 10.

 Parasitologie - Mycologie	CONCENTRATION DES FILAIRES PAR HEMOLYSE A LA SAPONINE	PARA MO5 P APAR 003 A
		Date d'application: 01/02/2011
		Page 141 sur 187

LECTURE :

Le culot ne comporte que des leucocytes et des microfilaires.

Les microfilaires restent vivantes et bien mobiles.

En cas de résultat positif :

- Faire à partir du culot une goutte épaisse calibrée colorée au Giemsa pour différenciation d'espèce.
- Compter le nombre de microfilaires par mL de sang (compter la totalité du culot)
- Le résultat devra être rendu en nombre de microfilaires par mL et par μL .

DOCUMENTS DE REFERENCE :

cahier de formation biologie médicale (BIOFORMA) N°23 :PARASITES SANGUINS 2001

3.2.6 Recherche de parasites dans les selles

3.2.6.1 Pré-analytique

La recherche de parasites dans les selles représente la principale activité du secteur de parasitologie directe. Les motifs de recherche de parasites dans les selles sont très divers et peuvent inclure tous les troubles digestifs chroniques, toute hyperéosinophilie non expliquée voire même les bilans d'adoption ou de retour de voyage en zone à risque. Les recommandations de l'ANAES de 2003 fixent les indications et les modalités de prescription d'un examen parasitologique standard des selles (43). Nous avons essayé de les synthétiser dans une aide à la prescription (*Illustration 35*).

Certaines recherches spécifiques de parasites nécessitent une prise en charge pré-analytique adaptée et très rapide, c'est le cas notamment de la recherche de formes végétatives, très fragiles, d'*Entamoeba histolytica*, pratiquée devant toute suspicion de dysenterie amibienne. Les renseignements épidémiologiques (séjour en zone à risque), cliniques (fièvre associée, immunodépression) ou encore l'aspect des selles peuvent orienter vers certaines parasitoses et impliquer des recherches spécifiques supplémentaires comme la recherche de cryptosporidies ou de microsporidies. Ces éléments essentiels sont précisés dans l'aide à la prescription mais aussi dans le catalogue des analyses du CHU.

 <p>Parasitologie - Mycologie</p>	<p>AIDE A LA PRESCRIPTION EN CAS DE SUSPICION DE PARASITOSE DIGESTIVE</p>	<p>PARA F7 P RES 001 A</p>
		<p>Date d'application: 01/02/2011</p>
		<p>Page 143 sur 187</p>

A évoquer devant un des signes suivants :

- Diarrhée aiguë > 3 jours avec traitement symptomatique
- Diarrhée 2 semaines
- Autres troubles digestifs chroniques

Chez des patients asymptomatiques :

- bilan d'une hyperéosinophilie

- voire bilan de retour de voyage (à faire au moins 3-4 semaines après le retour) ou d'arrivée en France à partir d'une zone d'endémie

Demander :

- « **Scotch®-test anal** » : oxyures ou *Taenia saginata* (les causes les plus fréquentes en France)
- « **Parasitologie des selles** » à 3 reprises (à 2/3 jours d'intervalle)

si voyage ou séjour en zone tropicale : préciser « **recherche d'anguillule** »*et acheminer rapidement les selles au laboratoire

si suspicion d'amœbose (glaires, sang) : selles émises ou laboratoire ou acheminées en moins de 30 min ; prévenir le biologiste (tel : 53916)

si diarrhée liquide et/ou associée à de la fièvre et/ou immunodépression : préciser « **recherche de cryptosporidies** » et « **recherche de microsporidies** »

EN CAS DE NEGATIVITE

<p style="text-align: center;"><u>CHEZ UN PATIENT N'AYANT JAMAIS QUITTE LA FRANCE METROPOLITAINE</u></p> <p style="text-align: center;"><u>Si hyperéosinophilie :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - En fonction du contexte, des sérologies peuvent se discuter (<i>Toxocarose, Distomatose, Trichinellose...</i>) tel : 53916 - renouveler les « Parasitologie des selles » à 3 reprises (à 2/3 jours d'intervalle), 1 mois après la première série, pour tenir compte de la phase d'invasion ou de la maturation des helminthes. 	<p style="text-align: center;"><u>CHEZ UN PATIENT AYANT VECU OU SEJOURNE EN ZONE INTERTROPICALE</u></p> <p style="text-align: center;"><u>Si hyperéosinophilie :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - renouveler la « Parasitologie des selles » à 3 reprises (à 2/3 jours d'intervalle), 1 mois après la première série, pour tenir compte de la phase d'invasion ou de la maturation des helminthes. - préciser « recherche d'anguillules » - En fonction du contexte, des sérologies peuvent se discuter (<i>Bilharziose, Filariose...</i>) tel : 53916
---	--

EN POST THERAPEUTIQUE (1 à 3 mois selon le parasite) :

- une « **Parasitologie des selles** » à 3 reprises (à 2/3 jours d'intervalle)

* Recherche systématique avant tout traitement immunosuppresseur chez un patient à risque d'anguillulose

3.2.6.2 Analytique

3.2.6.2.1 Procédure du laboratoire

L'association de plusieurs techniques basées sur l'identification au microscope permet, au regard de la bibliographie, un diagnostic convenable de la majorité des éléments parasitaires rencontrés dans les selles.

Comme conseillé par l'ensemble des données de la littérature (14) (44) (45) (46) (47) un examen parasitologique des selles standard doit combiner :

- Un examen direct à l'état frais
- Une technique de concentration diphasique
- Une technique de concentration par flottation
- Une technique d'enrichissement sélective (Baermann), le cas échéant

Les techniques de concentration diphasiques dérivent toutes de celle de Telemann (1908) consistant à triturer la selle avec un mélange composé à parties égales d'éther et d'acide chlorhydrique puis à tamiser l'émulsion fécale et à centrifuger. Les parasites se concentrent dans le sédiment.

La concentration parasitaire par ces méthodes physico-chimiques découle de la mise en présence de 2 phases non miscibles, l'une aqueuse, l'autre lipophile. Elles permettent la réalisation d'un coefficient de partage dont la valeur est conditionnée, pour chaque particule fécale (parasite et déchet), par sa balance hydrophile-lipophile.

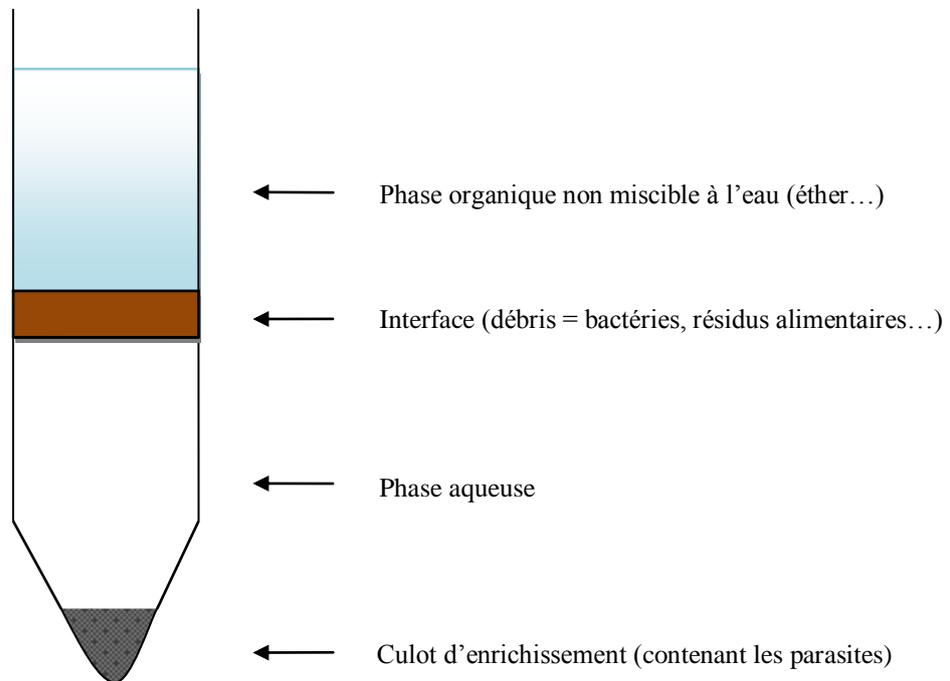
En 1962, J.Bailenger met au point une méthode susceptible de donner satisfaction dans la majorité des analyses à effectuer. Suite à de nombreuses expériences, il s'aperçoit que plusieurs facteurs ont une influence sur la concentration des œufs, des larves et des kystes, le principal étant le pH.

En testant plusieurs solutions différentes, il détermine une formule permettant d'obtenir une solution d'acéto-acétate de pH = 5 qu'il associe dans sa méthode à l'éther.

Cette méthode fait partie, avec celle du MIF des méthodes diphasiques utilisées en routine au laboratoire depuis plusieurs années, sa rapidité et sa simplicité de réalisation étant très avantageuses.

Nous avons donc évalué nos techniques du Bailenger et du MIF au cours de notre évaluation sur site.

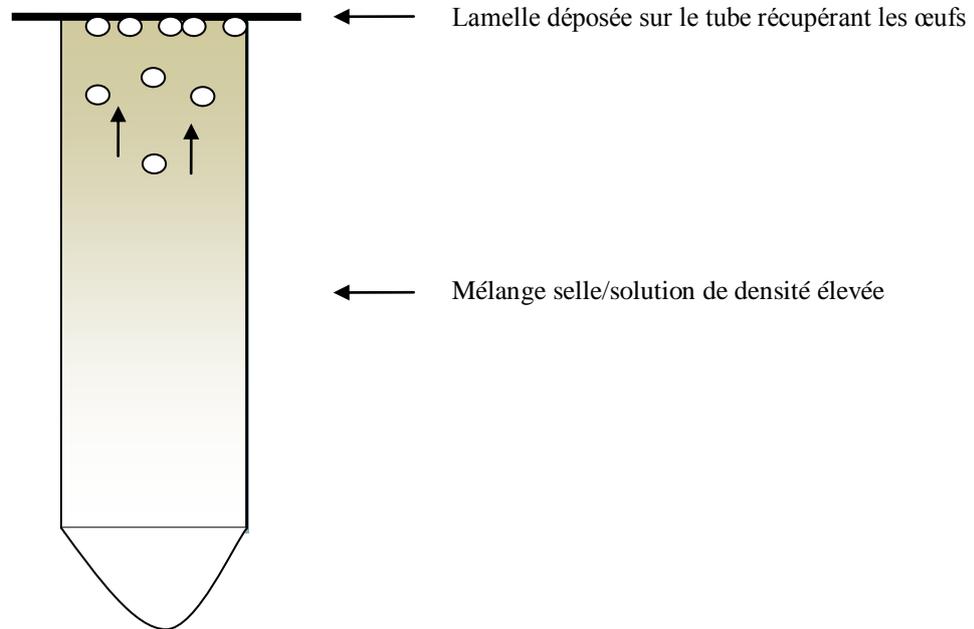
Illustration 36 : Concentration parasitaire : méthode diphasique, aspect du tube après centrifugation



Les techniques de concentration par flottation ont recours à une solution de densité élevée pour parvenir à récupérer les œufs d'helminthes ou certaines formes de protozoaires (kystes de *Giardia*, oocystes de coccidies) sur une lamelle déposée à la surface du mélange selle/solution de densité élevée.

Les méthodes de flottation réalisées au laboratoire utilisent soit le liquide de Janecko-Urbanyi, très efficace mais très toxique et néfaste pour l'environnement, soit une solution de chlorure de sodium (technique de Willis), soit une solution de sulfate de Zinc (technique d'Otto-Hewitt). Nous avons également évalué ces trois méthodes de flottation.

Illustration 37 : Concentration parasitaire : méthode de flottation



Pour la recherche spécifique d'anguillulose, nous réalisons la technique de Baermann décrite par Ambroise Thomas (14).

Notre procédure de recherche de parasites dans les selles a été adaptée aux résultats de notre évaluation sur site et les modes opératoires des différentes techniques ont été révisés.

3.2.6.2.2 Evaluation sur site

3.2.6.2.2.1 Méthode

Il s'agit de **techniques qualitatives** mettant en évidence la présence ou l'absence d'éléments parasitaires.

Il est donc étudié pour la validation de nos méthodes :

- Les sensibilités de l'examen direct, du MIF concentration, et du Bailenger concernant les principaux protozoaires intestinaux et une espèce du genre *Cyclospora*.
- Les sensibilités de l'examen direct, du MIF concentration, du Bailenger, du Willis, du Janeckso et de l'Otto Hewitt concernant les principaux œufs d'helminthes et une espèce du genre *Cyclospora*.

Bien qu'il s'agisse d'une méthode qualitative, nous avons également intégré des données quantitatives en décomptant le nombre de kystes ou oocystes présents pour 50 champs à l'objectif 40 et en décomptant le nombre d'œufs ou oocystes présents pour 50 champs à l'objectif 10 (une différence d'au moins 30% étant retenue comme significative).

Les techniques ont été réalisées à partir de **45 échantillons positifs** du CHU de Limoges et du CHU de Nice conservés à 4°C. La majorité des protozoaires et helminthes potentiellement rencontrés dans les selles en parasitologie était représentée (voir les *Tableaux 11 et 12*).

Les échantillons ont été techniqués en suivant les instructions de nos modes opératoires, dans les conditions du laboratoire.

La lecture des lames a été réalisée à l'aveugle en respectant également les modes opératoires du laboratoire.

Tableau 11 : Protozoaires et coccidie inclus dans la vérification

Protozoaires+coccidie	Nombre d'échantillons positifs
<i>Entamoeba coli</i>	12
<i>Endolimax nana</i>	5
<i>Iodamoeba butschlii</i>	1
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	2
<i>Giardia intestinalis</i>	3
<i>Chilomastix mesnili</i>	2
<i>Cyclospora</i>	1
Total	26

Tableau 12 : Helminthes et coccidie inclus dans la vérification

Helminthes+coccidie	Nombre d'échantillons positifs
<i>Trichuris trichura</i>	4
<i>Ankylostoma</i>	2
<i>Ascaris</i>	6
<i>Dicrocoelium</i>	2
<i>Hymenolepis nana</i>	3
<i>Schistosoma mansoni</i>	1
<i>Taenia sp.</i>	1
<i>Cyclospora</i>	1
Total	20

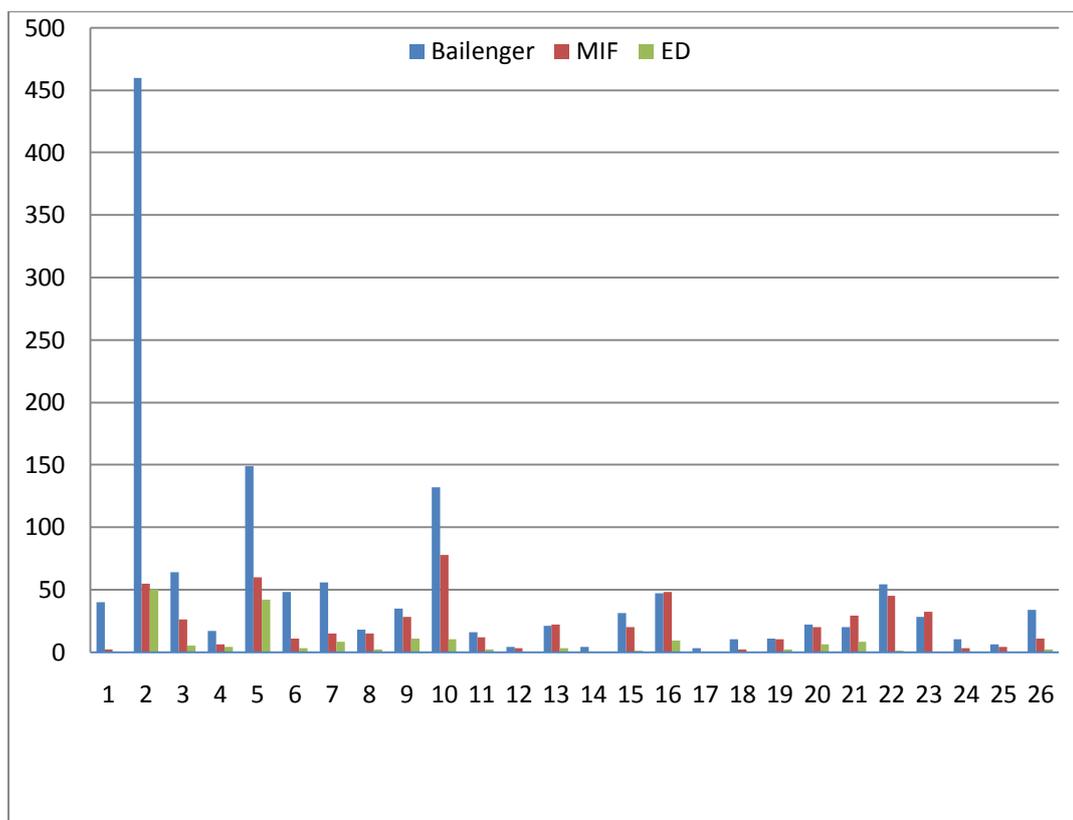
3.2.6.2.2 Résultats

Concernant les protozoaires/*Cyclospora*, les sensibilités de l'examen direct, de la méthode de MIF et du Bailenger sont respectivement de **69%**, de **92%** (2 faux négatifs à *Entamoeba coli* pour le Bailenger correspondant à des échantillons de très faible parasitisme) et de **100%**.

Les données de l'évaluation quantitative montrent que les méthodes du MIF et du Bailenger ont en général des résultats comparables et largement supérieurs à ceux de l'examen direct.

Cependant des différences significatives en faveur du Bailenger par rapport au MIF sont à remarquer concernant certaines espèces : *Endolimax nana* (n°1 à 5 sur le graphique) et *Entamoeba coli* (n°6 à 17), un échantillon de *Iodamoeba butschlii* (n°18), un de *Chilomastix mesnili* (n°24) et un de *Cyclospora* (n°26).

Illustration 38 : Nombre de kystes/oocystes pour 50 champs à l'objectif 40



Concernant les helminthes/*Cyclospora*, les sensibilités de l'examen direct, de la méthode du MIF, et du Bailenger sont respectivement de **45%**, de **50%** et de **70%** (les faux négatifs pour le Bailenger correspondent à 2 *Ascaris*, 2 *H. nana*, 1 *Trichuris* et 1 *Schistosoma*).

Les sensibilités des méthodes de flottation sont de **60%** pour l'Otto-Hewitt, **75%** pour le Willis (2 faux négatifs à *Dicrocoelium*, 1 à *Trichuris*, 1 à *H. nana*, 1 à *Schistosoma*) et **90%** pour la méthode de Janeckso-Urbanyi (faux négatifs: 1 *H. nana* et 1 *Dicrocoelium*)

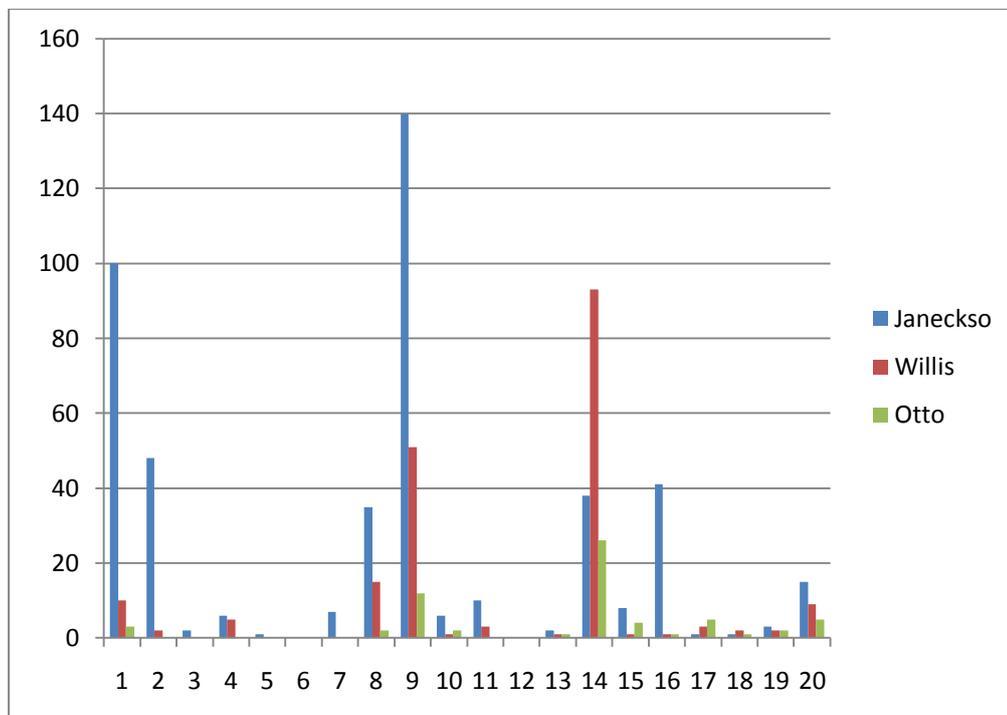
La méthode d'Otto-Hewitt est en retrait avec une sensibilité de **60%**.

L'association de la méthode du Bailenger et du Janeckso permet d'atteindre une sensibilité de **100%** contre 90% pour l'association Bailenger/Willis.

L'évaluation quantitative montre qu'il existe des différences significatives entre le Janeckso et les autres méthodes de flottation concernant les œufs de trichocéphale (n°1 à 4 sur le graphique), d'ankylostome (n°8, 9), d'*Hymenolepis nana* (n°10, 11) d'ascaris (n°15, 16), de *Schistosoma mansoni* (n°7) et les oocystes de *Cyclospora* (n°20)

La méthode de Willis est nettement supérieure à celle d'Otto-Hewitt pour les œufs de trichocéphale (n°1, 2, 4), d'ankylostome (n°8, 9) et les oocystes de *Cyclospora*.

Illustration 39 : Nombre d'œufs/oocystes pour 50 champs à l'objectif 10



Ces résultats sont en phase avec les données de la littérature (14) (44) (46), en effet la technique de Janeckso-Urbanyi est la plus sensible pour mettre en évidence les helminthes et les différentes techniques de flottation ont une sensibilité qui dépend des espèces d'helminthes : le Janeckso met particulièrement bien en évidence les gros œufs (notamment *Schistosoma mansoni*) et les œufs de trichocéphale. Le Willis est efficace pour les œufs d'*Hymenolepis nana* (un faux négatif mais très faiblement parasité). L'association Bailenger/Willis permet d'avoir une sensibilité identique à celle du Janeckso isolé.

L'ensemble des résultats justifie l'utilisation de la technique diphasique de Bailenger lors d'une recherche standard de parasites dans les selles. On choisira de lui associer la méthode de flottation de Willis lors de recherches de routine (médecine du travail), celle-ci ne présentant pas de risque de toxicité. Cependant, malgré sa toxicité, la méthode de Janeckso-Urbanyi sera préférée au Willis, en cas de suspicion d'helminthose (surtout distomatose et schistosomose) et d'hyperéosinophilie.

3.2.6.2.3 Contrôles internes

Pour assurer une évaluation continue de nos méthodes, nous effectuons un contrôle interne après chaque régénération de réactif (Bailenger, Janeckso-Urbanyi, Willis, MIF). Cette mesure nécessite la conservation d'échantillons de selles positives à 4°C dans de l'azide de sodium. La toxicité de nombreux de ces réactifs nous a incité, au regard des exigences du chapitre 5.2. de la Norme concernant la sécurité du personnel, à mettre à jour les fiches réactifs ainsi que les fiches de sécurité des substances chimiques utilisées.

Ce problème de toxicité nous mènera prochainement à évaluer une technique commercialisée (Gamme Parasep[®] SF) ayant recours à une double filtration (sans formol, ni éther, ni acétate d'éthyle) dans l'idée de remplacer nos méthodes actuelles.

3.2.6.2.4 Evaluation externe

L'évaluation externe de la qualité de notre recherche de parasites dans les selles s'appuie sur la réalisation et le suivi des contrôles AFSSAPS.

Au cours de ces contrôles, les échantillons parviennent au laboratoire sous forme de suspensions directement observables au microscope. C'est donc la capacité du personnel à mettre en évidence le parasite au microscope, à faire un diagnostic d'espèce qui est appréciée.

L'exploitation des résultats depuis 2000 n'a révélé aucune erreur majeure concernant la mise en évidence de parasites dans les selles et le diagnostic d'espèce lorsqu'il était possible.

On note un seul oubli qui concernait la selle de 2003 PAR1 et la mise en évidence de *Blastocystis hominis* secondaire dans cet échantillon parasité par *Entamoeba histolytica/dispar*.

Tableau 13 : Résultats des contrôles externes AFSSAPS (selles parasitées)

ANNEE	REponses DU LABORATOIRE	REponses ATTENDUES
2000 PAR2	microsporidies	microsporidies
2001 PAR1	<i>Entamoeba coli</i>	<i>Entamoeba coli</i>
2002 PAR1	<i>Isospora belli</i>	<i>Isospora belli</i>
2003 PAR1	<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	<i>Entamoeba histolytica/dispar</i> <i>Blastocystis hominis</i>
2003 PAR2	<i>Ascaris lumbricoïdes/Trichuris trichura</i>	<i>Ascaris lumbricoïdes/Trichuris trichura</i>
2004 PAR1	<i>Endolimax nanus</i>	<i>Endolimax nanus</i>
2004 PAR2	<i>Giardia intestinalis</i>	<i>Giardia intestinalis</i>
2005 PAR1	<i>Paragonimus westermani</i>	<i>Paragonimus westermani</i>
2005 PAR2	Œufs d'Ankylostomidés	Œufs d'ankylostomidés
2006 PAR1	<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>
2007 PAR1	<i>Taenia sp.</i>	<i>Taenia sp.</i>
2008 PAR1	<i>Endolimax nana</i>	<i>Endolimax nana</i>
2009 PAR1	<i>Giardia intestinalis</i>	<i>Giardia intestinalis</i>
2010 PAR1	Absence de parasite	Absence de parasite

3.2.6.3 Post-analytique

Lors d'une recherche de parasites dans les selles, l'étape post-analytique est décisive dans la qualité de la prise en charge ultérieure du patient. En effet, il est important que le clinicien connaisse les limites du résultat rendu par le laboratoire et qu'il soit en mesure de l'interpréter correctement.

Pour bien interpréter un résultat, il est essentiel de maîtriser plusieurs notions :

- L'émission intermittente des éléments parasitaires dans les selles (kystes, œufs, formes végétatives...) ne permet pas d'exclure formellement une parasitose digestive à partir d'un unique examen négatif. De même, la mise en évidence d'un ou plusieurs parasites sur un seul échantillon de selles n'élimine d'autres parasitoses associées. Il est donc recommandé d'effectuer au moins 3 examens parasitologiques des selles espacés de quelques jours (43) (45).
- De plus, lorsqu'ils sont réalisés pendant la phase d'invasion larvaire (schistosomose, distomatose...), les 3 examens seront négatifs et il sera important de les renouveler à distance en cas de forte suspicion (43).
- Le laboratoire peut être amené à mettre en évidence des protozoaires, des flagellés ou autres parasites peu connus du médecin prescripteur et pour lesquels le rôle pathogène n'est pas démontré.

Nous avons donc mis en place une procédure de validation biologique destinée à assurer la présence sur le compte-rendu de commentaires adaptés aux différentes situations possibles et permettant au clinicien d'adapter la conduite à tenir. Chaque commentaire est associé à un code dans le logiciel GLIMS permettant une saisie rapide.

Tableau 14 : Commentaires codifiés des résultats d'examens parasitologiques des selles

SITUATIONS	CODES	SIGNIFICATIONS
<u>Absence de parasite sur selles de médecine du travail</u>	SEL1-2_NEGMT	Un examen parasitologique des selles négatif n'exclut pas une parasitose.
<u>Absence de parasite (Hors MT) sur selles n°1 ou n°2</u>	SEL1-2_NEG	Un examen parasitologique des selles négatif n'exclut pas une parasitose, 3 examens parasitologiques des selles à 2-3 jours d'intervalle sont nécessaires. En cas de suspicion d'oxyurose ou de <i>taeniasis</i> , prescrire préférentiellement un Scotch [®] -test anal.
<u>Absence de parasite après 3 examens successifs des selles (hors médecine du travail)</u>	SEL3_NEG	L'absence d'élément parasitaire après 3 examens des selles n'exclut pas une parasitose (phase d'invasion des helminthoses, émission intermittente). En cas de forte suspicion, renouveler une série de 3 examens parasitologiques des selles dans 3 semaines. En fonction du contexte clinique et épidémiologique, des examens complémentaires peuvent être envisagés après concertation clinico-biologique.
<u>Présence d'un parasite pathogène sur selles n°1 ou n°2</u>	SEL1-2_POS	Un examen parasitologique des selles positif n'exclut pas un ou plusieurs autres parasites associés, 3 examens parasitologiques des selles à 2-3 jours d'intervalle sont nécessaires. En cas de suspicion d'oxyurose ou de <i>taeniasis</i> , prescrire un Scotch [®] -test anal.
<u>En cas d'organisme non pathogène</u> (<i>Blastocystis hominis</i> , amibes autres qu' <i>Entamoeba histolytica</i> , flagellés autre que <i>Giardia intestinalis</i>)	SEL1-2_RPND	Rôle pathogène non démontré ou à discuter, présence témoin d'une contamination d'origine fécale. Un examen parasitologique des selles positif n'exclut pas un ou plusieurs autres parasites associés, 3 examens parasitologiques des selles à 2/3 jours d'intervalle sont nécessaires. En cas de suspicion d'oxyurose ou de <i>taeniasis</i> , prescrire un Scotch [®] -test anal.
	SEL3_RPND	Rôle pathogène non démontré ou à discuter, présence témoin d'une contamination d'origine fécale.

3.2.7 Recherche de schistosomose urinaire

La schistosomose ou bilharziose est une parasitose très répandue en zone tropicale. Elle est relativement fréquente parmi les voyageurs qui se rendent en Afrique.

La découverte d'une hématurie chez un patient ayant séjourné en zone d'endémie doit faire suspecter une bilharziose urinaire à *Schistosoma haematobium*. Après un bain en eau douce infestée, le parasite pénètre à travers la peau en une dizaine de minutes. Les schistosomules gagnent le foie et deviennent des vers adultes. Après copulation, les vers migrent vers leur lieu d'élection, en particulier les veines péri-vésicales pour *Schistosoma haematobium*. Les femelles pondent des œufs qui tombent dans la vessie et sont éliminés dans les urines. Dans l'eau douce, les œufs éclosent et libèrent les embryons ciliés ou *miracidium*. Ceux-ci nagent dans l'eau et pénètrent dans un mollusque, le bulin, où ils se multiplient. Ils en ressortent sous forme de larves aquatiques ou furcocercaires qui doivent pénétrer dans un organisme vivant, Homme ou animal pour poursuivre le cycle. Il s'écoule deux mois entre l'infestation et l'élimination des œufs dans les urines (12).

Le diagnostic est en général suspecté devant le contexte épidémiologique (séjour en Afrique intertropicale), une hématurie (20% des cas) et/ou une hyperéosinophilie sanguine (82% des cas) (48) (49).

Cependant, les symptômes cliniques et l'intensité de l'hyperéosinophilie varient selon le stade de la maladie. La pénétration transcutanée des larves peut être accompagnée d'un prurit passager. Pendant la migration des schistosomules à travers l'organisme, l'hyperéosinophilie est souvent élevée. Les patients sont généralement asymptomatiques mais peuvent présenter une asthénie fébrile ou d'autres signes peu spécifiques (troubles digestifs...) plus ou moins intenses. Au bout de 10 à 12 semaines, apparaît le signe principal de l'infection à *Schistosoma haematobium* : l'hématurie terminale (car vésicale) pouvant être associée à d'autres signes urinaires. A ce stade, l'hyperéosinophilie est également un élément diagnostique important même si elle est souvent moins élevée que lors de la phase d'invasion (48) (49).

3.2.7.1 Pré-analytique

3.2.7.1.1 Aide à la prescription

Pour qu'une recherche de schistosomose urinaire soit rentable et que le résultat rendu soit interprétable, il est indispensable que la prescription associe la recherche directe du parasite (dans les urines voire dans les selles) à une recherche indirecte moins spécifique mais positive à un stade plus précoce.

Lorsque l'on analyse l'ensemble des recherches de schistosomose urinaire réalisées au laboratoire en 2009 et en 2010, on s'aperçoit que seulement 20 recherches sur 54 ont bénéficié de l'association de la technique directe et une sérologie.

Une action préventive doit absolument être mise en place pour réduire ces erreurs au moment de la prescription.

Si la recherche directe est négative malgré une sérologie positive ou une forte suspicion, il sera indispensable que le prescripteur demande une nouvelle série d'examens directs à distance (1 mois). La première ayant potentiellement été réalisée pendant la phase d'invasion au cours de laquelle il n'y a pas encore de ver adulte et, par conséquent, pas d'œuf émis. Ces modalités de prescription ne sont pas toujours respectées en pratique.

Afin d'améliorer la qualité de la prescription, nous avons donc établi une aide à la prescription (*Illustration 40*). Le rôle du laboratoire étant également indispensable dans le suivi du traitement, nous y avons intégré des informations concernant la périodicité et les modalités de cette surveillance post-thérapeutique.

3.2.7.1.2 Importance des conditions de prélèvement

La recherche directe du parasite dans les urines devra être réalisée sur les urines des 24 heures ou en cas d'impossibilité sur miction complète matinale après effort physique pré-mictionnel (montée d'escalier, sautilllements...). Celui-ci permet de détacher les œufs enchassés dans la muqueuse vésicale (12). Ces conditions de prélèvement sont précisées dans le catalogue des analyses du CHU.

 <p>Parasitologie - Mycologie</p>	AIDE A LA PRESCRIPTION : Recherche de Schistosomose urinaire	PARA F9 P RES 001 A
		Date d'application: 01/02/2011
		Page 157 sur 187

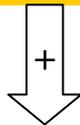
DANS UN BUT DIAGNOSTIQUE

NOTION DE SEJOUR EN ZONE D'ENDEMIIE :

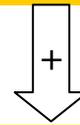
- Afrique
- Madagascar
- Proche Orient

+

BAINS EN EAU DOUCE



HYPEREOSINOPHILIE
avec séjour récent <2 mois
± fièvre, urticaire



HEMATURIE
Avec séjour il y a plus de
2 mois
+/- hyperéosinophilie

Demander :

- une « schistosomose sérologie »
- une parasitologie directe des urines X3
- une parasitologie des selles X3

Redemander à distance (1 mois) :

- une parasitologie directe des urines x 3
- une parasitologie des selles x 3
(En cas de première recherche négative)

En cas de recherche négative et de forte suspicion, une biopsie de muqueuse vésicale et/ou rectale est à discuter avant d'éliminer le diagnostic

DANS UN BUT THERAPEUTIQUE

Demander 2, 6 et 12 mois après le début du traitement :

- une « schistosomose sérologie »
- une parasitologie directe des urines (viabilité des œufs)
- une parasitologie des selles (viabilité des œufs)
- une recherche de Schistosome dans biopsie muqueuse rectale et/ou vésicale (viabilité des œufs)

3.2.7.2 Analytique

3.2.7.2.1 Procédure du laboratoire

Notre procédure de recherche de schistosomose urinaire est rattachée à la procédure générale de recherche de parasites dans les urines.

Le diagnostic de certitude est porté par la mise en évidence des oeufs dans les urines, dans les selles ou sur biopsie de muqueuse rectale, d'œufs ovoïdes de 150 sur 60 micromètres pourvus d'un éperon terminal caractéristique (12) (48).

Les techniques de filtration et de centrifugation des urines permettent d'augmenter la sensibilité de la recherche (12).

Illustration 41 : Photographie d'un œuf de S. haematobium (140µm) avec son éperon terminal



A Limoges, nous effectuons préférentiellement la recherche directe de *Schistosoma haematobium* dans les urines après filtration (membrane de polycarbonate), méthode sensible et fidèle. Nous avons révisé notre mode opératoire.

Le personnel doit être sensibilisé à la difficulté de reconnaître les œufs lorsqu'ils sont recouverts de débris cellulaires (*Illustration 42*).

Nous associons à cette recherche la réalisation d'un test sérologique par hémagglutination indirecte (BILHARZIOSE FUMOUCZE®) permettant d'optimiser notre sensibilité diagnostique.

 Parasitologie - Mycologie	RECHERCHE DE SCHISTOSOMA HAEMATOBIMUM DANS LES URINES	PARA MO1 P APAR 002 A
		Date d'application: 01/02/2011
		Page 159 sur 187

INDICATIONS :

Cf. Aide à la prescription [PARA F9 P PREA 001 .doc](#)

La recherche s'effectue à partir des urines de fin de miction émises après effort (monter les escaliers) ou bien la totalité des urines de 24 heures.

MATERIEL :

- Seringue stérile de 20mL
- Porte filtre
- Filtre polycarbonate Wathmann® 12µm (réf :7060-2516)
- Pince
- Centrifugeuse
- Microscope
- Lame et lamelles
- Pipette Pasteur ou dispositif d'aspiration
- Tube plastique de 30mL

REACTIFS :

- Acide acétique 3%

TECHNIQUE :

- *Si les urines sont claires : réaliser la technique du filtre*
 - Dévisser le porte filtre
 - Sur la partie inférieure du porte filtre, installer le filtre en polycarbonate face brillante vers le haut
 - Revisser soigneusement le porte filtre
 - Remplir la seringue avec l'urine à analyser
 - Insérer la seringue sur le porte filtre
 - Filtrer la totalité des urines
 - Dévisser et mettre la membrane à l'aide d'une pince sur une lame porte objet
 - Ajouter une goutte d'eau physiologique
 - Recouvrir d'une lamelle
- *Lors d'urines chargées en cristaux ou hématies :*
 - Prendre un tube plastique, le remplir d'urines avec quelques gouttes d'acide acétique à 3% et centrifuger à 2000 t/min pendant 10 minutes
 - Jeter le surnageant et lire au microscope jusqu'à épuisement, la totalité du culot.
- *Urines de 24 heures :*
 - Laisser décanter pendant une nuit
 - Aspirer la partie supérieure en ne laissant qu'environ 20mL dans le fond
 - Centrifuger la totalité du reste d'urines
 - Lire le culot en entier au microscope grossissement x10 et x20
 - Ou le filtrer à l'aide du filtre de la même manière que précédemment



LECTURE :

- Lire au microscope x10 et x20
- Rechercher des œufs de *S. haematobium* (150µm de long avec éperon terminal)
- Apprécier leur viabilité par la recherche de miracidium (dans l'œuf ou après éclosion) et la mobilité de leurs nombreux cils périphériques

*Œuf de *S. haematobium* avec son éperon terminal
(et son miracidium) retenu par les pores du filtre.*



*A une échelle inférieure, miracidium hors de son
œuf avec ses nombreux cils vibratiles.*



*Parfois les œufs sont plus difficilement identifiables
(œuf accompagné de nombreux débris cellulaires)*



DOCUMENTS DE REFERENCE :

Y. J. Golvan, P. Ambroise-Thomas, LES NOUVELLES TECHNIQUES EN PARASITOLOGIE, 1984, FLAMMARION

3.2.7.2.2 Evaluation des méthodes : corrélation entre recherche directe et sérologie

La mise en évidence des œufs de *Schistosoma haematobium* dans les urines est considérée comme la méthode de référence puisqu'elle permet le diagnostic de certitude de schistosomose urinaire (12).

Cependant, la réalisation conjointe d'une technique sérologique est indispensable car si la recherche directe est réalisée lors de la phase d'invasion parasitaire, l'excrétion inconstante des œufs peut être à l'origine de faux négatifs (48).

Les résultats des évaluations du test d'hémagglutination indirecte (BILHARZIOSE FUMOUIZE®) annoncés par le fournisseur montrent une sensibilité de 84.4% et une spécificité de 96.9%.

Au laboratoire, au cours des années 2009 et 2010, 15 recherches de schistosomose urinaire ont été réalisées en associant la technique directe et de la technique indirecte (*Tableau 15*). L'étude des résultats nous permet d'évaluer la corrélation entre ces deux méthodes ainsi que la sensibilité et la spécificité de l'hémagglutination indirecte (par rapport à la méthode de référence qu'est l'examen direct).

Sur les 15 recherches directes dans les urines, 2 ont permis de mettre en évidence *Schistosoma haematobium*, la sérologie était à chaque fois positive avec une réaction significative d'une infection évolutive (titre ≥ 160). La **sensibilité diagnostique** du test sérologique est alors de **100%**.

Par contre, 2 recherches sérologiques supplémentaires étaient positives (titres à 320 et 80) malgré la négativité de la recherche dans les urines. Si on les considère comme des faux positifs, la **spécificité** est alors de **84%**. En réalité, la sérologie titrée à 320 correspondait à une infection à *S. haematobium* en phase d'invasion confirmée ultérieurement par un autre examen des urines et la sérologie titrée à 80 correspondait à une schistosomose urinaire récemment traitée. La **spécificité diagnostique** réelle de l'hémagglutination indirecte est donc de **100%** dans cette évaluation.

Sur l'ensemble des 15 recherches, **la corrélation de nos deux méthodes est de 87%**. Les deux discordances correspondent à 2 recherches directes négatives (une pendant la phase d'invasion et une après traitement) illustrant en fait la complémentarité des deux techniques.

Tableau 15 : Recherches de schistosomose urinaire à Limoges retenues pour l'évaluation

RECHERCHES DE SCHISTOSOMOSE URINAIRE EN 2009			
Patient	RECHERCHE DIRECTE	SEROLOGIE	DATE
1	négative	négative	06-févr
2	négative	négative	13-févr
3	positive	320	13-mai
	positive*	Non demandée*	mai
	positive*	Non demandée*	juin
4	négative	négative	05-juin
	négative	négative	03-juil
	négative	négative	18-sept
	négative*	Non demandée*	
	négative*	Non demandée*	
5	négative	320	01-oct
	positive*	Non demandée*	01-nov
	positive*	Non demandée*	01-nov
	positive*	Non demandée*	01-nov
RECHERCHES DE SCHISTOSOMOSE URINAIRE EN 2010			
6	positive	320	05-janv
	négative	80	02-mars
	négative	négative	03-juin
7	négative	négative	06-mai
8	négative	négative	septembre
9	négative	négative	06-juin
	négative	négative	04-août
10	négative	négative	22-juil

*Résultats non pris en compte (étude de corrélation impossible)

3.2.7.3 Post-analytique

Le résultat est validé par un biologiste qui, en fonction des éléments pré-analytiques et analytiques, interprétera le résultat sur le compte-rendu.

DISCUSSION

1. LES AVANCEES

L'objectif de la Biologie Médicale est de contribuer à la prévention, au dépistage, au diagnostic, à la décision thérapeutique et au suivi de l'état de santé des patients. Elle est construite pour les patients et non pour les professionnels, tout en sachant qu'il est de l'intérêt des patients d'avoir des professionnels compétents, aux connaissances régulièrement actualisées. Au-delà de l'analyse biologique, le plus important est la réponse apportée à une question clinique par un examen approprié, réalisé dans les meilleures conditions de coût et de qualité possible. C'est en essayant d'adhérer à cette politique prônée par le Rapport Ballereau que nous avons élaboré ce travail.

Il en ressort de nombreuses satisfactions personnelles, professionnelles et déontologiques car nous avons fait en sorte de répondre au maximum aux exigences de la Norme NF EN ISO 15189 tout en privilégiant l'intérêt du patient.

Nous avons progressé dans la gestion de toute notre documentation par la mise en place d'une architecture documentaire structurée, la création de nouveaux documents indispensables et la révision/approbation des documents relatifs à la parasitologie directe. La mise au point de fiches d'habilitation permet une meilleure traçabilité de la formation initiale du personnel.

Nous avons greffé à ces mesures propres au management de la qualité un ensemble d'actions destinées à répondre aux exigences techniques de la Norme.

En effet, à partir de procédures techniques et de modes opératoires révisés et actualisés, nous avons pu envisager la validation de nos méthodes. S'agissant de techniques qualitatives souvent anciennes, un important travail de vérification bibliographique a été mené. La vérification sur site de leurs performances, bien que parfois non applicable, a été la plus approfondie possible, notamment pour la recherche de paludisme. Nous avons constitué pour cette parasitose un dossier de vérification des méthodes qui pourra faire partie de ceux qui seront proposés au Cofrac lors de la demande d'entrée du CHU dans la démarche d'accréditation.

La qualité du résultat en parasitologie directe étant largement dépendante de la compétence du personnel, la mise en place de contrôles internes de qualité permettra de contribuer à la formation continue indispensable du personnel.

Les exigences techniques ne concernent pas que la phase analytique de l'examen et nous avons essayé d'améliorer la coopération du laboratoire avec le personnel médical en proposant

des conseils quant à la pertinence des analyses demandées que ce soit lors de la phase pré-analytique par l'amélioration du manuel de prélèvement et la mise en place d'aides à la prescription ou lors de la phase post-analytique par des commentaires adaptés.

Ce travail a le mérite de constituer un élément d'initiation et de sensibilisation du personnel à la démarche qualité. Il a également permis de soulever des problèmes jusque-là ignorés. Il laisse envisager l'adhésion de l'ensemble du service à une politique d'amélioration continue de la qualité.

2. LES LIMITES ET LES PERSPECTIVES

2.1 LES MESURES RESTANT A METTRE EN PLACE

2.1.1 Recherche d'amibes libres

Parmi ces protozoaires, *Naegleria*, et *Acanthamoeba* sont les principaux genres pathogènes pour l'Homme. Ils peuvent être responsables, selon les espèces, de méningo-encéphalites (*Naegleria fowleri*), d'encéphalites (*Acanthamoeba spp*) ou de pathologies oculaires (*Acanthamoeba spp*). Le diagnostic ne peut être fait que par la mise en évidence directe du parasite dans le prélèvement à partir de l'examen direct et/ou après culture sur milieu enrichi en bactéries. Il est essentiel de maîtriser les différentes phases de cette recherche peu fréquente en s'assurant de la qualité du prélèvement et des méthodes analytiques. Une technique PCR existant au laboratoire aidera à la validation des méthodes classiques.

2.1.2 Recherche de cryptosporidies et de microsporidies

Nous avons évalué, au cours de ce travail, nos méthodes de recherche standard de parasites dans les selles. Cependant, faute d'échantillons positifs disponibles, les recherches spécifiques de cryptosporidies et de microsporidies n'ont pas été abordées. Les validations des méthodes utilisées au laboratoire (coloration de Ziehl-Neelsen modifiée pour les cryptosporidies et trichrome de Weber pour les microsporidies) devront donc être envisagées prochainement par la mise en place de contrôles externes de qualité.

2.1.3 L'environnement : Hygiène et Sécurité

2.1.3.1 Séparation des produits chimiques

Dans le chapitre 5.2, la Norme met l'accent sur la sécurité du personnel, la sécurité des locaux et également sur le traitement et l'élimination des déchets.

L'utilisation de produits chimiques parfois toxiques et incompatibles entre eux a nécessité une mise à jour des fiches réactifs et des fiches de sécurité. Les principes de séparation des produits chimiques devront être respectés lors du déménagement du secteur (50).

2.1.3.2 Sorbonne

Pour le respect de l'environnement, il est indispensable de disposer d'une sorbonne équipée d'un système adapté de collecte et d'évacuation des produits chimiques utilisés :

- La sorbonne à registre est destinée à la manipulation de solvants, aérosols et vapeur d'eau.
- La sorbonne à caisson est prévue pour les manipulations d'acides, bases et vapeurs lourdes, à froid. Un caisson étanche permet la récupération des condensas.
- La sorbonne d'attaque est destinée aux manipulations d'acides chauffés ou autres applications intensives de corrosifs. De l'eau, sous forme de spray, est pulvérisée par une rampe, en partie haute du caisson. Les condensas sont collectés et éliminés en partie basse. Un caisson assécheur d'air permet la condensation des vapeurs afin d'éviter leur dissémination vers l'extérieur.

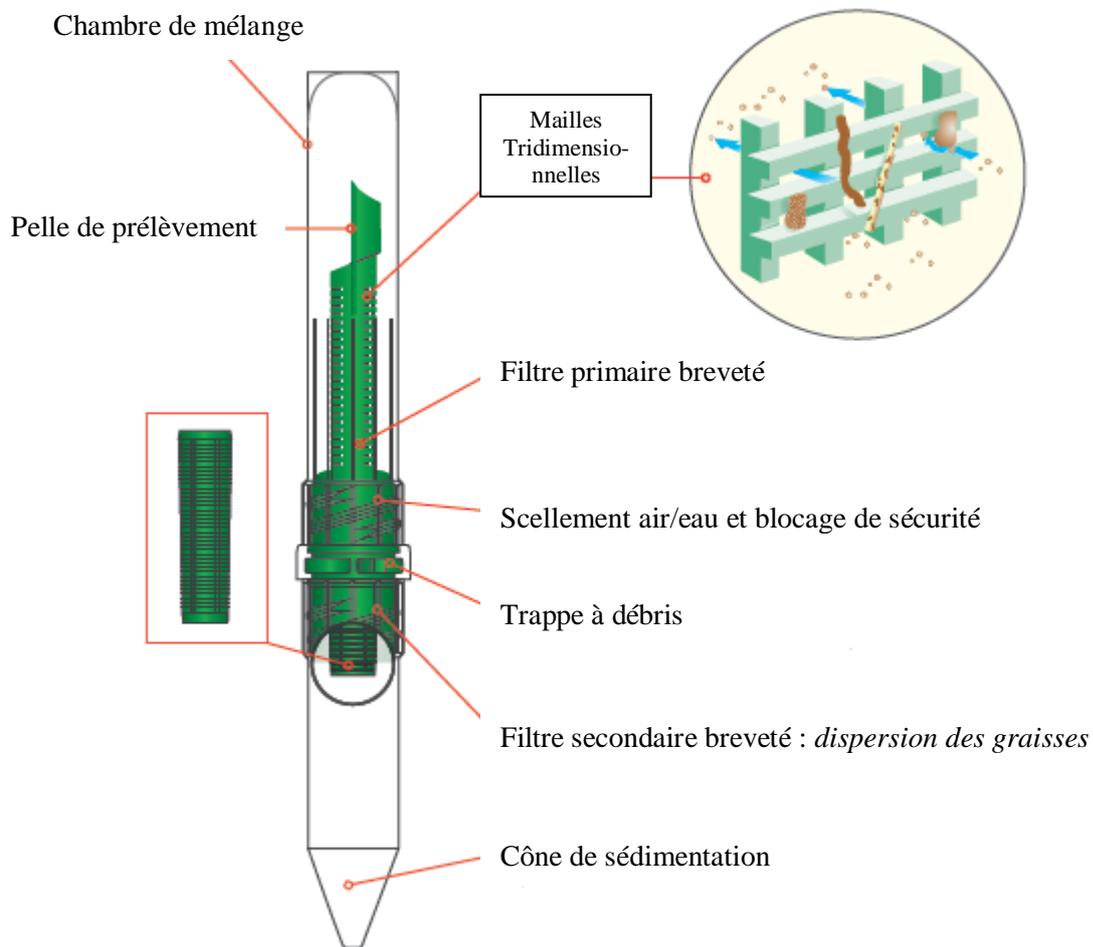
2.1.3.3 Remplacement des réactifs utilisés pour la recherche dans les selles

Les exigences concernant la sécurité du personnel nous poussent à remettre en cause l'utilisation de certains de nos réactifs comme le liquide de Janeckso (contenant du mercure) et l'éther, utilisés depuis de nombreuses années pour la recherche de parasites dans les selles. Bien que les techniques utilisant ces réactifs soient reconnues historiquement comme des techniques de référence et que nous ayons vérifié leurs performances sur site, il paraît inéluctable de les remplacer dans un avenir proche par des techniques commercialisées.

Nous exposerons ici, à titre d'exemple, le principe de la méthode Parasep[®] SF ayant recours à une double filtration. La dispersion des graisses par le filtre secondaire permet de s'affranchir de l'utilisation d'éther ou d'acétate d'éthyle. L'association d'une chambre de mélange cloisonnée et d'un système de filtration jetables après centrifugation du système permet de limiter les risques d'exposition du personnel aux réactifs et agents infectieux. Le principe de la technique est résumé dans la page suivante.

Pour le choix du kit, une évaluation des performances sur site est à envisager, notamment par l'étude de la corrélation avec nos techniques actuelles. Le principal facteur limitant de cette vérification est la faible quantité d'échantillons parasités disponibles. Une étude du coût de ces méthodes commercialisées est également nécessaire.

Illustration 43 : Principe de la méthode Parasep[®] SF



2.1.4 Les contrôles externes de qualité

La mise en place et le suivi de contrôles externes de qualité font partie des éléments essentiels de la Norme. Ils permettent de participer à la formation continue du personnel et à l'évaluation continue des méthodes utilisées.

Le suivi des contrôles AFSSAPS en parasitologie ne peut constituer, à lui seul, une mesure suffisante d'évaluation externe de la qualité. La participation à des contrôles inter-laboratoires devra donc être envisagée.

2.1.5 La maintenance

Des procédures concernant la maintenance du matériel du laboratoire sont indispensables. Une traçabilité de cette maintenance (microscopes, centrifugeuse, balances...) est requise.

2.1.6 Gestion des non-conformités

Notre procédure de gestion des non-conformités doit être associée à la mise en place d'actions préventives et correctives. Leur évaluation doit permettre de prouver l'amélioration du système.

2.1.7 Un travail à inclure dans une démarche collective

Pour que ce travail ait un intérêt, il est essentiel que les procédures mises place soient appliquées, mais aussi réévaluées et remises en question. La qualité ne se résume pas à un ensemble de documents destinés à être mis en vitrine, c'est l'ensemble du personnel qui doit faire vivre le système par une implication constante avec pour objectif l'amélioration continue du laboratoire de Biologie Médicale.

Il est donc important que chacun participe à cette démarche qualité. Ceci passera à l'avenir par des réunions plus régulières au sein du service et la mise en place de groupes de travail.

Des audits internes réguliers doivent également être appliqués afin de faire progresser continuellement le système.

2.2 LE FUTUR BATIMENT DE BIOLOGIE MEDICALE

La perspective proche (en 2013) du regroupement des laboratoires de Biologie Médicale du CHU dans un nouveau bâtiment laisse de nombreuses interrogations concernant les futures conditions environnementales de travail. De nombreuses réunions interdisciplinaires fédérées par la cellule qualité permettent d'organiser le futur laboratoire hospitalier de Limoges et de

justifier les aménagements à prévoir en fonction des exigences de la Norme et des différentes spécialités.

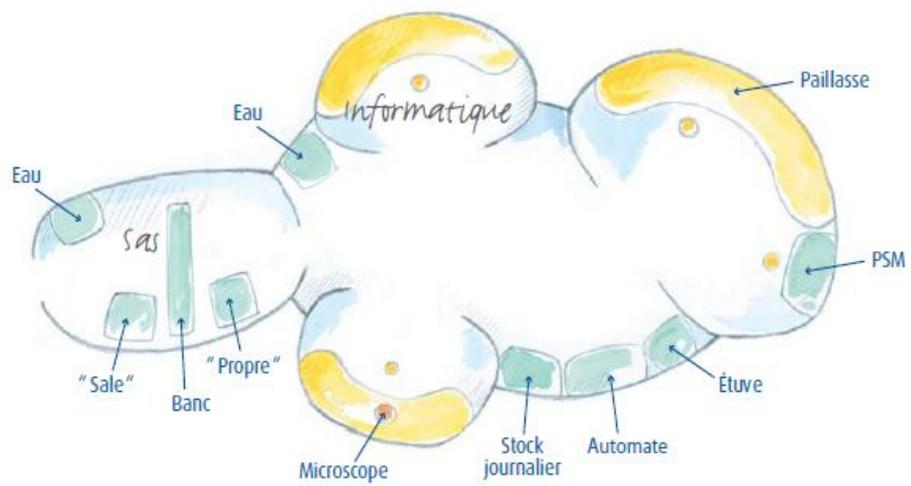
Dans ce contexte, nous avons difficilement pu aborder les exigences relatives aux locaux et conditions environnementales actuelles, telles que l'absence de sorbonne pour la réalisation des examens parasitologiques des selles.

Pour le futur bâtiment, des questions restent en suspens concernant l'organisation liée à l'activité de prélèvement. Une procédure générale, commune aux différents services, devrait être mise en place. Cependant, nous l'avons vu précédemment, les prélèvements de parasitologie et de mycologie sont très spécifiques et nécessitent une prise en charge adaptée, parfois longue (second prélèvement de gale en cas de premier examen direct négatif) qui devra donc être prise en compte. Les recommandations de l'Institut National de Recherche et de Sécurité précisent que le laboratoire doit disposer d'au moins une salle de prélèvement située à proximité de la salle d'attente et de la salle de tri des échantillons (50). La salle de prélèvement doit également répondre à des exigences spécifiques de conception (superficie, conditions de luminosité et de température, respect de l'intimité du patient...).

Au sein de la pièce technique de microbiologie, 4 zones doivent être délimitées :

- Une zone contenant un poste de sécurité microbiologique (PSM) à l'abri des courants d'air ambiant. Ce PSM est destiné à effectuer les manipulations pouvant générer des bio-aérosols potentiellement contaminants.
- Une zone de paillasses
- Une zone calme dédiée à l'observation des lames au microscope
- Une zone « propre » (saisie informatique)

Illustration 44 : Schéma fonctionnel d'une salle de microbiologie selon l'INRS (50)



CONCLUSION

L'intérêt du patient doit être au cœur des préoccupations du système de santé. C'est un des principes de base du Rapport Ballereau à l'origine de la réforme de la Biologie Médicale. Pour permettre à chacun d'avoir accès à une biologie de qualité prouvée, l'ensemble des laboratoires français doit repenser et adapter son mode de fonctionnement. Les laboratoires du secteur privé sont, en général, bien avancés dans leur démarche d'accréditation alors que ceux du secteur hospitalier ne sont, pour la plupart, que dans une phase d'initiation à la qualité.

L'hôpital dispose d'un important réseau de professionnels de santé au sein duquel médecins, infirmiers, biologistes, techniciens doivent travailler en connexion étroite pour contribuer à une prise en charge optimale du patient. Les laboratoires hospitaliers doivent chercher à raisonner en fonction du dossier clinique du patient.

C'est dans cette direction que nous avons mené ce travail au sein du secteur de parasitologie directe de Limoges. L'évaluation de nos méthodes qualitatives a notamment été basée sur l'évolution clinique et biologique du malade. L'importance du contexte épidémiologique et des renseignements cliniques dans cette discipline a nécessité la mise en place de procédures orientées vers le dialogue clinico-biologique et la prestation de conseils.

Les niveaux de compétence du personnel au moment du prélèvement et de la recherche de parasites sont également des éléments décisifs dans la qualité du résultat rendu. Nous pouvons donc considérer les mesures d'habilitation et de formation continue mises en place comme des actions participant à la progression du service.

Le travail de management initié par la cellule qualité au sein de l'hôpital doit être relayé par les différents services du futur laboratoire afin de pouvoir envisager une entrée effective dans la démarche d'accréditation avant 2013. Nous avons donc proposé à l'ensemble de la cellule, notre dossier de validation des méthodes qualitatives de recherche de paludisme pour qu'il fasse partie des méthodes présentées en 2012 au comité français d'accréditation.

Nous espérons également que l'amélioration de notre maîtrise documentaire facilitera l'exploitation du système de gestion des documents prochainement adopté au sein de l'hôpital.

BIBLIOGRAPHIE

1. Cofrac. Norme internationale NF EN ISO 15189. 2007 Août.
2. Cofrac. EXIGENCES POUR L'ACCREDITATION DES LABORATOIRES DE BIOLOGIE MEDICALE, document LAB LABM Ref 02. 2007 Déc.
3. Cofrac. RECUEIL DES EXIGENCES SPECIFIQUES POUR L'ACCREDITATION DES LABORATOIRES DE BIOLOGIE MEDICALE, SH REF 02. 2010 Sep.
4. Cofrac. GUIDE TECHNIQUE D'ACCREDITATION EN PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, document LAB GTA 12. 2006 Nov.
5. Cofrac. GUIDE DE VALIDATION DES METHODES EN BIOLOGIE MEDICALE, document LAB GTA 04. 2004 Juin.
6. Cofrac. LES CONTROLES DE QUALITE ANALYTIQUE EN BIOLOGIE MEDICALE, document LAB GTA 06. 2005 Juillet.
7. Cofrac. GUIDE TECHNIQUE D'ACCREDITATION DE VERIFICATION/VALIDATION DES METHODES EN BIOLOGIE MEDICALE, document SH GTA 04. 2011 Jan.
8. Cofrac. GUIDE D'EVALUATION DES INCERTITUDES DE MESURE DES ANALYSES DE BIOLOGIE MEDICALE, document LAB GTA 14. 2006 Nov.
9. Légifrance.gouv.fr JORF n°17 du 21 janvier 2011 texte n°22.
10. Cofrac. www.Cofrac.fr Doc en ligne rubrique laboratoires-biologie médicale.
11. Roques C, Bessières M, Escaffre C, Berry A. Une expérience pratique d'accréditation en parasitologie-mycologie. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2010 Fév;2010(419):53-63.
12. Anofel. Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales. Elsevier Masson; 2007.
13. Bourée P, Lançon A. Diagnostic d'une hyperéosinophilie sanguine. *Revue Française des Laboratoires*. Mar;2000(321):67-71.
14. Golvan YJ, Ambroise-Thomas P. Les nouvelles techniques en parasitologie et immuno-parasitologie. Flammarion médecine-sciences; 1988.
15. CDC Dpdx. www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Training.htm.
16. Develoux M. Prélèvements parasitologiques en dermatologie. *EMC - Dermatologie-Cosmétologie*. 2005 Nov;2(4):161-169.

17. Caumes E, Bourée P. Diagnostic des parasitoses cutanées en France. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2008 Fév;2008(399):55-62.
18. Chouela et al. Diagnosis and treatment of scabies: a practical guide. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2002;3:9-18.
19. Rogowski J, Bouthry E, Pihet M, de Gentile L, Chabasse D. *Parasitologie. Revue Francophone des Laboratoires*. 2009 Mai;2009(412):75-76.
20. Erbagci Z, Ozgoztasi O. The significance of *Demodex folliculorum* density in rosacea. *Int J Dermatol.* 1998;37(42):6.
21. Gautiera, F. Botterela, P. Bourée. Le *Demodex* : Commensal ou pathogène ? *Revue Française des Laboratoires*. 2001(329):23-25.
22. Recommandations sanitaires pour les voyageurs, 2010. 2010. p. 237-241.
23. Berry A, Iriart X, Magnaval J. Nouvelles méthodes de diagnostic du paludisme. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2009 11;2009(416):65-70.
24. XIIIe conférence de consensus: paludisme à *Plasmodium falciparum*. Actualisation 2007 http://www.infectiologie.com/site/medias/_documents/consensus/2007-paludisme-court.pdf.
25. Saïssy J. *Paludisme grave*. Editions Arnette; 2001.
26. Fabre R. Diagnostic du paludisme d'importation par PCR multiplex compétitive sur LightCycler™. *Diagnosis of imported malaria with multiplex PCR on LighCycler™ apparatus. Pathologie Biologie*. 2003 2;51(1):44-46.
27. Berry A, Fabre R, Benoit-Vical F, Cassaing S, Magnaval J. Contribution of PCR-based methods to diagnosis and management of imported malaria. *Medecine tropicale : revue du Corps de sante colonial*. 2005;65(2):176-183.
28. Lee N, Baker J, Andrews KT, Gatton ML, Bell D, Cheng Q, et al. Effect of Sequence Variation in *Plasmodium falciparum* Histidine- Rich Protein 2 on Binding of Specific Monoclonal Antibodies: Implications for Rapid Diagnostic Tests for Malaria. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006 8;44(8):2773-2778.
29. Delaunay P, Estran-Pomares C, Marty P. Diagnostic du paludisme : frottis sanguin, goutte épaisse et tests antigéniques. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2008 Juin;38(Supplement 2):S121-S123.
30. De Pina J, Garnotel E, Hance P, Vedy S, Rogier C, Morillon M. Diagnostic du paludisme d'importation en France. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2007 Nov;37(11):710-715.
31. Thellier M, Datry A, Cissé OA, San C, Biligui S, Silvie O, et al. Diagnosis of malaria using thick bloodsmears: definition and evaluation of a faster protocol with improved readability. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 2002 3;96(2):115-124.
32. OMS, "Efficacité très variable des tests de diagnostic rapide du paludisme sur le marché." 2008;

33. Duong TH, Richard-Lenoble D. Diagnostic des parasitoses à parasites sanguicoles. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2008 Fév;2008(399):29-39.
34. Rosenthal E, Marty P. Actualités sur la leishmaniose viscérale méditerranéenne. *La Revue de Médecine Interne*. 2009 Juin;30(Supplement 2):S24-S28.
35. Faucher B, Piarroux R. Actualités sur les leishmanioses viscérales. *La Revue de Médecine Interne* [Internet]. [cité 2011 Mar 7];In Press, Corrected Proof. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VMG-511RGJJ-3/2/5bcbfda74c2cbd2099bf8eed6f31d529>
36. Chouih E, Amri F, Bouslimi N, Siala E, Selmi K, Zallagua N, et al. Les cultures sur milieu NNN dans le diagnostic biologique des leishmanioses. *Pathologie Biologie*. 2009 Mai;57(3):219-224.
37. Petithory J, Ardoin-Guidon F. Parasites sanguins: diagnostic biologique. *Bioforma*; 2001.
38. Dedet J. Les leishmanioses. *Ellipses*; 1999.
39. Paugam A. Parasitoses et atteinte neurologique. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2008 Fév;2008(399):41-53.
40. Vanhecke C, Guevart E, Ezzedine K, Receveur M, Jamonneau V, Bucheton B, et al. La trypanosomose humaine africaine en faciès épidémiologique de mangrove. Présentation, déterminants et prise en charge dans le contexte de la Guinée (2005 à 2007). *Pathologie Biologie*. 2010 Fév;58(1):110-116.
41. Buguet A., Cespulgio R., Bouteille B. Diagnostic et détermination du stade de la trypanosomose humaine africaine (maladie du sommeil). Rédigé à la suite des recommandations de la réunion d'expert à Londres en février 2006.
42. Louis J.F., Buscher P., Lejon V. Le diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine en 2001. *Médecine tropicale*. 2001;(61):340-346.
43. ANAES. Indications des examens des selles chez l'adulte. *Gastroenterol Clin Biol*. 2003;(27):627-642.
44. Gentilini M. Diagnostic en parasitologie. *Masson*; 1993.
45. Bourée P, Bisaro F. Diarrhées parasitaires. *La Presse Medicale*. 2007 Avr;36(4, Part 2):706-716.
46. Bailenger J. Coprologie parasitaire et fonctionnelle. *J. Bailenger*; 1982.
47. Petithory J, Ardoin-Guidon F, Chaumeil C, Gobert J, (Biologe TSH, Frankreich). Amibes et flagellés intestinaux: amibes oculaires : leur diagnostic microscopique : Ho Thi Sang in memoriam. *Bioforma*; 1998.
48. Agbessi C, Bourvis N, Fromentin M, Jaspard M, Teboul F, Bougnoux M, et al. La bilharziose d'importation chez les voyageurs : enquête en France métropolitaine. *La Revue de Médecine Interne*. 2006 Aoû;27(8):595-599.

49. Bourée P, Pessah C. Une hyperéosinophilie fébrile de groupe. Revue Francophone des Laboratoires. 2008 Nov;2008(406):87-90.
50. INRS. www.inrs.fr Conception des laboratoires d'analyses.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	4
LISTE DES ABREVIATIONS	13
SOMMAIRE.....	14
INTRODUCTION	14
GENERALITES	19
1. LA NORME NF EN ISO 15189 ET LES GUIDES D'ACCREDITATION.....	20
1.1 La Norme NF EN ISO 15189	20
1.2 Les guides d'accréditation du Cofrac	21
2. LES ASPECTS FONDAMENTAUX DE LA NORME.....	21
2.1 Organisation et management.....	21
2.2 Le personnel.....	22
2.3 Maîtrise documentaire	22
2.4 Traçabilité	24
2.5 Identification et maîtrise des non-conformités.....	24
2.6 Validation des méthodes.....	24
2.7 Incertitude de mesure.....	27
2.8 Prestation de conseils.....	28
3. DEROULEMENT DE LA DEMARCHE D'ACCREDITATION	29
3.1 Entrée dans la démarche d'accréditation	29
3.1.1 Option A	29
3.1.2 Option B	30
3.2 Relation avec les auditeurs.....	30
3.2.1 Avant l'audit	30
3.2.2 Déroulement de l'audit.....	30
3.2.3 Après la visite d'audit	31
3.3 Obtention de l'accréditation.....	31
APPLICATION DE LA NORME A LA PARASITOLOGIE DIRECTE DU CHU DE LIMOGES	32
1. UN TRAVAIL QUI S'INSCRIT DANS UN PROJET HOSPITALIER	33

2.	LES SPECIFICITES DE LA PARASITOLOGIE DIRECTE FACE AUX EXIGENCES DE LA NORME.....	33
3.	LES OBJECTIFS PRIORITAIRES.....	34
3.1	Analyse du risque d'erreur en parasitologie pour cibler les actions prioritaires.....	34
3.2	L'intérêt du patient : une priorité de notre démarche	36
3.2.1	Le paludisme : l'urgence diagnostique vitale.....	36
3.2.2	La gale : une nuisance constituant un problème de Santé Publique	36
3.2.3	La recherche de parasites dans les selles : principale activité du secteur	36
3.2.4	Les parasites pathogènes rares en France.....	37
3.3	La maîtrise de la documentation	37
4.	LES MOYENS UTILISES.....	38
4.1	Les documents Cofrac	38
4.2	Un modèle d'accréditation.....	38
4.3	Les ouvrages de référence.....	38
	RESULTATS.....	40
1.	PRESTATIONS DE CONSEILS	41
1.1	Les exigences de la Norme	41
1.2	Des aides à la prescription pour répondre à cette exigence	41
1.2.1	L'hyperéosinophilie sanguine : un motif fréquent de recherche parasitaire	42
1.2.2	Parasitoses tropicales nécessitant une prestation de conseils	46
1.3	Avis et interprétations.....	46
2.	EXIGENCES LIEES AU PERSONNEL	47
2.1	Pré-analytique	47
2.1.1	Personnel préleveur du laboratoire : habilitation des internes.....	47
2.1.2	Personnel préleveur n'appartenant pas au laboratoire : manuel de prélèvements et catalogue des analyses	52
2.2	Analytique.....	56
2.2.1	Des contrôles internes de qualité pour une formation continue	56
2.2.2	Autres mesures de formation.....	57
2.2.3	Habilitation au secteur de parasitologie directe.....	57
2.3	Post-analytique.....	61
3.	PROCEDURES TECHNIQUES	61
3.1	Le prélèvement est réalisé au laboratoire	61
3.1.1	Recherche de sarcoptes	62
3.1.1.1	Mode opératoire	62
3.1.1.2	Incertitude de mesure et maîtrise du risque d'erreur.....	67
3.1.2	Test à la cellophane adhésive ou Scotch®-test anal	69

3.1.2.1	Conditions de réalisation	69
3.1.2.2	Mode opératoire	69
3.1.3	Recherche de <i>Demodex folliculorum</i>	72
3.1.3.1	Commensal ou pathogène ?	72
3.1.3.2	Mode opératoire	72
3.1.4	Recherche d'onchocercose	75
3.2	Le prélèvement n'est pas réalisé au laboratoire	75
3.2.1	Gestion des non-conformités	75
3.2.2	Recherche de paludisme	76
3.2.2.1	Pré-analytique	77
3.2.2.1.1	Aide à la prescription	77
3.2.2.1.2	Fiche de renseignements	79
3.2.2.2	Analytique	81
3.2.2.2.1	Procédure et modes opératoires	81
3.2.2.2.2	Validation des méthodes	91
3.2.2.2.3	Contrôles internes de qualité	116
3.2.2.2.4	Evaluation externe de la qualité	118
3.2.2.3	Post-analytique	119
3.2.3	Recherche de leishmaniose viscérale	121
3.2.3.1	Pré-analytique	121
3.2.3.1.1	Aide à la prescription	121
3.2.3.2	Analytique	123
3.2.3.2.1	Procédure diagnostique du laboratoire	123
3.2.3.2.2	Validation des méthodes	128
3.2.3.3	Post-analytique	128
3.2.4	Recherche de trypanosomose humaine africaine	129
3.2.4.1	Pré-analytique	129
3.2.4.1.1	Motifs de la recherche	129
3.2.4.1.2	Rôle fondamental du biologiste	130
3.2.4.2	Analytique	132
3.2.4.2.1	Procédure du laboratoire	132
3.2.4.2.2	Techniques réalisées au laboratoire et leur vérification bibliographique... ..	134
3.2.4.3	Post-analytique	136
3.2.5	Recherche de filarioses	136
3.2.5.1	Pré-analytique	137
3.2.5.1.1	Aide à la prescription	137

3.2.5.2 Analytique.....	139
3.2.5.2.1 Procédure du laboratoire.....	139
3.2.6 Recherche de parasites dans les selles	142
3.2.6.1 Pré-analytique	142
3.2.6.2 Analytique	144
3.2.6.2.1 Procédure du laboratoire.....	144
3.2.6.2.2 Evaluation sur site.....	147
3.2.6.2.3 Contrôles internes	151
3.2.6.2.4 Evaluation externe.....	152
3.2.6.3 Post-analytique.....	153
3.2.7 Recherche de schistosomose urinaire	155
3.2.7.1 Pré-analytique	156
3.2.7.1.1 Aide à la prescription	156
3.2.7.1.2 Importance des conditions de prélèvement	156
3.2.7.2 Analytique.....	158
3.2.7.2.1 Procédure du laboratoire.....	158
3.2.7.2.2 Evaluation des méthodes : corrélation entre recherche directe et sérologie.....	161
3.2.7.3 Post-analytique.....	162
DISCUSSION.....	163
1. LES AVANCEES	164
2. LES LIMITES ET LES PERSPECTIVES.....	165
2.1 Les mesures restant à mettre en place	165
2.1.1 Recherche d'amibes libres.....	165
2.1.2 Recherche de cryptosporidies et de microsporidies.....	165
2.1.3 L'environnement : Hygiène et Sécurité	166
2.1.3.1 Séparation des produits chimiques.....	166
2.1.3.2 Sorbonne.....	166
2.1.3.3 Remplacement des réactifs utilisés pour la recherche dans les selles	166
2.1.4 Les contrôles externes de qualité	168
2.1.5 La maintenance	168
2.1.6 Gestion des non-conformités	168
2.1.7 Un travail à inclure dans une démarche collective	168
2.2 Le futur bâtiment de Biologie Médicale	168
CONCLUSION.....	171
BIBLIOGRAPHIE.....	173

TABLE DES MATIERES.....	177
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	182
TABLE DES TABLEAUX.....	184

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<i>Illustration 1 : Schéma du circuit classique d'un document produit en interne (d'après C. ROQUES)</i>	22
<i>Illustration 2 : Schéma de la pyramide de gestion documentaire (d'après C. ROQUES)</i>	23
<i>Illustration 3 : Aide à la prescription devant une hyperéosinophilie chez un autochtone</i>	44
<i>Illustration 4 : Aide à la prescription devant une hyperéosinophilie après séjour à l'étranger</i>	45
<i>Illustration 5 : Fiche d'habilitation des internes aux prélèvements réalisés au laboratoire</i>	49
<i>Illustration 6 : Instructions destinées aux cliniciens, préparation au Scotch[®]-test anal</i>	54
<i>Illustration 7 : Instructions destinées aux patients, préparation au Scotch[®]-test anal</i>	55
<i>Illustration 8 : Fiches d'habilitation au poste de parasitologie directe</i>	58
<i>Illustration 9 : Mode opératoire de la recherche de gale</i>	63
<i>Illustration 10 : Mode opératoire du Scotch[®]-test anal</i>	70
<i>Illustration 11 : Mode opératoire de la recherche de Demodex</i>	73
<i>Illustration 12 : Aide à la prescription recherche directe de paludisme</i>	78
<i>Illustration 13 : Fiche de renseignements lors d'une recherche de paludisme</i>	80
<i>Illustration 14 : Photographie d'un frottis mince avec 3 trophozoïtes de Plasmodium falciparum</i> ...	82
<i>Illustration 15 : Photographie d'une goutte épaisse avec nombreux trophozoïtes de Plasmodium falciparum</i>	82
<i>Illustration 16 : Procédure de recherche de paludisme (logigramme)</i>	83
<i>Illustration 17 : Mode opératoire frottis sanguin et coloration courte au May-Grünwald-Giemsa ..</i>	84
<i>Illustration 18 : Mode opératoire réalisation et coloration d'une goutte épaisse</i>	87
<i>Illustration 19 : Mode opératoire recherche d'antigènes de Plasmodium</i>	89
<i>Illustration 20 : Validation du frottis mince coloré au MGG dans la recherche de paludisme</i>	101
<i>Illustration 21 : Validation de la goutte épaisse dans la recherche de paludisme</i>	106
<i>Illustration 22 : Validation du BinaxNow Malaria[®] dans la recherche de paludisme</i>	111
<i>Illustration 23 : Préparation des contrôles internes pour coloration M.G.G.</i>	117
<i>Illustration 24 : Logigramme décisionnel devant un frottis mince positif</i>	119
<i>Illustration 25 : Logigramme décisionnel devant un frottis mince négatif</i>	120
<i>Illustration 26 : Aide à la prescription recherche de leishmaniose viscérale</i>	122
<i>Illustration 27 : Photographie de formes amastigotes intra-macrophagiques de Leishmania</i>	123
<i>Illustration 28 : Procédure de recherche de leishmanioses (logigramme)</i>	125

<i>Illustration 29 : Mode opératoire leucocentrifugation</i>	<i>126</i>
<i>Illustration 30 : Aide à la prescription recherche de trypanosomose humaine africaine.....</i>	<i>131</i>
<i>Illustration 31 : Procédure de recherche de trypanosomose humaine africaine (logigramme)</i>	<i>133</i>
<i>Illustration 32 : Photographie de Trypanosoma brucei sur frottis mince coloré au May-Grünwald- Giemsa</i>	<i>134</i>
<i>Illustration 33 : Aide à la prescription recherche de filariose</i>	<i>138</i>
<i>Illustration 34 : Mode opératoire concentration des microfilaires par hémolyse à la saponine</i>	<i>140</i>
<i>Illustration 35 : Aide à la prescription devant une suspicion de parasitose digestive</i>	<i>143</i>
<i>Illustration 36 : Concentration parasitaire : méthode diphasique, aspect du tube après centrifugation</i>	<i>145</i>
<i>Illustration 37 : Concentration parasitaire : méthode de flottation</i>	<i>146</i>
<i>Illustration 38 : Nombre de kystes/oocystes pour 50 champs à l'objectif 40.....</i>	<i>149</i>
<i>Illustration 39 : Nombre d'œufs/oocystes pour 50 champs à l'objectif 10.....</i>	<i>150</i>
<i>Illustration 40 : Aide à la prescription recherche de schistosomose urinaire</i>	<i>157</i>
<i>Illustration 41 : Photographie d'un œuf de S. haematobium (140µm) avec son éperon terminal</i>	<i>158</i>
<i>Illustration 42 : Mode opératoire recherche de Schistosoma haematobium dans les urines.....</i>	<i>159</i>
<i>Illustration 43 : Principe de la méthode Parasep[®] SF.....</i>	<i>167</i>
<i>Illustration 44 : Schéma fonctionnel d'une salle de microbiologie selon l'INRS (50)</i>	<i>170</i>

TABLE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Exigences de la Norme NF EN ISO 15189</i>	<i>20</i>
<i>Tableau 2 : Vérification initiale d'une technique qualitative, d'après LAB GTA 04 (5).....</i>	<i>26</i>
<i>Tableau 3 : Identification des facteurs d'incertitude grâce à la règle des « 5M ».....</i>	<i>28</i>
<i>Tableau 4 : Influence des facteurs d'incertitude en parasitologie directe.....</i>	<i>35</i>
<i>Tableau 5 : Recherche de sarcopte, facteurs d'incertitude et maîtrise du risque d'erreur</i>	<i>68</i>
<i>Tableau 6 : Recherches de paludisme positives du 1^{er} janvier au 27 septembre 2010.....</i>	<i>94</i>
<i>Tableau 7 : Recherches de paludisme négatives du 1^{er} janvier au 27 septembre 2010.....</i>	<i>96</i>
<i>Tableau 8 : Résultat de paludisme discordant.....</i>	<i>96</i>
<i>Tableau 9 : Approche du seuil de détection grâce au suivi post-thérapeutique.....</i>	<i>98</i>
<i>Tableau 10 : Résultats des contrôles externes AFSSAPS (frottis minces)</i>	<i>118</i>
<i>Tableau 11 : Protozoaires et coccidie inclus dans la vérification.....</i>	<i>148</i>
<i>Tableau 12 : Helminthes et coccidie inclus dans la vérification</i>	<i>148</i>
<i>Tableau 13 : Résultats des contrôles externes AFSSAPS (selles parasitées).....</i>	<i>152</i>
<i>Tableau 14 : Commentaires codifiés des résultats d'examens parasitologiques des selles.....</i>	<i>154</i>
<i>Tableau 15 : Recherches de schistosomose urinaire à Limoges retenues pour l'évaluation.....</i>	<i>162</i>

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puisse-je avoir un sort contraire.

L'Ordonnance du 13 janvier 2010, propre à la réforme de la Biologie Médicale, impose aux laboratoires français l'accréditation selon la Norme NF EN ISO 15189. L'objectif est d'améliorer et d'uniformiser le niveau de qualité de la Biologie Médicale française. Chaque laboratoire doit alors prouver au comité français d'accréditation (Cofrac) qu'il maîtrise toutes les phases de l'analyse, du prélèvement jusqu'au rendu du résultat. Une cellule qualité a donc été mise en place au sein du Pôle Biologie-Hygiène du CHU de Limoges dans le but de fédérer les initiatives et les démarches Qualité de chacun des sites du futur laboratoire hospitalier.

Dans ce contexte, le service de Parasitologie-Mycologie a initié un ensemble d'actions destinées à répondre aux exigences de la Norme. Les spécificités propres à la parasitologie directe rendent parfois difficile l'application des exigences techniques. En effet, les méthodes analytiques, basées sur la mise en évidence d'éléments parasites au microscope, sont qualitatives et la faible incidence des parasitoses en France métropolitaine rend difficilement applicable la vérification de leurs performances sur site. Un important travail de réflexion et une collaboration inter-laboratoires sont alors nécessaires.

Le service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Rangueil à Toulouse est accrédité selon la Norme NF EN ISO 15189. Nous nous sommes appuyés sur leur savoir-faire afin de constituer le dossier de validation des méthodes de recherche de paludisme et d'évaluer les performances sur site d'autres techniques.

Afin de favoriser le dialogue clinico-biologique, nous nous sommes efforcés d'établir des prestations de conseils (aide à la prescription, proposition d'une démarche diagnostique, interprétation des résultats...). Nous avons également mis en place des mesures destinées à prouver et à optimiser la qualité de la formation du personnel du secteur de parasitologie directe. La réactualisation de nos procédures techniques et leur approbation nous ont aussi permis de progresser dans la maîtrise de notre documentation.

Les actions, ainsi mises en place, participent à l'amélioration de la qualité du résultat rendu mais ne peuvent être jugées comme suffisantes. Elles doivent s'inscrire dans un processus d'amélioration continue compris et adopté par tous les acteurs de santé.

Mots clés : Accréditation, norme NF EN ISO 15189, parasitologie directe, validation des méthodes, habilitation, prescription.

Pôle Biologie-Hygiène.

Service de Parasitologie-Mycologie, CHU de Limoges.