

Université Pierre et Marie Curie –
Sorbonne Universités

MÉMOIRE
POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE
« ASSURANCE QUALITÉ AU LABORATOIRE
DE BIOLOGIE MÉDICALE »
2013-2014

**Vérification d'une méthode qualitative et
habilitation du personnel pour le diagnostic du paludisme**

Dieyenaba SIBY-DIAKITE
2013-2014

Note aux lecteurs :

« Les mémoires des stagiaires du Diplôme Universitaire » et « Assurance Qualité au laboratoire de biologie médicale » sont des travaux réalisés pendant l'année de formation. Les opinions exprimées n'engagent que les auteurs. Les travaux ne peuvent faire l'objet d'une publication en tout, ou partie, sans l'accord de l'auteur et du responsable du DU concerné ».

Dieyenaba SIBY-DIAKITE

Technicienne de laboratoire

Référent qualité

Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie

Hôpital Saint-Louis

Assistance Publique Hôpitaux de Paris - APHP

1, avenue Claude Vellefaux

75475 PARIS Cedex 10

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier tous les intervenants du DU « assurance qualité » et en particulier Dr Pascal PERNET, Mme Frédérique GERRIER, Anne VASSAULT, pour la qualité pédagogique de leur enseignement.

Ensuite je remercie Dr. Nicolas GUIGUE et le Dr. Samia HAMANE, pour leur participation active à ce travail, et sans qui rien n'aurait été.

Merci également à toute l'équipe de parasitologie d'avoir investi tout ce temps précieux, qui m'a permis de réaliser ce projet.

Enfin je tiens à remercier tous mes proches pour leurs encouragements et leurs soutiens.

TABLE DES MATIERES

GLOSSAIRE	1
INTRODUCTION	2
I. La gestion documentaire	4
1. Gestion documentaire et procédures transversales.....	4
2. Procédures et Modes opératoires du paludisme.....	5
a) Le frottis sanguin (technique de référence).....	5
b) La goutte épaisse (technique de référence).....	6
c) Le test de diagnostic rapide (TDR) immunochromatographique.....	6
II. Vérification de la méthode de diagnostic du paludisme	7
1. Définir la méthode et la portée d'accréditation.....	7
a) Ligne de portée d'accréditation.....	7
b) Portées A ou B.....	7
c) Vérification de la méthode sur site en portée de type A.....	8
2. Réunir les documents de travail.....	9
3. Assurer la qualité du processus analytique.....	9
a) Traitement du prélèvement en urgence.....	9
b) Contrôle interne de la qualité.....	10
c) Contrôle externe de la qualité.....	10
4. Remplir le formulaire SH FORM 44.....	11
a) La maîtrise des risques.....	11
b) La comparaison des méthodes.....	11
III. Habilitation du personnel sur le poste paludisme	12
1. Préparer l'habilitation.....	13
a) Poste du paludisme.....	13
b) Définir les éléments à maîtriser pour être habilité sur le poste du paludisme...	13
c) Etablir des critères qualitatifs et quantitatifs d'habilitation.....	13
d) Définir la durée de l'habilitation.....	14
2. Planifier l'habilitation et habiliter.....	15
a) Grille d'habilitation et procédure associée.....	15
b) Plan de Formation.....	15
IV. Interprétation / bilan	16
1. La gestion documentaire.....	16
2. Vérification de la méthode de diagnostic du paludisme.....	16
3. Habilitation du personnel sur le poste paludisme.....	16
a) La formation théorique.....	17
b) La formation pratique.....	17
c) Contrôle des résultats de gardes.....	17
CONCLUSION	18
BIBLIOGRAPHIE	19
LISTE DES ANNEXES	20

GLOSSAIRE

- **ABREVIATION**

APHP :	Assistance Publique des Hôpitaux de Paris
B2P :	Biologie, Physiologie et Pathologie
FW :	Fernand Widal
GH :	Groupement Hospitalier
GTA :	Guide technique d'accréditation
MGG :	May Grunwald Giemsa
LBM :	Laboratoires de Biologie Médicale
LRB :	Lariboisière
SLS :	Saint Louis
SMQ :	Système de Management de la Qualité
TDR :	Test de Diagnostic Rapide

- **DEFINITION (SH REF 02)**

Accréditation : reconnaissance par un organisme faisant autorité de la compétence d'un organisme à réaliser des activités spécifiées d'évaluation de la conformité

Portée d'accréditation : Enoncé formel et précis des activités pour lesquelles le LBM demande l'accréditation ou est accrédité.

Validation (cf. ISO 9000) : Confirmation par des preuves tangibles que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue ont été satisfaites

Vérification (cf. ISO 9000) : Confirmation par des preuves tangibles que les exigences spécifiées ont été satisfaites

Habilitation : autorisation d'exécuter (des tâches, des actions, ...)

INTRODUCTION

Le Laboratoire de Biologie Médicale du pôle B2P appartient au Groupe Hospitalier Saint-Louis(SLS)/Lariboisière(LRB)/Fernand Widal(FW), constitué de 10 pôles d'activité. Il est dirigé par un chef de pôle, Mr le Pr. D. Charron, un cadre administratif de pôle, un cadre paramédicale de pôle et un RAQ de pôle. Le LBM s'organise en différentes structures (services ou secteurs spécialisés), dirigées par des biologistes médicaux chefs de service ou responsables d'unités (Annexe I). L'activité du LBM est répartie sur deux sites (SLS et LRB).

L'ordonnance 2010-49 du 13 janvier 2010 fait obligation aux LBM de faire accréditer leurs pratiques conformément à la norme NF EN ISO 15189 (1). Le Chef du pôle B2P a défini une politique qualité consistant à mettre en place, conformément aux exigences de la norme NF EN ISO 15189, un système de management de la qualité (SMQ) et à veiller à son application. En mai 2013, le LBM du pôle B2P s'est ainsi engagé dans une démarche d'accréditation et en Août 2014 le LBM est officiellement titulaire de l'accréditation COFRAC pour des analyses de biochimie et d'hématologie (numération plaquettaire et troponine T). Depuis avril 2014, elle est progressivement étendue à l'ensemble des secteurs spécialisés du LBM, qui s'engage à déposer les dossiers des examens à accréditer à hauteur de 50% de leur activité pour 2016, en vue d'une accréditation sur la totalité de l'activité du LBM en 2020. Pour y parvenir, la stratégie mise en place par le pôle est que chaque secteur spécialisé, en fonction de la famille auquel appartiennent les analyses dépose une demande d'accréditation pour 50% de leur activité. Le secteur de Parasitologie/Mycologie, souhaite entrer dans cette démarche en proposant des analyses à hauteur de 50% de son activité, en fonction du nombre de demande et de l'importance de l'analyse. Le paludisme est un examen d'urgence qui fait partie des analyses que le laboratoire souhaite accréditer en première intention.

Le diagnostic du paludisme est assuré 24h/24h, le jour au laboratoire de parasitologie de 8h à 18h, et au laboratoire de garde la nuit de 18h à 8h, les week-ends et jours fériés. L'exécution de cette analyse est sous la responsabilité du laboratoire de parasitologie qui assure la formation du personnel (techniciens et biologistes/internes). Ce laboratoire est composé de 4 unités, (sérodiagnostic, biologie moléculaire, parasitologie directe et mycologie), 1 chef de service, 1 cadre, 5 biologistes, 10 techniciens, 2 postes d'agent d'accueil et 2 postes d'agent logistique. (Annexe II).

Le paludisme est une maladie parasitaire due à *Plasmodium*. Il est transmis à l'homme par la piqûre de moustique du genre *Anophèle*. Il s'agit d'une maladie potentiellement mortelle en raison du risque d'accès graves liés à l'espèce *falciparum* (2). Le diagnostic doit être réalisé en urgence devant toute fièvre de retour d'une zone d'endémie, et le résultat doit être transmis dans les 2 heures après la suspicion clinique (3). Le laboratoire réalise environ 400 recherches de paludisme par an, essentiellement chez des patients présentant des signes cliniques après un retour de voyage dans un pays en zone d'endémie. Le diagnostic est assuré par le LBM (secteur parasitologie de jour et secteur de garde) et nécessite un savoir-faire et une maîtrise de toutes les étapes de la réalisation de cet examen. Il est donc indispensable d'évaluer les compétences du personnel concerné de façon continue pour assurer la maîtrise et la qualité des résultats rendus au patient. Les personnes exécutant cet examen sont les techniciens et les biologistes/internes du laboratoire de parasitologie et du laboratoire de garde. La maîtrise du processus analytique, la vérification de méthode, la formation et l'habilitation du personnel, sont autant de points critiques à maîtriser lors de la réalisation de cet examen.

L'objet de cette étude est la mise en conformité le processus analytique du diagnostic du paludisme dans un premier temps, afin de préparer le dossier de vérification de cette analyse, et dans un deuxième temps la mise en conformité du processus d'habilitation selon la norme NF EN ISO 15189 et les exigences réglementaires pour les internes de biologie médicale du LBM. Ce projet sera mis en place grâce aux différentes notions abordées lors du D.U d'Assurance Qualité, telles que la maîtrise des risques pour les vérifications des méthodes, mais aussi les preuves de compétences pour l'habilitation du personnel.

I. La gestion documentaire

1. Gestion documentaire et procédures transversales

Le pôle de biologie du GH dispose d'un logiciel de gestion documentaire commun GESDOC (créé par un ingénieur qualité du pôle), qui permet de réunir tous les documents transversaux et spécifiques de chaque famille et qui sont consultables sur tous les postes informatiques via le réseau de l'hôpital. Le laboratoire est en cours de paramétrage du logiciel Kalilab (société Netika), qui devrait être fonctionnel en Janvier 2015. En attendant, les documents des secteurs spécialisés sont gérés par le responsable qualité du secteur et sont disponibles dans un dossier partagé (commun ou sur GESDOC) et en version papier dans des classeurs situés dans chaque unité. Les documents sont rédigés et/ou mis à jour selon le cycle documentaire (Figure 1).

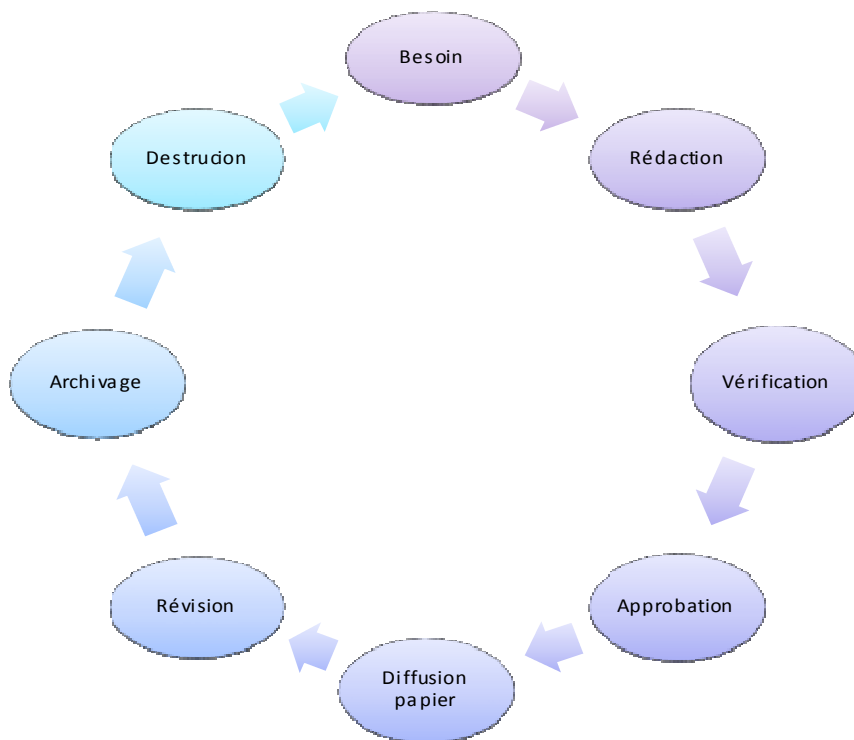


Figure 1 : Cycle documentaire

2. Procédures et Modes opératoires du paludisme

La phase analytique du diagnostic du paludisme est décrite à l'aide d'une procédure de recherche de paludisme dans le sang (Annexe III), et des modes opératoires décrivant les trois différentes techniques nécessaires au diagnostic (Annexe IV). Le contenu de chaque document est révisé en fonction des exigences de la norme NF EN ISO 15189 :2012 § 5.5.

Les procédures et les modes opératoires du diagnostic du paludisme ont été rédigés par le biologiste et les techniciens de l'unité, puis vérifiés et approuvés par le responsable qualité, avant d'être diffusés et mis à disposition dans l'unité.

La procédure décrit les différentes étapes de l'analyse, depuis le prélèvement jusqu'à l'interprétation et le rendu de résultats. Les modes opératoires quant à eux, décrivent plus précisément toute la partie technique des trois analyses.

Au laboratoire, le diagnostic biologique du paludisme est réalisé à l'aide de 3 techniques :

- un frottis coloré au MGG
- une goutte épaisse colorée au Giemsa
- un test de diagnostic rapide (TDR)

a) Le frottis sanguin (technique de référence)

Cette technique permet une mise en évidence de plasmodium dans les hématies, étalées en monocouche sur un frottis mince coloré au May-Grünwald Giemsa (M.G.G). Après fixation au May-Grünwald, le frottis est coloré par le Giemsa dilué en eau tamponnée (2,4). Les parasites colorés en rouge (noyau) et bleu (cytoplasme) sont retrouvés à l'intérieur des globules rouges. Cette coloration permet d'étudier la morphologie du parasite et ainsi faire le diagnostic d'espèce. Selon l'espèce identifiée, cette technique permet de rendre un résultat semi quantitatif de parasitémie (nombre d'hématies infectées/nombre d'hématies totales) C'est une technique simple qui nécessite peu de moyen, de sensibilité limitée en cas de parasitémie faible et doit être complétée d'une autre technique en cas de négativité.

b) La goutte épaisse (technique de référence)

Cette technique de «concentration» présente l'avantage d'être très sensible, et permet ainsi de déceler une faible parasitémie. Elle consiste à quelques microlitres de sang étalés en couches superposées sur une petite surface, les parasites sont mis en évidence après hémolyse des globules rouges par une coloration de Giemsa.

Néanmoins la réalisation est assez délicate et la lecture nécessite une bonne expérience au microscope (2,4).

c) Le test de diagnostic rapide (TDR) immunochromatographique

Simple et rapide, le TDR permet de détecter les protéines communes aux plasmodiums et spécifiques à *Plasmodium falciparum* en chromatographie sur un support solide. Après migration du sang le long de la bandelette, l'antigène paludéen présent dans l'échantillon se lie à l'anticorps antipaludéen conjugué pour former une ligne colorée visible. Une ligne de contrôle permet de valider le test. Sa réalisation est rapide et permet un résultat en 15 minutes, avec la possibilité de différencier l'espèce *P. falciparum* (seule espèce mortelle) des autres espèces (2,5).

Ces techniques sont de type qualitatif :

- Identification visuelle, avec présence ou absence de parasite.
- Détermination de l'espèce plasmodiale.
- Si paludisme à *Plasmodium falciparum*, une parasitémie est rendue (technique semi-quantitative).

II. Vérification de la méthode de diagnostic du paludisme

Le diagnostic du paludisme est une méthode manuelle, reconnue (6) de recherche et d'identification de parasites dans des échantillons biologiques d'origine humaine

1. Définir la méthode et la portée d'accréditation

a) Ligne de portée d'accréditation

Le document SH INF 50 du Cofrac permet de définir la portée d'accréditation pour lequel le laboratoire souhaite accréditer cette analyse.

Il situe cet examen faisant partie :

Domaine de la biologie médicale,

Sous domaine Microbiologie,

Famille Parasitologie-Mycologie (PARASITOMYCO).

b) Portées A ou B

Deux portées d'accréditation sont possibles, laissées au libre choix du laboratoire. Le choix entre la portée flexible de type A ou B dépendra du type d'utilisation de la technique par le laboratoire. L'adoption d'une méthode fournisseur correspondra à une portée A alors que la modification ou l'adaptation d'une méthode interne obligera à passer en portée B. La méthode utilisée pour le diagnostic du paludisme au laboratoire est une méthode reconnue par la bibliographie, ou elle y est décrite (2, 3, 4, 5, 6).

Le SH-REF-08 du Cofrac définit la Portée flexible standard (A) comme telle:

« Dans le cadre de ce type de portée, le laboratoire est autorisé à réaliser des analyses selon un ensemble de techniques validées, à partir de méthodes définies, suivant le même principe, ou de leurs révisions dès lors qu'elles n'impliquent pas de nouvelles compétences.

L'accréditation selon ce type de portée permet aux laboratoires de changer d'équipement (d'appareil) ou de trousse ("kits") réactifs fournisseur en fonction de l'évolution technologique (cadence, automatisation, performances analytiques, informatique logiciel, ergonomie, ...) et de continuer à mettre en œuvre sous

accréditation les méthodes, pourvu que le principe de la méthode reste semblable. Cela correspond à l'adoption d'une méthode considérée comme équivalente en termes de compétences. »

L'accréditation selon ce type de portée se justifie pleinement, puisque ces méthodes, dont l'une est commercialisée, sont considérées comme des méthodes reconnues.

c) Vérification de la méthode sur site en portée de type A

L'analyse comporte plusieurs caractéristiques essentielles à connaître. Pour se faire, le SH GTA 04 décrit dans un tableau (figure 2) les différents paramètres à vérifier sur site en fonction du type d'analyse.

Selon le SH REF 02 § 5.5.2 « *La validation des méthodes utilisées par le LBM en portée A est réduite à une vérification sur site pour s'assurer que les performances annoncées et souhaitées sont atteintes dans les conditions de travail du LBM.* »

PARAMETRES A VERIFIER ET/OU A CONNAITRE	Bibliographie	Vérification sur site Portée de type A	Validation Portée de type B
<i>Spécificité analytique</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<i>Sensibilité diagnostique</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<i>Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>
<i>Stabilité des réactifs (après ouverture, embarqués)</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<i>Robustesse</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<i>Comparaison avec méthode de référence</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui (si existe)</i>
<i>Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire¹¹</i>	<i>Oui (si existe)</i>	<i>Oui (si possible)</i>	<i>Oui</i>
<i>Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude¹² de la méthode ou du système analytique.</i>			

Figure 2 : Paramètres à vérifier selon les différentes portées.

Dans le cas de cette méthode, il s'agit d'une méthode qualitative/semi quantitative (présence ou absence de parasite/parasitémie) en portée A (méthode reconnue). Une étude bibliographique suffit à démontrer la sensibilité, la spécificité, la stabilité des réactifs et la robustesse. L'étude du risque de contamination (pas lieu d'être dans notre cas) et les comparaisons entre les techniques utilisées au laboratoire doivent si possible être démontrées sur site.

Cette vérification confirme au laboratoire la validité des résultats obtenus (« aptitude à l'emploi ») et consiste à évaluer des paramètres indispensables à la bonne exécution de l'analyse. Trois dossiers de vérification seront préparés pour effectuer la demande d'accréditation sur l'analyse du diagnostic du paludisme.

2. Réunir les documents de travail

Le diagnostic du paludisme est effectué au laboratoire de parasitologie depuis de nombreuses années, selon un protocole validé ; aucun dossier de vérification conforme à la norme ISO 15189 n'a été fait initialement à l'installation. Cette vérification est donc une simple confirmation à posteriori des performances d'une technique déjà en cours d'utilisation.

Il est donc nécessaire de réunir tous les documents de travail antérieur afin de remplir les critères énoncés par le COFRAC :

- Documents bibliographiques.
- Procédures et modes opératoires existant, notices fournisseurs.
- Résultats des contrôles de qualité (EEQ).
- Les comparaisons de méthodes.

3. Assurer la qualité du processus analytique

a) Traitement du prélèvement en urgence

Le paludisme est un diagnostic d'urgence à évoquer devant toute fièvre au retour d'un pays d'endémie en raison du risque d'accès grave en quelques heures par retard diagnostic et de prise en charge qui en découle. Le résultat doit être rendu dans les 2h après réception du prélèvement (3). Le service prescripteur envoie un tube de sang total avec la feuille d'examen cochée « urgent », avec la date et l'heure de prélèvement, les renseignements clinico-épidémiologiques (selon les recommandations du manuel de prélèvements). A réception de la demande l'heure est notée sur la feuille par l'agent d'accueil puis elle est enregistrée dans le système informatique. Le prélèvement conforme est ensuite transmis au personnel habilité pour être techniqué en urgence. Une fois la lecture terminée, le résultat est téléphoné et rendu au médecin prescripteur. Une procédure transversale de gestion des urgences permet d'assurer la maîtrise de la phase pré analytique. Elle décrit la prise en charge des examens urgents arrivant au laboratoire, ainsi, tout prélèvement

urgent est traité en priorité, et acheminé le plus rapidement au secteur où est réalisé l'analyse.

b) Contrôle interne de la qualité

Le laboratoire doit apporter toutes les preuves nécessaires pour démontrer la qualité de l'organisation et des résultats auprès des prescripteurs. Il doit donc mettre en place une évaluation constante de la qualité, passant par des CIQ, des EEQ et essentiellement par l'évaluation du personnel technique et médical.

Dans le cas du diagnostic du paludisme, les contrôles internes de la qualité se font parallèlement à la réalisation de l'analyse en fonction des critères de performances fixés par le laboratoire (conférence de consensus) à chaque étape. Ils portent sur la qualité de l'échantillon, la maîtrise des colorations (couleurs des hématies et des leucocytes), et la maîtrise de la lecture.

Pour les techniques de gouttes épaisses et de frottis, des lames positives colorées et anonymes servent de contrôles internes de la qualité.

c) Contrôle externe de la qualité

Concernant l'évaluation externe de la qualité, le laboratoire participe à plusieurs contrôles de qualité :

- CNQ : ANSM 1 à 2 contrôles par an obligatoire
- CTCB : 1 contrôle par an facultatif
- CNR : 1 contrôle par an facultatif

A ce jour, il n'y a pas d'EEQ sur sang frais ni d'échange de prélèvement inter-laboratoire, car les modalités d'envoi de sang frais sur tubes EDTA sont lourdes et compliquées.

4. Remplir le formulaire SH FORM 44

a) La maîtrise des risques

L'analyse des techniques a démontré qu'il s'agit ici de vérifier les performances de méthodes de type qualitatif en portée A.

Pour chaque technique un formulaire de fiche type qualitatif SH FORM 44 est rempli. Trois dossiers de vérification permettent de s'assurer de la fiabilité du diagnostic du paludisme.

Pour maîtriser au mieux l'exécution de la recherche de paludisme dans le sang, une étude des facteurs de risque sur le résultat a été faite sous forme d'un diagramme de cause à effet appelé diagramme d'ishikawa (ou diagramme en arête de poisson, ou 5M). Cet outil permet d'identifier les éléments et permet une vision globale des causes génératrices d'un problème. Il se structure autour du concept des 5 M (Milieu/matériel/main-d'œuvre/méthode/matière) et permet de limiter l'oubli des causes et de fournir des éléments pour l'étude des solutions. Cette méthode permet d'agir sur les causes pour corriger les défauts et donner des solutions en employant des actions correctives (Annexe V).

b) La comparaison des méthodes

La comparaison est faite sur 30 recherches positives en plasmodiums sur 2013.

Les méthodes comparées sont :

La goutte épaisse/le frottis mince/ICT versus les résultats du CNR paludisme (Annexe VI, VII et VIII).

III. Habilitation du personnel sur le poste paludisme

Le diagnostic du paludisme est une technique manuelle, avec un rendu fait sur une observation au microscope. Pour s'assurer de la qualité des résultats il est indispensable de mettre en place une formation adaptée qui permet d'assurer les connaissances théoriques et pratiques, mais aussi de maintenir les compétences acquises en mettant en place des évaluations périodiques. L'habilitation des internes a été prise comme point de départ pour cette étude.

D'ailleurs la norme et les guides du Cofrac le décrivent :

SH REF 02 p.25 « *Il est de la responsabilité du LBM d'assurer que l'ensemble du personnel, y compris les biologiste médicaux, est habilité aux tâches spécifiques définies exercées, dans le cadre des fonctions occupées, selon des dispositions pré-établies, et des critères si possible objectifs, et que cette habilitation est périodiquement revue, notamment en cas d'arrêt prolongé de l'activité supérieure à 6 mois, et enregistrée.* »

NF EN ISO 15189 :2012 § 5.1.6 « *Suite à la formation appropriée, le laboratoire doit évaluer la compétence de chaque personne à réaliser les tâches managériales ou techniques attribuées conformément aux critères établis.*

La réévaluation doit avoir lieu à intervalles réguliers. Le recyclage doit avoir lieu si nécessaire. »

Au sein du LBM, les personnes à habilitier sont les suivantes :

- biologistes exerçant au laboratoire de parasitologie
- techniciens exerçant au laboratoire de parasitologie
- internes exerçant au laboratoire de parasitologie
- biologistes exerçant au laboratoire de garde
- techniciens exerçant au laboratoire de garde
- internes exerçant au laboratoire de garde

Une habilitation initiale et une formation continue (1 fois par an) sont obligatoires pour toutes ces personnes.

1. Préparer l'habilitation

a) Poste du paludisme

La recherche de paludisme est effectuée au secteur de parasitologie pendant les horaires d'ouverture de 8h à 18h. Tous les techniciens et les biologistes/internes du secteur peuvent être amenés à réaliser cette analyse. Toute demande qui arrive en dehors des horaires d'ouverture du laboratoire est acheminée directement au secteur des urgences où techniciens, internes et biologistes de garde réalisent l'analyse. Le biologiste du laboratoire de parasitologie, est le référent de cet examen et assure les formations théoriques et pratiques des opérateurs.

b) Définir les éléments à maîtriser pour être habilité sur le poste.

Pour réaliser l'analyse il est indispensable d'acquérir une connaissance théorique et pratique. Le cours théorique (1h30min) effectué par le biologiste référent apporte des précisions sur le parasite : les différentes espèces et leurs caractéristiques, le cycle parasitaire, les zones d'endémie, les signes cliniques évoquant un paludisme chez un patient, et les différentes techniques utilisées pour le diagnostic. La formation pratique permet la maîtrise de la préparation des frottis, leurs colorations et la reconnaissance microscopique des éléments parasitaires, afin d'identifier et quantifier l'espèce du plasmodium.

c) Etablir des critères qualitatifs et quantitatifs d'habilitation

➤ Formation initial :

Avant la prise de poste du paludisme le nouvel arrivant doit suivre une formation théorique, et pratique durant sa période de formation qui dure minimum 5 demi-journées sur 1 à 2 semaines.

La formation est faite en 3 étapes :

- la formation théorique
- la formation à la technique
- la formation à la lecture

Formation théorique : elle est faite en groupe ou individuellement par le biologiste référent, avec un support photocopié remis à chaque participant. Cette formation est à renouveler tous les ans.

Formation à la technique : le biologiste ou les techniciens habilités montre la technique de frottis et des colorations (n=1). Les personnes à habilitier effectuent

ensuite la technique avec un prélèvement positif si possible (n=2). Les lames colorées sont ensuite vues par le biologiste pour validation technique.

Formation à la lecture : les personnes en formation s'exercent en regardant des lames de démonstration de frottis et gouttes épaisses colorées rangés dans des boîtes en fonction du type d'espèce sous le tutorat des personnes habilitées ou du biologiste référent. Ensuite les candidats sont testés sur la lecture de 5 lames de frottis et gouttes épaisses à identifier.

La formation est validée une fois avoir participé à la formation théorique, après validation des techniques de coloration par le biologiste, et après avoir identifié les différentes lames de la boîte test (Annexe IX et X).

➤ Formation continue :

Le personnel déjà formé suit une formation théorique par an, et une formation à la lecture d'une lame test. Le personnel dispose d'ouvrages et de documents photos qui lui permettent de compléter sa formation en continu. La formation continue est validée par le biologiste référent.

d) Définir la durée de l'habilitation

L'habilitation est valable pour une durée de **6 mois maximum** (procédure transversale d'habilitation). Le personnel maintient son habilitation s'il occupe le poste de garde (jour et nuit) durant cette période, et/ou lorsqu'il est affecté au poste de parasitologie directe.

En cas d'absence prolongée de plus de 6 mois, le personnel absent doit repasser la formation initiale afin d'acquérir son habilitation au poste.

2. Planifier l'habilitation et habiliter

a) Grille d'habilitation et procédure associée

Le grille d'habilitation interne au secteur parasitologie est rédigée en adéquation avec la procédure transversale du pôle avec une formation initiale en 3 étapes pour la pratique (voir/faire en binôme/faire seul), mais aussi avec des items plus spécifiques telles que la formation à la théorie, et l'évaluation sous forme de test.

Elle est destinée à tout le personnel effectuant la recherche de paludisme dans le sang et est utilisée pour la formation initiale et la formation en continue.

A l'issue de chaque formation un émargement est tracé sur la fiche de formation à la théorie et sur la grille d'habilitation (Annexe X).

b) Plan de Formation

Au moins deux sessions de formation sont planifiées tous les ans au mois de mai et de novembre lors de l'arrivée des nouveaux internes.

Lors de l'arrivée d'un nouveau technicien du laboratoire, des sessions de formation exceptionnelles peuvent être programmées.

Une fois le personnel habilité, un dossier pour chaque opérateur est créé et archivé informatiquement. Une synthèse des données est retranscrite dans un tableau créant alors une matrice de compétence. Cette matrice permet alors d'avoir une vision globale sur le personnel formé, la date de validité de leur formation, et d'établir un plan de formation.

IV. Interprétation / bilan

1. La gestion documentaire

La rédaction, la vérification et la validation des modes opératoires et procédures (annexe IV et V) ont été réalisées suivant le format des procédures transversales du LBM. Il manque cependant la codification et certains liens sur les différents documents car le logiciel de gestion documentaire n'est pas encore disponible (en cours de paramétrage). De plus, le suivi métrologique des réfrigérateurs et congélateurs sur un logiciel adapté est à entreprendre.

2. Vérification de la méthode de diagnostic du paludisme

Durant l'année 2013/2014, une réunion trimestrielle était organisée au niveau national sur l'accréditation des différentes analyses en parasitologie et mycologie. Les 3 SH FORM 44 (annexe VI, VII et VIII) concernant les trois techniques d'analyse dans le diagnostic du paludisme ont donc été réalisés de manière consensuelle entre plusieurs laboratoires de parasitologie/mycologie.

3. Habilitation du personnel sur le poste paludisme (annexe IX)

Le 06 Mai 2014, douze internes de biologie ont pris un poste dans différents secteurs spécialisés. Durant les premiers jours de leur arrivée, plusieurs formations ont été programmées au sein des différentes structures (biochimie, hématologie, bactériologie, parasitologie et mycologie) afin qu'ils puissent être aptes à effectuer des gardes et astreintes. La formation théorique du paludisme a eu lieu le 6 mai 2014, et la formation pratique devait être validée de préférence dans les 15 jours ouvrés après la formation théorique (le 26 mai 2014), ou avant la première prise de garde de nuit par les internes soit entre le 16 mai 2014 et le 22 juin 2014. Les différentes techniques réalisées en garde ont été contrôlées le lendemain au laboratoire de parasitologie par des techniciennes habilitées.

a) La formation théorique

La formation a eu lieu le 6 mai 2014 et une fiche d'émargement a été enregistrée (tous les internes de garde étaient présents).

b) La formation pratique

Entre le 6 mai et le 22 juin 2014 :

- Réalisation et coloration d'un frottis et d'une goutte épaisse
- Lecture de 6 boîtes de lames « test »
- Test final de diagnostic comprenant : 1 frottis, 1 goutte épaisse et un test rapide

Tous les internes ont pu être habilités conformément à la procédure entreprise par le laboratoire dans les délais impartis (annexe X). Ils étaient dans l'ensemble tous satisfaits de la formation acquise.

c) Contrôle des résultats de gardes

Entre Mai et Août 2014 aucune discordance entre le résultat rendu en garde et le résultat après contrôle. Cependant les lames colorées durant le mois entre le 11 et le 18 août présentaient des tâches de colorant, ce qui a rendu difficile la lecture et l'interprétation. Les lames ont été recolorées dans l'unité de parasitologie pour confirmer le résultat.

Des fiches de non-conformités ont été ouvertes sur les dossiers, et des actions correctives ont été mises en place au secteur de garde :

- défaut de filtration du colorant (changement des filtres)
- défaut de séchage et nettoyage des lames après coloration.

CONCLUSION

Le diagnostic du paludisme associe trois techniques manuelles qualitatives décrites dans la littérature (1, 2). L'objet de cette étude était de préparer le dossier d'accréditation du diagnostic du paludisme en mettant en conformité la documentation associée, la vérification du processus analytique et l'habilitation des internes.

Les modes opératoires et procédures ont été rédigés en suivant le format des procédures transversales du LBM. Les trois vérifications de méthodes SH FORM 44 (analyses qualitatives en portée A) ont démontrées que la prise en charge du diagnostic de paludisme était conforme aux exigences dans sa globalité. Cependant, afin d'assurer la maîtrise de l'exécution et le rendu du résultat, une habilitation initiale et une formation continue (intervalle d'un an) est obligatoire. Durant la période du déroulement de l'étude, l'évaluation des internes de biologie médicale a permis de vérifier l'adéquation des différents documents tels que les grilles et les critères d'habilitation par rapport aux attentes de la norme et du laboratoire. Durant tout leur semestre d'apprentissage, ces internes ont été amenés à réaliser des recherches de paludisme en urgence après avoir été habilités sur le poste.

L'habilitation conforme aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 doit dès à présent être étendue à tous les techniciens et biologistes du secteur parasitologie, puis au personnel du laboratoire de garde.

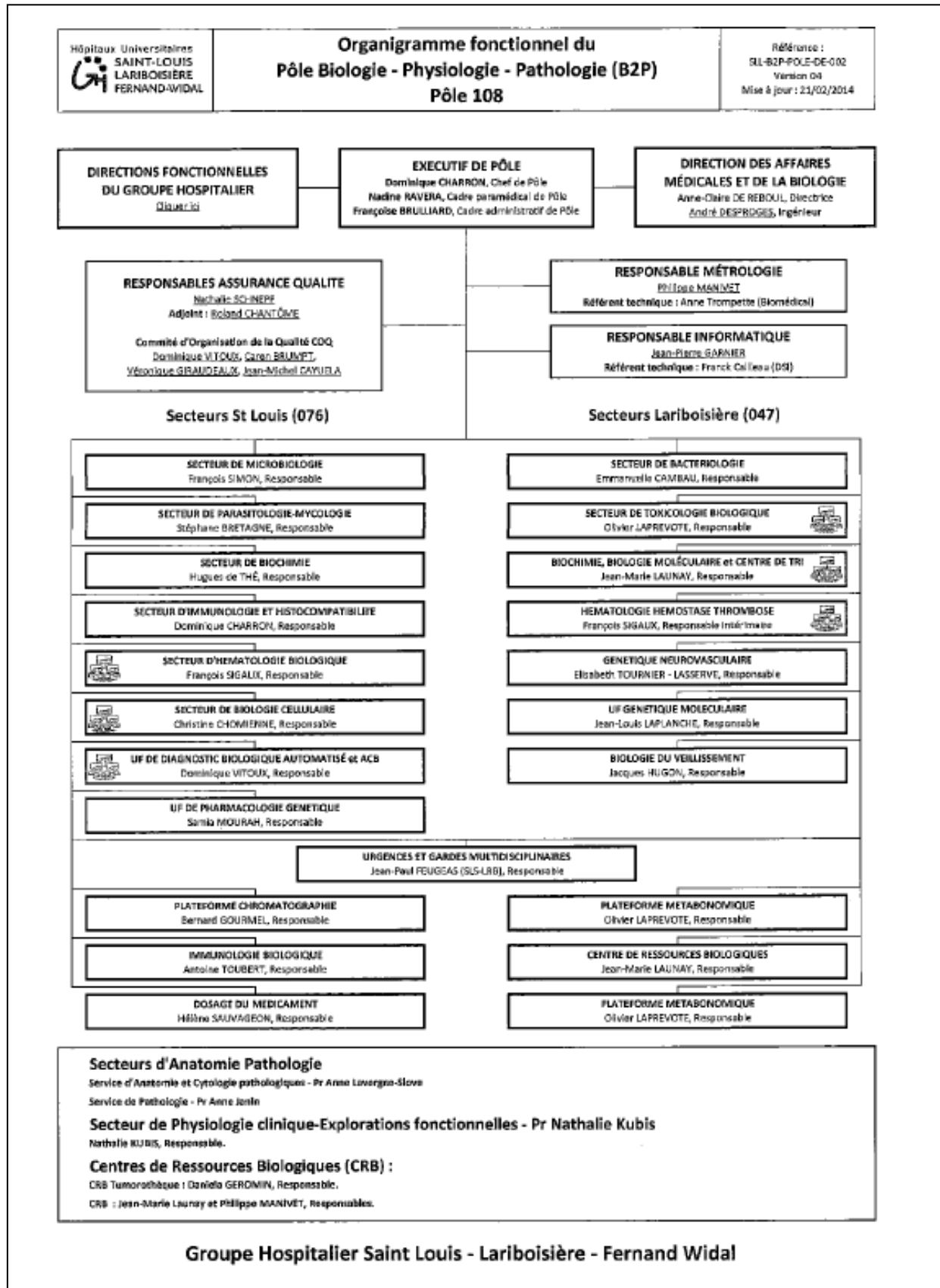
BIBLIOGRAPHIE

1. Cofrac, Norme internationale NF EN ISO 15189, 2012.
2. Anofel, Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales. Elsevier Masson. 2010.
3. SPILF /SFRL. Conférence de consensus : Prise en charge et prévention du paludisme d'importation à *Plasmodium falciparum* : recommandations pour la pratique clinique. 2007
4. Delaunay P, Estran-Pomares C, Marty P. Diagnostic du paludisme : frottis sanguin, goutte épaisse et tests antigéniques. Médecine et maladies infectieuses, 2008, 38:S121–S123.
5. Van Gool T, Van Wolfswinkel ME, Koelewijn R, Van Thiel PP, Jacobs J, Van Hellemond JJ and Van Genderen PJJ. A simple and fast method to exclude high *Plasmodium falciparum* parasitaemia in travellers with imported malaria. Malaria Journal 2011, 10:S300
6. Petithory JC, Ardoin-Guidon F, Parasites sanguins, diagnostique biologique. Bioforma. 2001.

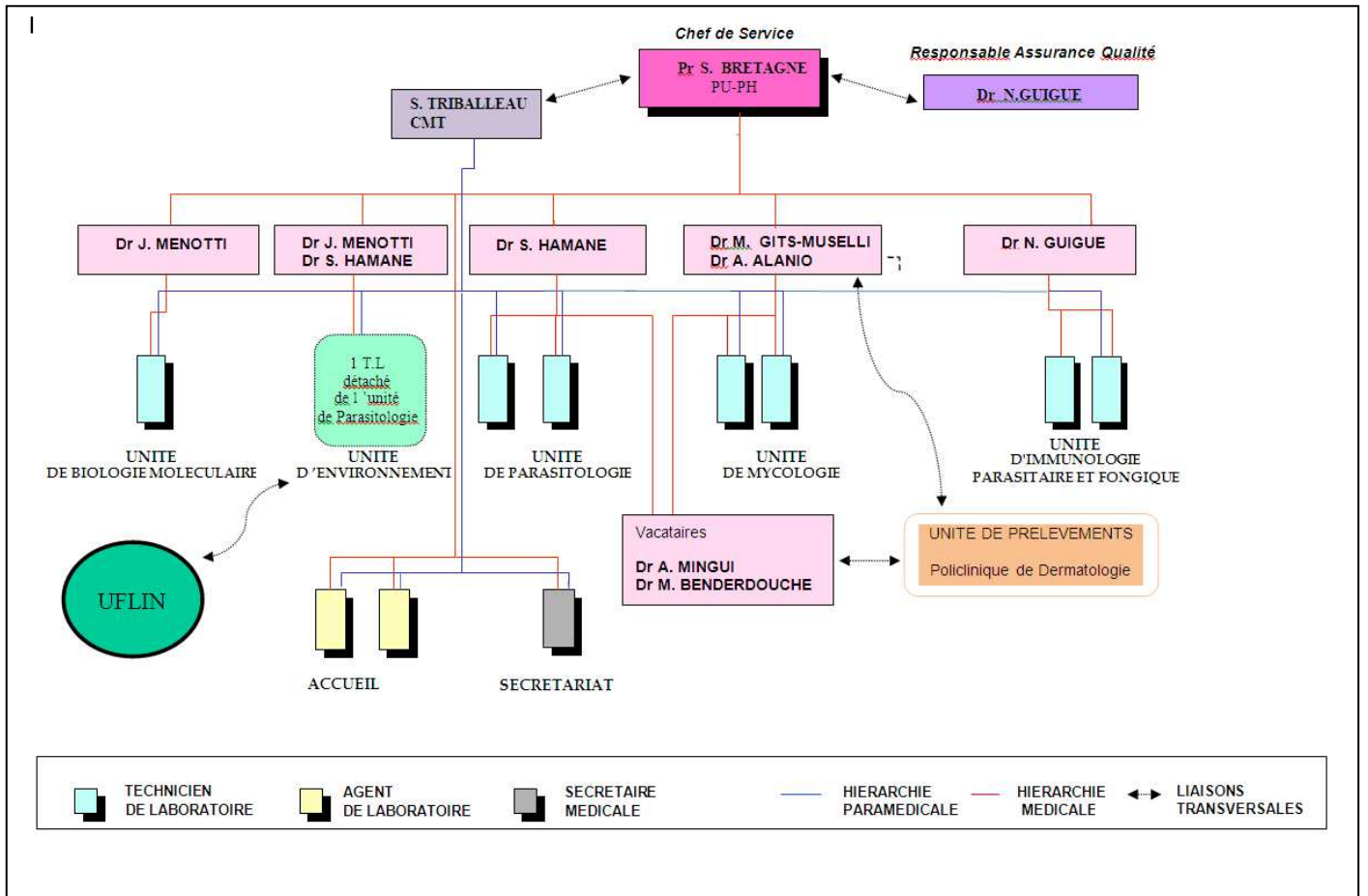
LISTE DES ANNEXES

- ANNEXE I :** Organigramme fonctionnel du pôle B2P
- ANNEXE II :** Organigramme du secteur spécialisé de Parasitologie
- ANNEXE III :** Procédure du diagnostic du paludisme
- ANNEXE IV :** Modes opératoires des trois techniques
- ANNEXE V :** Maitrise des risques par les 5M
- ANNEXE VI :** Vérification frottis + coloration MGG
- ANNEXE VII :** Vérification goutte épaisse + coloration Giemsa
- ANNEXE VIII :** Vérification test de diagnostic rapide
- ANNEXE IX :** Fiche d'habilitation
- ANNEXE X :** Fiche synthèse de formation des internes au paludisme

ANNEXE I



ANNEXE II



 DIAGNOSTIC DE PALUDISME DANS LE SANG		Référence : SLS-PAF-2014- 008 - 12/01/2014 - V01
---	--	--

Type de Document :	Procédure
Secteur concerné :	SIS - SUCOUR - SECOUR - PARASITOLOGIE - COMARIS - PARASITOLOGIE DIRECTE
Classement :	Chapitre 5 - Procédures Techniques Sous chapitre : 55 - Analyses

Date de création :	12/01/14	Limite de validité :	22/01/15
---------------------------	-----------------	-----------------------------	-----------------

Rédigé par : <small>(nom, prénom, sexe et signature)</small>	Validé par : <small>(nom, prénom, sexe et signature)</small>
--	--

Droits Développés, techniciens	Samia HAMANE, biologiste	Nicolas GUILLET, biologiste
---------------------------------------	---------------------------------	------------------------------------

Personnes chargées du suivi de ce document :	Samia HAMANE
Lien de diffusion :	<ul style="list-style-type: none"> - 1 copie déposée sur le serveur informatique - Mise à disposition des personnes concernées
Documents associés :	<ul style="list-style-type: none"> • SLS-ENG-PARAF-2014-008 • SLS-ENG-PARAF-2014-008 • SLS-PAF-2014-008
Objet de la modification :	N/A

1 OBJET DE LA PROCEDURE

Décrire les étapes à suivre de diagnostic du paludisme dans le sang, depuis le prélèvement au venou des résultats.

2 DOMAINE D'APPLICATION ET PERSONNES CONCERNÉES

- Secour, Secouristes ou Secouristes
- Personnes concernées : Parasitologie, Parasitologie, Parasitologie, Parasitologie, Parasitologie
- Responsables médicaux : Le directeur des diagnostics parasitologiques ou les chefs de unités
- Responsables paramédicaux : Techniciens de laboratoire

3 DOCUMENTS DE RÉFÉRENCE

- Norme NF S90 15103 et 11025

4 DÉFINITIONS ET ABRÉVIATIONS

N/A

 DIAGNOSTIC DE PALUDISME DANS LE SANG		Référence : SLS-PAF-2014- 008 - 12/01/2014 - V01
---	--	--

5 DESCRIPTION DE LA PROCEDURE

5.1 Prélèvement et transport des échantillons

- Prélèvement sanguin venant sur une EDTA
- Packer l'heure du prélèvement sur la feuille de demande
- Packer les renseignements épidémiologiques
 - Le lieu ou séjour
 - La date de début
 - Les signes cliniques
 - Les prises de médicaments (médicaments observés)

Le prélèvement doit être fait dans un ase idéalement comme urgent et transporté au laboratoire de Parasitologie (ou tout au moins de 8h à 17h) ou au laboratoire de glycémie (ou tout au moins de 17h à 8h le samedi) (le dimanche et jours fériés)
 Voir procédure complémentaire : SLS-ENG-PARAF-2014-008

5.2 Réception, enregistrement, répartition

- Noter l'heure de réception du prélèvement sur la feuille de demande
- Vérifier la conformité du prélèvement
- Envoyer le dossier au laboratoire
- Transcrire le prélèvement dans le registre de Parasitologie - Glycémie
- Vérifier les renseignements cliniques et épidémiologiques sur la feuille de demande s'il est complet en cas de renseignements

Voir procédure complémentaire aux analyses du domaine de Parasitologie : SLS-ENG-PARAF-2014-008

5.3 Mode opératoire

Voir mode opératoire : SLS-PAF-2014-008

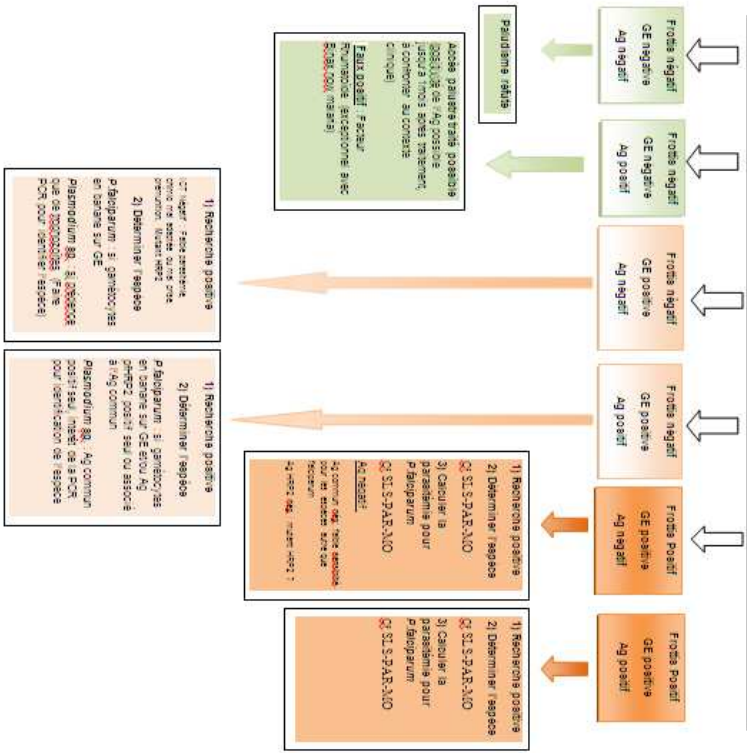
La recherche de parasites doit associer une technique microscopique de concentration (goutte épaisse, goutte crue) très colorée et/ou un test rapide ou assure une identification complète des espèces. Les tests de diagnostic rapide se positionnent comme une technique de deuxième ligne

- 1) Réaliser le test si la GCE et/ou les colorations (SLS-PAF-2014-008)
- 2) Lancer la recherche (empirique SLS-PAF-2014-008)
- 3) Présence de parasites dans le diagnostic d'urgence
- 4) En cas de positivité et/ou d'urgence : calculer la densité
- 5) Pour tous résultats positifs, remplir la déclaration de paludisme et envoyer le prélèvement au centre nationale de référence pour le paludisme

5.4 Interprétation des résultats

STRATEGIE DE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DU PALUDISME

Frottis microscopique épaisse - Triage précoce (ICT RDT/NOV, Malaria)



5.5 Rendu de résultats

Le processus revient au médecin à la fin des examens ou technicien de laboratoire à la fin de l'analyse. Les résultats sont rendus par le médecin ou le technicien de laboratoire à la fin de l'analyse et/ou à la fin de la journée.

ANNEXE IV

	FROTIS SANGUIN RECHERCHE DE PALUDISME	Référence : SLSP-PARASITOL-04-0-5 Date : 12/01/2014 - V01
---	--	---

Type de Document :	Mode opératoire
Secteur concerné :	Sa - Si Loua - Secteur - Parasito - Domain - ROUTINE
Classement :	Chapitre 5- Procédures Techniques Sous chapitre : 5- Analyse

Date de création :	Date de mise à jour :	Limite de validité :
12/01/2013	12/01/2014	12/01/2015

Rédigé par : Nom : ROUYA , Prénom : SAVANA	Validé par : Nom : ROUYA , Prénom : SAVANA	Approuvé par : Nom : ROUYA , Prénom : SAVANA
Diakris Deyyabba , Technicien	Samia HAHANE , biologiste	Nicolas Guigou , biologiste

Personne chargée du suivi de ce document :	
Liste de diffusion :	- 1 copie déposée sur la base documentaire (SASDOC) - 1 version électronique déposée sur notre base documentaire (logiciel) - 1 version papier déposée au laboratoire de parasitologie
Documents associés :	

1 OBJET DU MODE OPERATOIRE :
 Rechercher de parasites du genre Plasmodium sur un frottis sanguin coloré au May-Grunwald Giemsa. En cas de positivité le frottis sanguin permet le diagnostic d'espèce ainsi que le calcul de la parasitaémie.

2 DOMAINE D'APPLICATION ET PERSONNES CONCERNÉES :

2.1 Domaine d'application :
 Laboratoire de parasitologie
 Patients consultants à l'hôpital Samdech pour une suspicion de paludisme

2.2 Personnes concernées :
 Biologistes techniciens de laboratoire, infirmiers
 Responsables médicaux, vérification par les diagnostics ou service
 Responsables paramédicaux, techniciens de laboratoire

	FROTIS SANGUIN RECHERCHE DE PALUDISME	Référence : SLSP-PARASITOL-04-0-5 Date : 12/01/2014 - V01
---	--	---

3 DOCUMENTS DE RÉFÉRENCE ET DOCUMENTS ASSOCIÉS :

3.1 Documents de référence :

- NORME NF ISO 15188
- Carte de Formation, Biologie médicale BIOFOAM N°23, Parasites sanguin, décembre 2011
- Y.J GOVIL, P. AMORSE-THOMAS, LES NOUVELLES TECHNIQUES EN PARASITOLOGIE, 1998, P.LAILLARDON
- Prise en charge et prévention du paludisme (implication à Plasmodium falciparum, Réunion 2007) conférence de consensus 1999
- CD ANCFEL, 4 - Association Française des Enseignants et Praticiens Hospitaliers Titulaires de Parasitologie et Mycologie Médicale

3.2 Documents associés :

- Néant

4 DÉFINITIONS ET ABRÉVIATIONS :

4.1 Définitions :

- Néant

4.2 Abréviations :

- MGC - May-Grunwald Giemsa
- GR - Globule rouge
- B.C - Plasmodium falciparum
- P.C - Plasmodium vivax
- P.O - Plasmodium ovale
- P.M - Plasmodium malariae

5 PRINCIPE DE LA MÉTHODE :

Mise en évidence de Plasmodium dans les frottis, établis en monocouche sur un frottis mince coloré au May-Grunwald Giemsa.
 On procède d'abord à une station du frottis par le May-Grunwald puis addition de l'eau distillée et coloration par le Giemsa dilué dans l'eau tamponnée à pH 7. Cette eau légèrement saline permet des modifications transparentes des frottis et accepte la tenue du cytoplasme des Plasmodium.
 L'intensité du frottis mince est de pouvoir évaluer la morphologie des Plasmodium et les modifications éliminées des frottis passés permettant ainsi le diagnostic d'espèce.

6 PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ :

Les colorations au MGC doivent être effectuées sous note chimique

7 MATÉRIELS ET RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

Mode opératoire		
Type de Document :	Site : SL Louis - Secteur : PARASTO - Domaine : ROUTINE	
Secteur concernés :	Chaire de S. Procédure Technique Sous-chaire : S. Anatomiques	
Classement :		
Date de création :	Date de mise à jour :	Limite de validité :
21/01/2014	05/03/2014	05/03/2015

Rédigé par : <small>(nom), (cognom), (date) et (signature)</small>	Validé par : <small>(nom), (cognom), (date) et (signature)</small>	Approuvé par : <small>(nom), (cognom), (date) et (signature)</small>
David RAVONDRASA technicien	Samia HAMANE biologiste	Nicolas GUILLET biologiste

Personne chargée du suivi de ce document :	
Liens de diffusion :	- 1 copie essentielle sur les bases documentaire GEODOC - 1 version électronique d'après le site sur notre base documentaire (JOSQUE O) - 1 version papier d'après le site sur notre base documentaire
Documents associés :	

1 OBJET DU MODE OPERATOIRE :

Ce mode opératoire décrit la recherche de l'antigène de Plasmodium dans le sang par un test immunochromatographique rapide (ICT) à usage technique qualitative permettant la détection de l'antigène PfPR1-2 spécifique du Plasmodium falciparum (P.F.) et d'un antigène commun aux espèces Plasmodium falciparum (P.F.), Plasmodium Ovale (P.O.) et Plasmodium Vivax (P.V.).

2 DOMAINE D'APPLICATION ET PERSONNES CONCERNÉES :

2.1 Domaine d'application :

Cette technique s'applique dans le secteur de parasitologie parasitaire avec l'assistance d'infection à Plasmodium

2.2 Personnes concernées :

Biologistes, techniciens de laboratoire, infirmiers, assistants médicaux, vétérinaires, techniciens de service parasitologie parasitaire, techniciens de laboratoire.

DOCUMENTS DE RÉFÉRENCE ET DOCUMENTS ASSOCIÉS :		
3	DOCUMENTS DE RÉFÉRENCE ET DOCUMENTS ASSOCIÉS :	
3.1	Documents de référence :	<ul style="list-style-type: none"> NOTICE N° ISO 15189 Garavito A, Fackel R, et al. Evaluation of Bmax Now ICT Test versus PCR and microscopy for the detection of malaria in young children. <i>Am J Trop Med Hyg</i>. 2003; 69:593-592.

3.2 Documents associés :

Notice du fournisseur

4 DÉFINITIONS ET ABRÉVIATIONS :

4.1 Définitions :

NB&P

4.2 Abréviations :

- Ag: antigène
- TCR: test de diagnostic rapide
- P.F.: Plasmodium falciparum
- P.V.: Plasmodium vivax
- P.O.: Plasmodium ovale
- P.M.: Plasmodium malarie

5 PRINCIPE DE LA MÉTHODE :

Le test NOWB Malaria est un test de diagnostic immunologique in vitro sur sang total, qui permet la détection de l'antigène spécifique de P. falciparum) et d'un antigène commun aux 4 espèces de Plasmodium (P.falciparum, P.malarie, P.vivax et P.vivax).

Le test utilise 2 anticorps de capture fixés sur la membrane, un des anticorps est dirigé contre l'antigène PfPR1-2 (spécifique du P.F.) contre P.F. L'autre anticorps cible un antigène commun aux 4 espèces de Plasmodium (P.F., P.M., P.O. et P.V.) contre T2. Une ligne de contrôle de procédure est également immobilisée en travers de la bandelette et 3 protéines toujours dans la zone C de la bande de lecture du test si celui-ci a été correctement effectuée. Du sang entier (15 µL) est déposé sur un tampon éponneux imbibé d'anticorps marqués à l'or colloïdal qui sont dirigés contre les antigènes associés au Plasmodium. Lorsque l'antigène positif est détecté, les anticorps associés au Plasmodium se fixent aux anticorps marqués à l'or colloïdal. Au tampon éponneux un réactif est alors ajouté permettant aux composés immuns formés de migrer le long de la bandelette et ils sont capturés par les anticorps immobilisés. Lorsque la capture a lieu, une ou deux lignes roses se forment dans le fenêtre de lecture du test. Lorsque l'antigène négatif est détecté, seule la ligne de contrôle apparaît.

6 PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ :

Le réactif A contient de l'acide de sodium (conservateur). L'acide de sodium est toxique et doit être manipulé avec précaution pour éviter son ingestion ou son contact avec le peau. Il peut nuire à l'environnement et le contact avec le produit peut provoquer des complications graves. Il est recommandé de porter des vêtements appropriés.

	RECHERCHE D'ANTIGENES DE PLASMODIUM BinaxNow Malaria®	Référence : SLE-PARA/STO/10-0-5
		Date : 21/12/2012 VOL

7 MATÉRIEL ET RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

7.1 Matériel et consommables :

Omnomètre
Gens en tube à usage unique
Microcône rigide de 0 à 20µl et embouts stériles

7.2 Réactifs :

Carter **BINAXNOW** Malaria (conservé à température ambiante au dessus de la palasse de parasitologie)

LOCAUX :

Secteur parasitologie pièce 1508

8 DESCRIPTION DU MODE OPÉRATEUR :

8.1 Réalisation du test :

- 1) Mettre les gants
- 2) Sortir le carté test de sa pochette juste avant de l'utiliser et inscrire le nom/numéro du patient ainsi que la date du prélèvement.
- 3) Ouvrir le carté et le poser à plat sur la surface de travail
- 4) A l'aide de la pipette, déposer lentement 15 µl de sang dans EXTRA au niveau de la zone violette ou du pont (contour ou dessous?)
- 5) Mettre ensuite 2 gouttes de réactif contenu dans le test (selon A, sous la zone violette (ajouter la première goutte DÉGELÉ, avant d'ajouter le deuxième). Ne pas ajouter de réactif à découvert sur le tampon violet.
- 6) Laisser migrer le sang (pas rouge le long de la paroi) vers le pont 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 côté ou sang.
- 7) Juste avant que le sang n'atteigne la base du tampon blanc sur le haut de la paroi, mettre 4 gouttes de réactif A sur le haut du côté gauche ou dessous?.
- 8) Répéter la projection arrière du pont droit ou dessous? (ajouter le sang, ainsi en haut de la paroi) vers.
- 9) Répéter la carte et bien ajouter le long du pont droit de la bande de résultats.

8.2 Lecture du test et interprétation des résultats:

- La notice recommande la lecture à 15 mn.
- Le résultat ne sera valide que si la bande Control (Bande contrôle)
- L'interprétation se fera en fonction des résultats du pont, de la goutte émise et du contenu sérologique

-LIGNES DU TEST :

La test permet l'identification d'une infection à P. f. ou d'une infection à P.m. P.f. ou P.v. Ce test ne permet pas de préciser si il s'agit d'une infection mixte car du fait de la nature de l'antigène utilisé, les ligne T2 peut être positive avec P.f., P.m., P.v. et P.v. A ce jour, les performances de ce test ont été évaluées en réalisant uniquement des extensions **CA** et **CV** positifs. Un test ou d'origine trop peu étendu pour être valide plusieurs jours après

	RECHERCHE D'ANTIGENES DE PLASMODIUM BinaxNow Malaria®	Référence : SLE-PARA/STO/10-0-5
		Date : 21/12/2012 VOL

! Attention car un traitement antoparodique ou antibiotique jusqu'à 1 mois après traitement. Dans tous les cas, il est nécessaire d'insérer l'ensemble des données ciniques sérologiques et biologique avant d'établir le diagnostic final



Positif
P. falciparum ou infection mixte

Positif
P. falciparum
Faux positif possible

Négatif
Faux négatif possible
- Faus nég. -
- Faus nég.

Type de Document :	Mode opératoire	
Secteur concerné :	Site : ST LOUIS - Secteur : PARASITO - Domaine: ROUTINE	
Classé par :	Chapitre 5- Procédures Techniques Sous chapitre - St- Anatomique	
Date de création :	Date de mise à jour :	Limite de validité :
08/01/2013	08/03/2014	21/03/2015

Rédigé par : <small>(nom, prénom, adresse et signature)</small>	Validé par : <small>(nom, prénom, adresse et signature)</small>	Approuvé par : <small>(nom, prénom, adresse et signature)</small>
Denis DELABERGE, pharmacienne	Samia HALLANE, biologiste	Nicolas GUILLET, biologiste

Titre de l'opus : [Précédent](#) | [Suivant](#) | [Accueil](#) | [Recherche](#) | [Aide](#) | [Contact](#) | [Général](#) | [Partager](#) | [Imprimer](#) | [Ajouter aux favoris](#) | [Ajouter à la liste de lecture](#)

Personne chargée du suivi de ce document :	— Titulaire d'opinion sur l'état documentaire : GABRIEL — Version électronique d'opinion sur notre base documentaire (Brique O) — Version papier d'opinion sur le serveur de paludisme
Liste de diffusion :	
Documents associés :	

1 OBJET DU MODE OPERATOIRE :

Recherche de parasites du genre Plasmodium sur un prélèvement sanguin venant prélevé sur EDTA par une technique de concentration : goutte épaisse coloré au Giemsa.

2 DOMAINE D'APPLICATION ET PERSONNES CONCERNÉES :

2.1 Domaine d'application :

Laboratoire de parasitologie
Prélèvements sanguins à l'Institut Saint-Louis pour une suspicion de paludisme

2.2 Personnes concernées :

Biologistes, techniciens de laboratoire, internes
Responsables médicaux, validation par les biologistes du service
Responsables pharmaceutiques, techniciens de laboratoire

3 DOCUMENTS DE RÉFÉRENCE ET DOCUMENTS ASSOCIÉS :

- ### 3.1 Documents de référence :
- NORME NF ISO 15189
 - Carte de formation de biologie médicale SFCO/IA N°23, parasites sanguin, septembre 2001
 - [VALSOLAR \(LABODIAGNOSTICS\), LES NOUVELLES TECHNIQUES EN PARASITOLOGIE ET 1999 FALMATION](#)
 - [BRIE EN CHARGE ET PREVENTION DU PALUDISME \(PROPOSITION A PLASMODIUM SPECIEM, REVISION 2007 CONFERENCE DE CONSENSUS 1999](#)
 - [CCD ANCFEL 4 - Association Française des Enseignants et Praticiens Hospitaliers Titulaires de Parasitologie et Mycologie Médicale](#)

3.2 Documents associés :

- Néant

4 DÉFINITIONS ET ABBREVIATIONS :

4.1 Définitions :

- Néant

4.2 Abréviations :

- GE : goutte épaisse

5 PRINCIPE DE LA METHODE :

Les parasites suspendus sur diapositives colorées sont observés au microscope et les parasites sont colorés par la solution de Giemsa diluée au 1/10ème dans du eau déminéralisée.
Celle technique présente un avantage d'être plus sensible, car on a la capacité de pouvoir concentrer sur une petite surface une grande quantité de sang, donc de parasites et être réactif ainsi les biodes parasites.

6 PRÉCAUTIONS DE SECURITÉ :

La coloration au Giemsa doit être effectuée sous forme clinique

7 MATÉRIELS ET RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

7.1 Matériel et consommables :

Microscopie - Contraste
 Plaque d'analyse (sur la pellicule)
 Ploches microscopiques égales (0 à 20, 200 μ m) et embois associés (sur la pellicule)
 Ploches Pasteur en plastique
 Lames à large bord et sur la pellicule (la résine se trouve dans le potetou sous la pellicule)
 Gens à usage unique

7.2 Réactifs (sous hotte chimique)

Gens
 Eau tamponnée pH 7,2 (liquide de 3 ml en tube à mémorise sur potet à gauche de la note chimique)
 Eau distillée

8 LOCAUX :

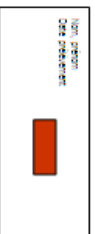
Secteur de parasitologie : pièce 1933

9 DESCRIPTION DU MODE OPÉRATEUR :

9.1 Réalisation de la goutte épaisse :

Étaler 2 gouttes épaisses sur 2 lames préalablement identifiées au crayon à jeter sur la plaque de verre (nom, prénom et date du prélèvement) :

- 1) Homogénéiser le sang en remuant délicatement le tube par roulement
- 2) Étaler sur une lame oblique, 5 μ l de sang sur une surface rectangulaire de 1,5 cm de long sur 0,5 cm de large
- 3) Faire sécher sur la plaque chauffante en surveillant afin de stopper dès la fin du séchage (attention à ne pas brûler) (onguent, le sang séche de couleur)



9.1.1 Coloration de la goutte épaisse au Giemsa

- 1) Couvrir immédiatement en recouvrant toute la lame de la solution de Genssa diluée extemporanément au 1/10ème dans l'eau tamponnée pH 7,2 (3 ml d'eau et 3 gouttes de Genssa ou 4,5 ml d'eau et 500 μ l de Genssa)
- 2) Laisser agir 20 mn
- 3) Rincer sur lames de la lame
- 4) Essuyer le dessous avec du papier absorbant
- 5) Faire sécher à l'air ou sur la plaque chauffante

9.1.2. Lecture de la goutte épaisse colorée :

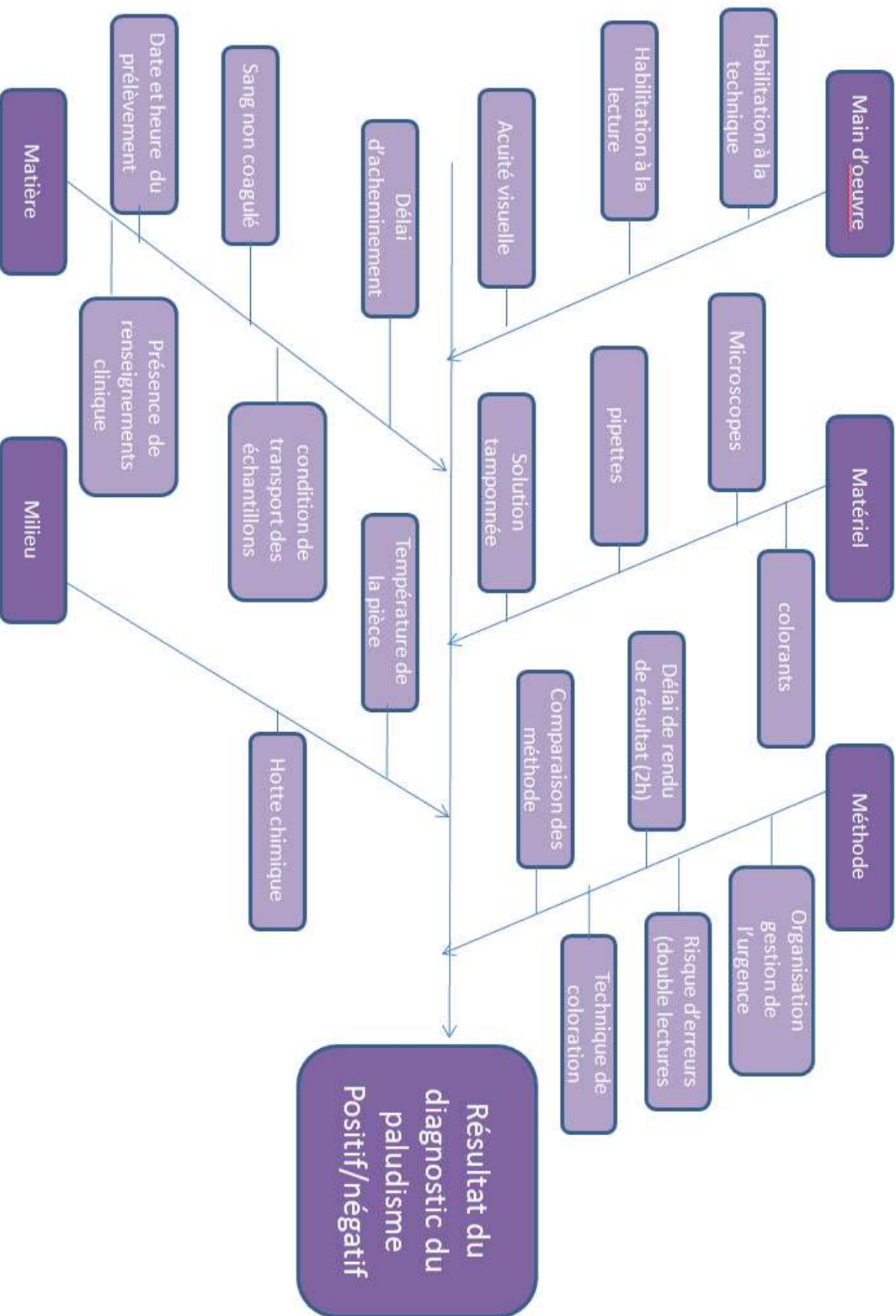
- Vérifier la qualité de la goutte épaisse (CEI, elle doit être non décollée, les lymphocytes et les polynucléaires colorés en violet et voir de la CEI tout être tous dans ou très près
- Lire toute la CEI au microscope à l'objectif 100 immersion
- Rechercher la présence de **BOUCONTOIRES** et/ou de **BOUCONTOIRES** et/ou de **SPOROZOITES**

9.1.3 Interprétation des résultats :

- Réviser le résultat en précisant le stade parasitaire (**BOUCONTOIRES**, **SPOROZOITES**, **SPOROZOITES**...)

- L'orientation du diagnostic classique par cette technique est possible en cas de présence de **SPOROZOITES** en dehors spécifiques de **Plasmodium**, dans les autres cas le diagnostic classique sera comme par le mot sanguin et/ou le test antigénique.

ANNEXE V



RESUME

Le Laboratoire de Biologie Médicale (LBM) du pôle B2P du Groupe Hospitalier Saint-Louis/Lariboisière/Fernand Widal est entré dans une démarche d'accréditation conformément aux exigences de la norme NF EN ISO 15189. Au cours de l'année 2014, le LBM est officiellement accrédité COFRAC pour des analyses de biochimie et d'hématologie. L'accréditation est progressivement étendue aux différents secteurs spécialisés du LBM. Au niveau du secteur de parasitologie, le diagnostic du paludisme est l'une des analyses à accréditer en première intention car c'est un examen fréquent et urgent. Il était donc indispensable de mettre à jour toutes les procédures et modes opératoires et aussi de préparer le dossier de vérification des techniques utilisées pour ce diagnostic, conformément à la norme NF EN ISO 15189 et les guides techniques du COFRAC. De plus, le diagnostic du paludisme est une technique manuelle observateur-dépendant qui nécessite une maîtrise des différentes étapes de l'analyse. Par conséquent, la mise en place d'une habilitation initiale et continue du personnel (internes de biologie médicale dans cette étude) a été un critère majeur à prendre en compte pour assurer la qualité de cette analyse.