

Le point sur..

**Accréditation
parasitologie-
mycologie**

Parasitologie

- Paludisme (et autres parasites sanguicoles)
- Parasitologie des selles
- Demodex-gale (recherche parasites cutanés)
- Même ligne de portée PM7:
 - Recherche et identification de parasites (Examen morphologique direct macro- et microscopique à l'état frais et/ou après préparation (concentration (centrifugation), fixation, coloration, culture, marquage, ...))
 - Détermination phénotypique par caractérisation immuno-enzymatique (ELISA et dérivés...) et/ou microscopie d'immunofluorescence par marquage immunocytochimique (IF) avec ou sans préparation (concentration (centrifugation), fixation, coloration, culture, marquage)

Paludisme

- 3 dossiers de vérification de méthodes
 - Frottis
 - Goutte épaisse
 - Test antigénique

Méthodes diagnostiques

Goutte épaisse (GE)

- Microconcentration (hémolyse des GR puis coloration selon la méthode de Giemsa)
- Méthode de référence – Réalisation un peu délicate et nécessite bonne expérience du lecteur Diagnostic d'espèce pas toujours possible
- Difficile si peu d'examens réalisés par le laboratoire

Frottis sanguin (FS) : Diagnostic d'ESPECE

Test rapide

- Détection de protéines spécifiques de Plasmodium (HRP-2, pLDH ou aldolase)
- Peut orienter diagnostic d'espèce (*P falciparum* et/ou autre espèce)
- Bonne sensibilité
- Pas d'évaluation de la parasitémie
- Peuvent rester positifs après la disparition du parasite dans le sang

Sensibilité des techniques

Tableau 1. Comparaison des différentes techniques de diagnostic du paludisme (adapté de [1]).

Paramètres	Microscopie optique	Microscopie à fluorescence	PCR	TDR HRP-2	TDR pLDH et HRP-2/aldolase
Sensibilité (Parasites/ μ l)	50	50	5	> 100	> 100
Spécificité	Toutes les espèces	Bonne pour <i>P. falciparum</i>	Toutes les espèces	<i>P. falciparum</i> seulement	Bonne pour <i>P. falciparum</i> et <i>Vivax</i>
Estimation de la parasitémie	Oui	Non	Non	Estimation	Estimation
Temps de réalisation	30-60 min	30-60 min	24 h	20 min	20 min
Niveau de technicité	Modéré	Modéré	Élevé	Faible	Faible
Coût par test	Faible	Modéré	Élevé	Modéré	Modéré

Minodier P, Journal de pédiatrie et de puériculture 18 (2005) 386–388

Frottis sanguin : entre 100 et 300 parasites par μ l
Goutte épaisse : 10 à 20 parasites par μ l

- Toute demande de paludisme nécessite une prise en charge urgente (délai de rendu de résultat rapide à définir)
- Définition de l'espèce (*P.falciparum* principalement) et parasitémie (entre dans la définition du paludisme grave d'importation >4%).
- Renseignements cliniques et du contexte indispensables
 - Fièvre
 - Voyage (lieu, durée, date du retour, antibioprophylaxie (oui/non/ complète ou incomplète))
 - Vomissements
 - Autre signe de gravité
 - thrombopénie.-créat-Hb

HAS recommandations décembre 2016 (veille)

Dossier de vérification de méthodes

QUALITATIVE

- Examen direct
 - Analyse et moyen de maîtrise des risques
 - 5M
 - Qualification et habilitation personnel (fréquence à définir en fonction du recrutement)
 - Notion d'urgence
 - Comparaison avec autre méthode (biblio et essai si possible)
- Test antigénique
 - Analyse et moyen de maîtrise des risques
 - 5M
 - Bibliographie sur sensibilité et spécificité diagnostique
 - Comparaison avec autre méthode (biblio et essai si possible)

	Point critique	Moyen de maîtrise	Criticité
MATIERE	Sang EDTA	Manuel de prélèvement Critères d'acceptation des échantillons	+++
	Renseignements cliniques	Questions standardisées à l'accueil	+++
MAIN d'OEUVRE	Personnel habilité	Procédure d'habilitation (initiale et continue)	+++++
MILIEU	Conditions environnementales	Surveillance métrologique	+
	Volume délivré	Pipette conforme	++
MATERIEL	Microscope	Respect du mode opératoire et des maintenances	++
	Etaleur/colorateur	Respect des recommandations fournisseurs (dont utilisation eau neutre)	+++
METHODE	Reconnaissance du parasite	Respect du mode opératoire	++++
	Estimation de la parasitémie	Respect du mode opératoire	+++
MONEY	Respect du budget	Choix éclairé	+
MANAGEMENT	Organisation du LBM	Clarification des responsabilités	+++
	Délai de rendu	Transport URGENT vers plateau technique	++++

CQI/EEQ

- Utiliser les lames d'EEQ, de patients pour l'habilitation.
- EEQ sur chaque processus
- SH GTA 06
- CQI: pour contrôler la coloration. CQI à intervalle régulier, lames blanches. (définir une bonne coloration)
- Notion de série
- CQI pour test antigénique (voir si intégré au test ou si contrôle de de migration)

habilitation

- Quizz questionnaire écrit et photos
- Lames
- EEQ/CQN
- Parasitimage
- Maintien des compétences
- Habilitation biologistes (+/- techniciens)

Réactifs

- pH (valeurs acceptable, contrôle)
- Coloration manuelle/automatisée
- Ouverture lots, traçabilité des réactifs utilisés

Interprétation

- En cas de discordance des trois tests (test rapide +, les autres -)
- Compte rendu avec les techniques
- Parasitémie pour Pf

écarts

ECART aux exigences : 5.6.1

CONCERNE : les dispositions

Constat(s) : le LBM n'a pas mis en place de plan de réalisation de CIQ pour les examens parasitologiques de selles et pour le diagnostic du paludisme

Conséquence avérée : non respect des exigences de la norme

Risque induit : erreur analytique non avérée à ce jour

Constat(s) : Il n'y a **pas de CIQ** en ce qui concerne la technique de recherche d'antigène pour le diagnostic du paludisme (réactif BINAX).

Pour la coloration MGG des frottis sanguins pour recherche de Plasmodium, **le pH** doit être 7,2 : celui-ci **n'est jamais vérifié**

Conséquence avérée : absence de respect de l'utilisation de contrôle

Risque induit : résultat erroné non avéré à ce jour

écarts

- Sur le compte rendu pour recherche de parasites sanguicoles, il n'apparaît pas la technique utilisée pour la réalisation du frottis ou goutte épaisse
- La participation au dernier CQN révèle l'identification falciparum au lieu d'ovale. Aucune action corrective n'a été engagée.
- Dans sa « Procédure technique analyse parasitologique des selles » (5.5-PG-033) le LBM définit une prise en charge des selles dans les 3 heures suivants l'émission. Cependant dans son document « Guide de prélèvements V2015 » (5.4-MO-085) ce délai est de 24h.
- Dans son document « Procédure technique analyse parasitologique des selles » (5.5-PG-033-02) le LBM décrit la préparation, sur le plateau technique, de la solution mère de mercurothiolate constitutive du MIF par mélange de teinture de mercurothiolate, de glycérine, de formol et d'eau distillée.
Cette préparation de fabrication « maison », dont la stabilité est annoncée de 3 mois à l'abri de la lumière, n'a fait l'objet d'aucune qualification ni validation.

Mycologie-levures

IDEM BACTERIOLOGIE

(attention au logo Cofrac si on accrédite que la bactério ou que la mycologie levures (ECBU-PV...))

- PM1 : Recherche et identification de champignons, et/ou de levures, et/ou de filaments mycéliens et champignons exotiques : Examen morphologique direct macro- et microscopique à l'état frais et/ou après préparation
- PM2 : ensemencement (sur site périphérique)
- PM3 : hémocultures (fongiques) Recherche de germes fongiques, analyse chimique après culture
- PM4 : identification
- PM5 : antifongigramme

Dermatophytes

- PM1 : Recherche et identification de champignons, et/ou de levures, et/ou de filaments mycéliens et champignons exotiques : Examen morphologique direct macro- et microscopique à l'état frais et/ou après préparation
- PM2 : ensemencement (sur site périphérique)
- PM4 : identification

Dermatophytes - Maîtrise des risques

- Matière 1^{ère}:
 - critères d'acceptation des échantillons si prélèvement fait à l'extérieur
- Matériel
 - Coloration
 - microscope
- Milieu
 - *Conditions environnementales*
- **Main d'œuvre**
 - Compétence sur les différentes phases (prélèvement, ED à l'identification)
- **Méthode**
 - **Prélèvement (qualité, qualification)+++**
 - **Recueil renseignements cliniques** : questionnaire standardisé par ex.

Au final

- Augmentation du nbre de laboratoires accrédités en parasitomyco (122 début 2017-229 mars 2018)
- 229 laboratoires (dont beaucoup sur une seule ligne de portée)
- Principalement paludisme et parasito selles.
- Pb CQI EEQ demodex gale trichomonas, parasites autres que selles et sang.