

Université Pierre et Marie Curie -

Sorbonne Universités

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

PRÉPARATION A L'ACCRÉDITATION DU PALUDISME

COLORATION DU FROTTIS AU MGG

VÉRIFICATION D'UNE MÉTHODE QUALITATIVE

LE ROY Nicole

Année 2015-2016

Note au lecteur

« Les mémoires des stagiaires du Diplôme Universitaire « 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 ».



Nicole LE ROY

Biologiste Médical

SELAS BIOSYNERGIE

16, Esplanade Grand Siècle

78000 Versailles

REMERCIEMENTS

Je remercie les responsables du DU « Assurance Qualité au laboratoire de biologie médicale » ainsi que tous les intervenants pour la qualité de leur enseignement.

Je remercie et exprime ma gratitude au Docteur S.BOYER, Responsable Qualité du Laboratoire Biosynergie pour son soutien, sa disponibilité, ses conseils avisés, et sa participation active à ce travail.

Je remercie particulièrement Dominique GIANFROTTA, technicienne, pour son aide précieuse, son enthousiasme et son efficacité.

Je remercie l'ensemble des techniciennes du secteur hématologie pour leur implication dans ce travail et pour leur accueil toujours chaleureux.

SOMMAIRE

GLOSSAIRE.....	1
I - INTRODUCTION.....	2
I – 1) La réforme de la biologie médicale.....	2
I – 2) Présentation du laboratoire- Avancement dans la démarche qualité	3
I – 3) Objectifs et limites de l'étude	4
II - ETUDE.....	6
II – 1) Planification du projet.....	6
II-1-1) Etat des lieux.....	6
II-1-2) Méthodologie utilisée.....	8
II – 2) Mise en place et réalisation	9
II-2-1) Documents associés et références.....	9
II-2-2) Description du processus de vérification.....	10
II-2-3) Description de la méthode	11
II-2-4) Analyse et maîtrise des risques.....	11
II-2-5) Evaluation des performances	13
A – Variabilité interopérateurs	13
B – EEQ – CNQ	14
C – Comparaison de méthodes	14
II – 3) Habilitation et maintien de compétences	15
II-3-1) Habilitation- maintien des compétences – formation.....	15
II-3-2) Critères de qualification et compétences	16
II – 4) Analyse des résultats et axes d'amélioration	18
II-4-2) Vérification de la méthode	19
II-4-3) Habilitation du personnel/maintien des compétences	20
II-4-4) Axes d'amélioration	20
III – Conclusion.....	22
IV – Bibliographie	23
V – Table des annexes.....	24

GLOSSAIRE

CNQ : Contrôle National de Qualité
COFRAC : Comité Français d'Accréditation
DMDIV : Dispositif Médical de Diagnostic In Vitro
EEQ : Evaluation Externe de la Qualité
ETP : Equivalent Temps Plein
GTA : Guide Technique d'Accréditation
IQ : Indicateur Qualité
LBM : Laboratoire de Biologie Médicale
MGG : May Grünwald Giemsa
NC : Non-Conformité
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PT : Plateau technique
RAQ : Responsable Assurance Qualité
RDD : Revue De Direction
SMQ : Système de Management de la Qualité
TDR : Test de Diagnostic Rapide

Définitions :

Méthode qualitative : méthode générant un résultat n'apportant pas d'information sur la quantité de l'analyte, mais seulement sur sa présence ou son absence (positif/négatif), voire sur une présence ou une activité supérieure à celle d'un témoin donné.

Portée flexible standard A : portée correspondant à une demande d'accréditation du laboratoire souhaitant avoir la possibilité entre 2 visites de Cofrac, d'utiliser sous accréditation les révisions successives des méthodes reconnues et d'adopter des méthodes reconnues reposant sur des compétences techniques qu'il a précédemment démontrées.

Validation : confirmation, par des preuves objectives, que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue ont été satisfaites.

Vérification : confirmation, par des preuves tangibles, que les exigences spécifiées ont été satisfaites.

I - INTRODUCTION

I – 1) La réforme de la biologie médicale

L'ordonnance 2010-49 du 13 janvier 2010, modifiée par la loi n°2013-442 du 30 mai 2013, rend obligatoire l'accréditation par le COFRAC selon la norme NF EN ISO 15189 version 2012 de tous les Laboratoires de Biologie Médicale (LBM).

Les exigences de la loi du 31 mai 2013 imposent aux LBM de disposer :

- ▶ Au 31 octobre 2016 d'une accréditation couvrant 50% de l'activité en volume avec au moins un examen accrédité par famille,
- ▶ Au 31 octobre 2018 d'une accréditation couvrant 70% de l'activité en volume avec au moins un examen accrédité par famille.
- ▶ Et au 31 octobre 2020 d'une accréditation couvrant 100% de l'activité.

L'arrêté du 04 novembre 2015 publié le 11 novembre 2015 a modifié la liste des familles du domaine de la biologie médicale. La révision des documents SH REF 08 et SH INF 50 a débuté pour prendre en compte cet arrêté. Les familles d'examens sont désormais réunies en 3 familles :

- ▶ Famille n°1 : Biochimie – Génétique,
- ▶ Famille n°2 : Immunologie – Hématologie – Biologie de la reproduction,
- ▶ Famille n°3 : Microbiologie.

La Norme NF EN ISO 15189 contient des exigences techniques, comme précédemment le GBEA, mais impose également la mise en place d'un Système de Management de la Qualité (SMQ) dans une approche processus.

L'accréditation est une reconnaissance de la compétence du LBM fondée sur une évaluation des pratiques par des pairs. Son objectif est de garantir la fiabilité des examens et

la qualité du conseil médical. Ce gage de qualité établi dans l'intérêt du patient, permet d'instaurer la confiance des clients vis-à-vis du laboratoire.

La vérification/validation des procédures analytiques est un élément clé de la démarche qualité. La Norme NF EN ISO 15189 (1) lui consacre son chapitre 5.5 traitant de la sélection (§ 5.5.1.1), vérification (§ 5.5.1.2) et validation des procédures analytiques (§ 5.5.1.3).

La méthode qualitative de coloration du frottis sanguin au MGG pour le diagnostic du paludisme utilisée au LBM est « une méthode reconnue (mode d'emploi de DM-DIV marqués CE au titre de la directive 98/79/CE). La validation de la méthode utilisée au LBM est réduite à une « vérification sur site » pour s'assurer que les performances attendues sont atteintes dans les conditions de travail du laboratoire. Le laboratoire revendique dans ce cas une portée flexible standard de type A » (SH REF 02- § 5.5.1.2) (2).

Le guide SH-GTA-04(3) du Cofrac explicite les exigences de la norme dans le cadre d'une vérification/validation de méthode qualitative. Il propose différents moyens de répondre aux critères de validation : variabilité inter-opérateurs, exactitude, étendue de mesure, comparaison de méthodes, robustesse et fiabilité des réactifs.

I – 2) Présentation du laboratoire- Avancement dans la démarche qualité

Le LBM BIOSYNERGIE est une structure privée polyvalente exerçant sous forme d'une SELAS et exploitant 10 laboratoires situés dans les Yvelines (78). Ce laboratoire multi-sites était historiquement en 1994 constitué de 4 laboratoires.

Entre 2002 et 2010 différentes intégrations et ouvertures successives de laboratoires sont réalisées.

En 2010, création d'un plateau technique polyvalent à Guyancourt (78).

En 2010, après l'intégration des laboratoires de Bois d'Arcy (78) et Saint Cyr l'Ecole (78), évolution de BIOSYNERGIE en un laboratoire multi-sites, le premier dans les Yvelines.

En 2013, BIOSYNERGIE devient filiale du groupe BIO PARIS OUEST (BPO) dont le siège est à Neuilly-sur Seine (92).

En fin en 2015, transfert du laboratoire de la Celle Saint-Cloud (78) de BPO vers BIOSYNERGIE. (Annexe I)

Le LBM traite en moyenne 900 dossiers/jours avec environ 90% de clientèle directe. Les examens sont réalisés sur les 2 plateaux techniques (PT) que sont :

- BIOSYNERGIE- Les Saules (Guyancourt) réalisant l'ensemble des examens de routine du laboratoire du lundi au samedi.
- BIOSYNERGIE- Clinique : site intégré dans les locaux de l'Hôpital Privé de Versailles pour lequel il réalise des examens 7 jours /7 et 24 heures /24 et notamment pour le service des urgences de l'hôpital. Ce site effectue certains examens urgents pour les autres sites de BIOSYNERGIE.

Les huit autres sites du LBM constituent des sites pré et post-analytiques.

Le LBM est dirigé par 11 biologistes coresponsables et son personnel est composé de biologistes médicaux, techniciens, qualificateur, infirmières, secrétaires et agents d'entretien représentant un effectif de 70 ETP.

Le LBM BIOSYNERGIE est accrédité par le Cofrac depuis le 1^{er} octobre 2014, section Santé Humaine n°8-3342, selon la norme NF EN ISO 15189. En juin 2016 a eu lieu le deuxième audit de surveillance du Cofrac.

Toutes les portées d'accréditation sont ouvertes sur le PT des Saules.

En 2016, afin d'atteindre 50% d'activité accréditée, les paramètres qui seront ajoutés au fur et à mesure de l'avancée des dossiers de vérification de méthode, le seront dans le cadre de la gestion de portée flexible. Cela concerne :

- A la Clinique, la chimie sanguine faite sur les deux nouveaux Vitros
- Aux Saules : les paramètres ASAT, ALAT, GGT, urée, créatinine, CA125, CA15-3, CA19-9

I – 3) Objectifs et limites de l'étude

L'objet de cette étude est de préparer le LBM BIOSYNERGIE à l'accréditation du diagnostic du paludisme prévue pour fin 2017.

Le LBM est accrédité sur la ligne IB1 de la sous famille sérologie infectieuse (famille n°3 Microbiologie). L'objectif de l'étude est de préparer le dossier de demande d'extension d'accréditation sur la ligne PM7 (recherche et identification de parasites) de la sous famille Parasito – Mycologie (PARASITOMYCO) (4).

Le diagnostic biologique du paludisme s'effectue sur les deux plateaux techniques aux horaires d'ouverture du LBM, le site de la clinique assurant en plus le diagnostic pendant les périodes de garde, les week-ends et les jours fériés.

Le LBM BIOSYNERGIE a effectué 82 recherches de paludisme en 2015 réparties sur les deux plateaux techniques (41 recherches sur le plateau des Saules et 41 recherches sur le plateau de la Clinique)

Le diagnostic biologique du paludisme est un diagnostic d'urgence. Il est réalisé à l'aide de deux techniques : le frottis mince coloré au May Grünwald Giemsa (MGG), technique de référence et la recherche d'antigènes par un Test de Diagnostic Rapide (TDR).

L'étude porte sur la préparation du dossier de vérification/validation de la recherche du Paludisme par la technique du frottis mince coloré au MGG sur le plateau technique des Saules.

La méthode utilisée par le laboratoire est normalisée et s'inscrit dans une portée A de type qualitatif. Il s'agit d'une vérification rétrospective des performances dans le cas d'une méthode déjà utilisée par le laboratoire (période l'étude de janvier à décembre 2015).

La maîtrise du processus analytique, la vérification de méthode, l'analyse et la maîtrise des risques, l'évaluation des performances et enfin les preuves d'habilitation et du maintien des compétences du personnel sont autant de points critiques à maîtriser et d'axes d'améliorations à prévoir avant de rédiger le formulaire SH FORM 43 et de l'adresser au Cofrac.

Le faible nombre annuel de demandes de diagnostic va mettre en évidence la difficulté de l'habilitation et du maintien des compétences du personnel et une nouvelle organisation de la démarche diagnostique devra être à l'étude afin de répondre aux exigences de la norme.

II - ETUDE

II – 1) Planification du projet

II-1-1) Etat des lieux

Le paludisme est une maladie grave, potentiellement mortelle en l'absence de prise en charge rapide et appropriée. Son diagnostic est par conséquent une urgence médicale. Toute fièvre chez un patient de retour d'une zone d'endémie palustre est un PALUDISME jusqu'à preuve du contraire.

C'est une parasitose due à des hématozoaires du genre Plasmodium, transmise par des moustiques du genre Anophèles. En 2009, le paludisme reste la première endémie parasitaire mondiale. En France le nombre de cas de paludismes d'importation diagnostiqués chaque année est estimée à 6000.

Il existe de très nombreuses espèces de Plasmodium mais seulement cinq de ces espèces sont retrouvées en pathologie humaine. Il s'agit de Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium malariae et Plasmodium knowlesi. Les cinq espèces diffèrent par des critères biologiques, cliniques, leur répartition géographique et par leur capacité à développer des résistances aux antipaludéens.

D'emblée il faut différencier Plasmodium falciparum des autres espèces. En effet, Plasmodium falciparum est celui qui est le plus répandu à travers le monde et qui est responsable du neuropaludisme ou accès pernicleux, complication majeure d'évolution mortelle en l'absence de prise en charge adaptée (des cas mortels dus à Plasmodium knowlesi ont récemment été rapportés aux Philippines) (6) (7) (8).

Le diagnostic biologique du paludisme est un diagnostic d'urgence. L'objectif fixé par la Conférence de consensus de 1999 et les recommandations de l'OMS est d'obtenir un délai de rendu de résultat inférieur à deux heures avec un contact direct entre le médecin prescripteur et le biologiste (6).

Le diagnostic biologique du paludisme est assuré par les cinq biologistes coresponsables et médicaux du plateau des Saules et par les trois techniciennes du secteur hématologie (annexe II).

Deux techniques sont utilisées en routine (annexe III) :

► L'examen microscopique d'un frottis sanguin mince coloré au MGG. Cet examen est avec la technique de la goutte épaisse une des deux techniques de référence préconisées par l'OMS. Il permet la mise en évidence du Plasmodium dans les hématies étalées en monocouche. Après fixation au May-Grunwald, le frottis est coloré par le Giemsa dilué en eau tamponnée. Les parasites colorés en rouge (noyau) et bleu (cytoplasme) sont retrouvés à l'intérieur des hématies. C'est un examen qui permet de faire le diagnostic d'espèce plasmodiale et le calcul de la parasitémie, critère essentiel pour juger de la gravité de la maladie, pour instaurer le traitement adéquat et pour contrôler son efficacité. Le paludisme grave d'importation est défini par une parasitémie >4%.

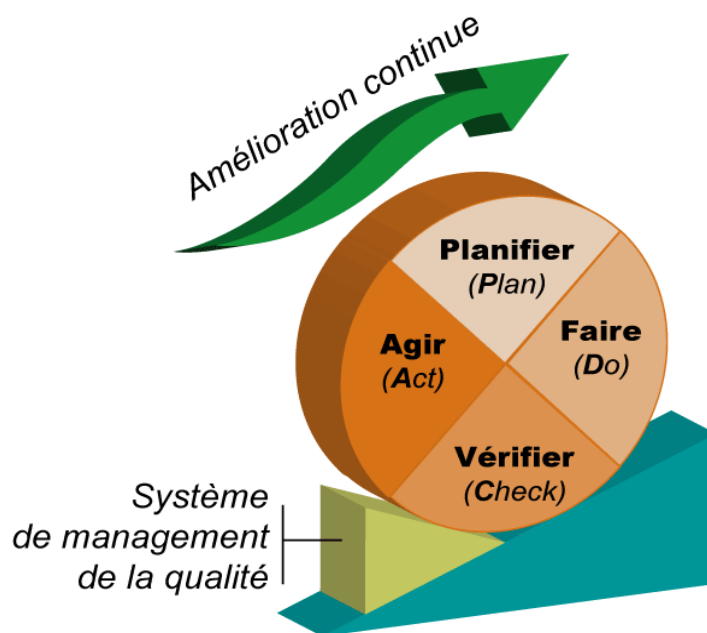
C'est un examen simple, rapide, peu coûteux en moyens et réactifs qui nécessite une bonne expérience du lecteur. Le frottis sanguin a été retenu par la dernière Conférence de consensus comme l'examen de première intention mais il doit être immédiatement complété d'une autre technique en cas de négativité (6).

► Un test rapide détectant les antigènes plasmodiaux par immunochromatographie sur bandelette : Core™ Malaria Pan /Pv/Pf distribué par la société Fumouze. Ce test détecte la protéine HRP-2 (histidin rich protein-2) spécifique de Plasmodium falciparum, la pLDH spécifique de Plasmodium vivax et la Pan pLDH spécifique de toutes les espèces de Plasmodium. Il permet d'orienter le diagnostic d'espèce mais ne permet pas l'évaluation de la parasitémie. C'est un test simple, rapide mais dont les performances sont dépendantes de la parasitémie du sujet infecté. Ce test doit être considéré comme complémentaire.

II-1-2) Méthodologie utilisée

Le cycle PDCA (roue de Deming), l'analyse des risques à l'aide du diagramme d'Ishikawa (5M) et l'étude de la variabilité inter-opérateurs ont permis l'organisation de ce travail.

Le cycle PDCA est un outil de gestion qui permet une amélioration continue de la qualité en quatre étapes qui se répètent : la roue progresse grâce à la mise en place d'un Système de Management de la Qualité (SMQ) ou Assurance Qualité efficace.



PLAN : Planification du projet avec la RAQ et regroupement de l'ensemble des documents de travail : normatifs, référentiels, bibliographiques et documents internes.

DO : Mise en application avec rédaction du dossier de validation/vérification

- Description et choix de la méthode
- Réalisation d'une analyse des risques (diagramme d'Ishikawa)
- Evaluation des performances
- Comparaison de méthodes

CHECK : Vérification de l'atteinte des objectifs

- Evaluation Externe de la Qualité (EEQ) et Contrôle National de la Qualité (CNQ)
- Etude de la variabilité inter-opérateurs
- Indicateurs qualités
- Habilitation du personnel et maintien des compétences

ACT : Ajustement et correction avec programmation d'un audit interne, définition d'axes d'amélioration conduisant vers un nouveau PLAN.

II – 2) Mise en place et réalisation

II-2-1) Documents associés et références

Le diagnostic biologique du paludisme est effectué sur le PT des Saules depuis sa création en 2010, selon un protocole et sélection de procédures analytiques validées (§5.5.1.1).

La norme NF EN ISO 15189 version 2012 exige que « les procédures d'examen validées utilisées sans modification doivent faire l'objet d'une vérification indépendante par le laboratoire avant d'être utilisées régulièrement. Le laboratoire doit documenter la procédure utilisée pour la vérification et enregistrer les résultats obtenus ». (§5.5.1.2).

Dans un premier temps il a donc été nécessaire de réunir tous les documents de travail antérieur afin de remplir les critères énoncés par le Cofrac.

Cela concerne notamment :

- ▶ Les textes normatifs, réglementaires et référentiels de vérification de méthode.
- ▶ Les revues bibliographiques, recommandations pour l'accréditation (5), consensus des sociétés savantes (6), les notices fournisseur.
- ▶ Les procédures, modes opératoires et enregistrements existants concernant le diagnostic du paludisme, le traitement de l'urgence, l'habilitation du personnel, la validation et la diffusion du résultat (annexes III, IV, V, VI, VIII).
- ▶ Les résultats des contrôles de qualité (EEQ et CNQ).
- ▶ Les résultats de l'étude de comparaison de méthodes.

Le LBM Biosynergie dispose d'un logiciel de gestion documentaire GESQUAL WEB, conçu par ARMURE, commun à tous les sites. Il permet de réunir tous les documents transversaux spécifiques de chaque processus.

La diffusion et prise de connaissance des documents fait l'objet d'un suivi et d'un indicateur examinés lors des revues qualité mensuelles par site.

II-2-2) Description du processus de vérification

La réalisation du dossier de vérification de méthode s'est faite à l'aide du logiciel PLEVER de la société VISKALI.

La recherche de Plasmodium sur frottis mince coloré au MGG est une méthode qualitative.

Il s'agit d'une portée A entrant dans un processus simple.

Les critères de performances à évaluer sur site sont : la variabilité inter-opérateurs, l'exactitude, la comparaison de méthode, la robustesse et la fiabilité des réactifs. L'étendue de mesure a été faite par une étude bibliographique (annexe VII).

Les autres critères de performances ne sont pas applicables car il s'agit d'une méthode qualitative. Cela concerne notamment :

- ▶ La répétabilité : l'étalement manuel sur lame d'un frottis ne peut pas être strictement répétable.
- ▶ La fidélité intermédiaire : test qualitatif.
- ▶ La justesse : absence de Contrôle Interne de Qualité (CIQ) existants.
- ▶ La sensibilité et spécificité analytique : la sensibilité du frottis sanguin se situe selon les auteurs entre 100 et 150 parasites /ul et dépend de l'expérience de l'observateur. Elle est corrélée au temps d'observation (pour un frottis : lecture d'au moins 100 champs, en pratique vingt minutes).
Le diagnostic microscopique peut être pris en défaut dans les formes pauciparasitaires. Il est recommandé en cas de forte suspicion clinique et examen clinique négatif de répéter le prélèvement sanguin 6-12 heures plus tard (6) (9) (10).
- ▶ L'incertitude de mesure : test qualitatif.
- ▶ Les interférences : la seule interférence correspond à la recherche réalisée après la mise en place d'un traitement curatif mais impossible à évaluer.
- ▶ L'intervalle de référence : test qualitatif.

II-2-3) Description de la méthode

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande :	Recherche de plasmodium sur frottis
Principe de la Méthode :	-Examen morphologique direct microscopique (examen en immersion 100x10) d'un frottis sanguin coloré au M.G.G: mise en évidence de Plasmodium. -Calcul de la parasitémie : on choisira 10 champs au hasard et éloignés des uns des autres. pour chaque champ on dénombre : * le nombre d'hématies parasitées * le nombre total d'hématies La parasitémie exprimée en % correspond au rapport : * Nombre d'hématies parasitées / Nombre d'hématies totales.
Type d'échantillon primaire :	Sang total
Type de récipient, additifs :	Tube EDTA
Prétraitement de l'échantillon :	Réalisation d'un frottis en couche mince.
Unités :	% pour la parasitémie
Critères d'interprétation :	N/A
Marquage CE (Oui/Non) :	Oui
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	PAR1
Equipement (Instrument, analyseur, etc.) :	Microscope optique à lumière blanche Olympus REF I CRIT MIC2
Référence du réactif :	-May Grünwald en solution ; RAL Diagnostics- UN 1986 (FDS 320070) -Giemsa en solution ; RAL Diagnostics- UN 1992 (FDS 320310) - Kit RAL 555 - Comprimés tampon pH 6.8 - MERCK
Matériau d'étalonnage (références) :	N/A
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	N/A

II-2-4) Analyse et maîtrise des risques

La version 2012 de la norme ISO 15189 consacre le chapitre 4.14.6 à la gestion des risques : « Le laboratoire doit évaluer l'impact des processus de travail et défaillances potentielles sur la sécurité des résultats d'examen et doit modifier les processus pour réduire ou éliminer les risques identifiés, et documenter les décisions et les actions menées ».

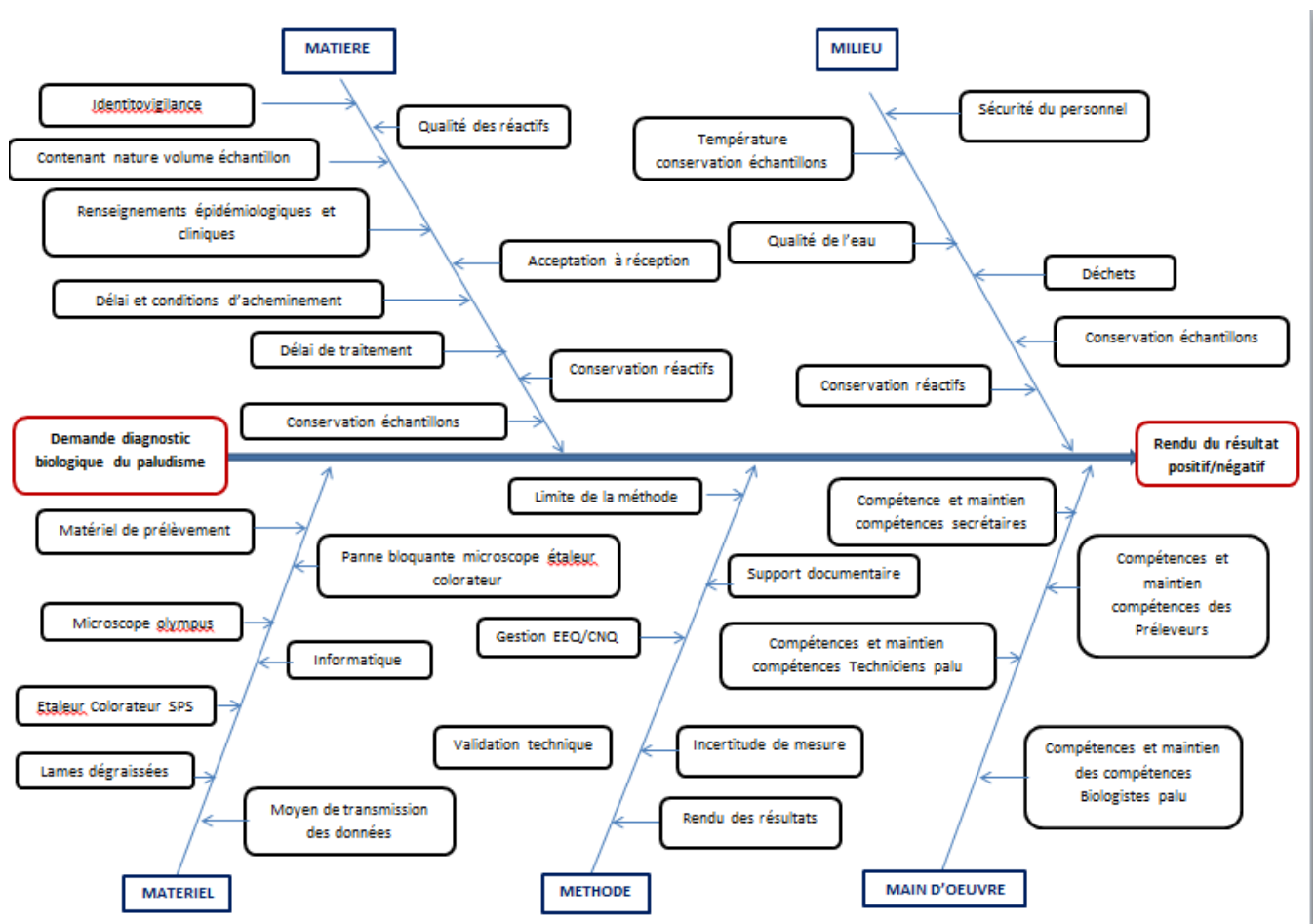
De même, le document SH REF02 (§4.14.6) mentionne que : « Le laboratoire doit évaluer l'impact des processus de travail et défaillances potentielles sur les résultats d'examens de façon à limiter le risque pour la sécurité des patients [...] ».

La gestion des risques fait également partie des éléments d'entrée de la Revue De Direction (RDD) (§4.15.2).

Cette analyse s'est faite selon la méthode d'Ishikawa ou méthode des 5M. Les différents facteurs pouvant influencer le résultat sont classés selon cinq familles (annexe VII) :

- ▶ **Matière** : prélèvement, échantillon, renseignements, délais d'acheminement, de traitement et de conservation
- ▶ **Milieu** : respect de conservation échantillons et réactifs, métrologie, hygiène et sécurité, gestion des déchets, qualité de l'eau
- ▶ **Matériel** : équipements, réactifs, informatique
- ▶ **Méthode** : exactitude, incertitude et limites de la méthode
- ▶ **Main d'œuvre** : qualification et habilitation du personnel, maintien des compétences

Diagnostic du paludisme – Frottis sanguin coloré au MGG – Urgence



L'identification des facteurs influençant le résultat s'est faite au sein de chaque famille selon une approche processus : le pré-analytique, l'analytique, le post-analytique en incluant les processus support.

La criticité de chaque facteur est évaluée selon la méthode AMDEC qui permet l'estimation de la Détectabilité, de la Gravité et de la Fréquence et le calcul de l'Indice de Priorité de Risques (IPR) selon la formule suivante :

$$\text{IPR} = \text{D} \times \text{G} \times \text{F}$$

Les actions de préventions sont déclenchées si la gravité est égale à 4 ou si l'IPR est supérieur ou égal à 16.

II-2-5) Evaluation des performances

A – Variabilité interopérateurs

L'étude a consisté à une évaluation par lecture de sept lames de CIQ anonymisées des cinq biologistes et des 3 techniciennes du secteur hématologie (annexe VII).

Les critères d'évaluation étaient la présence ou l'absence de parasites, la reconnaissance de l'espèce, du stade et le calcul de la parasitémie (uniquement pour les biologistes).

Le CV de variabilité doit être nul pour la reconnaissance de Plasmodium falciparum.

Le CV de variabilité doit être <20% pour les autres types de Plasmodium.

L'étude a été faite en août 2016 pour les 3 techniciennes.

L'étude est en cours pour les cinq biologistes.

Argumentaire de la conclusion :

Pour les techniciennes :

- ▶ Espèce : P.falciparum : 89% de concordance : Non Conforme
Autres espèces : 66% de concordance : Pas d'exigence pour les techniciens
- ▶ Stade : 100% de concordance entre les trois techniciennes.
- ▶ Parasitémie : NC

B – EEQ – CNQ

L'évaluation de l'incertitude s'est faite à partir des contrôles externes ponctuels EEQ/CNQ (annexe VII) :

- ▶ un contrôle ANSM / an (CNQ) : période d'étude de 2012 à 2015.
- ▶ quatre contrôles CTCB / an (EEQ) : première inscription en avril 2016. Evaluation en cours et résultats en attente.

Argumentaire de la conclusion :

Exactitude conforme sauf pour le CNQ de l'année 2015 (NC 50305)

C – Comparaison de méthodes

Cette évaluation s'est faite à partir des 41 demandes de diagnostic de paludisme de l'année 2015 en comparant les deux techniques réalisées sur le PT à savoir (annexe VII) :

- ▶ le frottis coloré au MGG
- ▶ le TDR antigénique : Core® Malaria Pan/Pv/Pf de chez Fumouze

sur les critères suivants : présence ou absence de Plasmodium, reconnaissance de l'espèce plasmodiale.

La méthode d'exploitation des résultats a consisté à une analyse des discordances.

- ▶ Présence ou absence de Plasmodium : il y a trois discordances entre le TDR et le frottis : Présence de Plasmodium avec le TDR / Absence de Plasmodium avec le frottis. Instauration récente d'un traitement dans les trois cas.
- ▶ Détermination de l'espèce plasmodiale : 100 % de concordance de détermination d'espèce (*P.falciparum*) pour les deux cas positifs par les deux techniques.

Argumentaire de la conclusion :

La technique du frottis sanguin est moins sensible que celle du TDR. Ses performances en terme de sensibilité peuvent être prises en défaut en cas de formes pauciparasitaires et /ou en cas d'instauration d'un traitement mais elle permet un diagnostic d'espèce et d'effectuer une parasitémie. Le TDR est un complément à la lecture du frottis mais ne doit pas s'y substituer. Il montre une excellente concordance avec la lecture du frottis sanguin sur les 41 échantillons comparés au laboratoire, en termes de spécificité et de sensibilité

II – 3) Habilitation et maintien de compétences

II-3-1) Habilitation- maintien des compétences – formation

Selon le document SH REF02 (§5.1.6) « Le laboratoire doit évaluer la compétence de l'ensemble du personnel, y compris les biologistes médicaux, au regard des tâches attribuées selon des critères établis. La réévaluation doit avoir lieu à intervalle régulier, notamment en cas d'arrêt prolongé de l'activité....Le laboratoire doit assurer le maintien des compétences du personnel sur l'ensemble des tâches qu'ils sont amenés à réaliser, y compris celles réalisées occasionnellement ».

Le LBM BIOSYNERGIE a défini dans des procédures disponibles dans Gesqual, les modalités de gestion du recrutement, des formations et des compétences.

En ce qui concerne le diagnostic biologique du paludisme plus spécifiquement, dès son embauche ou nouvelle affectation, le personnel est pris en charge sous forme d'un tutorat actif permettant de l'intégrer dans le poste de travail.

Une évaluation des compétences basée sur la qualification initiale, les formations internes et/ou externes théoriques et pratiques est réalisée. Cette évaluation se fait à l'aide d'une grille de formation-habilitation au poste de microbiologie (B-ENR-Qual 002) (annexe VIII) et a lieu :

- ▶ À l'issue de la formation d'intégration et avant la prise du poste
- ▶ Lors d'un arrêt prolongé de l'activité (absence > à six mois)
- ▶ Suite à l'analyse des non conformités et audits internes réalisés lors des revues qualités, au moment de la RDD et lors des entretiens individuels

Une formation de recyclage sur le poste peut être organisée si nécessaire.

La matrice des compétences est mise à jour. Elle se décompose en cinq niveaux :

- 1 - : travail en binôme
- 2 - : travail en routine encadré
- 3 - : travail autonome
- 4 - : référent
- 5 - : référent formateur

Quand la personne est habilitée au poste diagnostic biologique du paludisme, elle est affectée au poste en toute autonomie (niveau 3 de la matrice).

L'évaluation des référents est réalisée par le biologiste. L'évaluation des autres personnels occupant le poste peut ensuite être déléguée par le biologiste au référent du poste concerné.

L'habilitation est prononcée par le biologiste qui date et signe la grille de formation-habilitation.

Après habilitation, les compétences au poste sont évaluées périodiquement, au maximum tous les deux ans, lors de l'entretien d'évaluation. Cette évaluation peut avoir lieu à l'aide de la grille initiale, d'une observation au poste de travail ou d'une autoévaluation théorique par un questionnaire ou pratique à la lecture des lames.

Le maintien de l'habilitation est prononcé par le biologiste à l'issue de l'évaluation. Les attestations et preuves de formation, habilitations et maintien des compétences sont tracées dans Gesqual.

Au sein du PT des Saules, les personnels à habilitier sont :

- les cinq biologistes co-responsables et médicaux
- les trois techniciennes du secteur hématologie

II-3-2) Critères de qualification et compétences

Les critères de qualification, de développement et de maintien des compétences plus spécifiques pour le diagnostic de paludisme (annexe VIII) sont résumés dans le tableau suivant.

Certains critères sont communs aux Biologistes (B) et aux Techniciennes (T), d'autres ne s'adressent qu'aux biologistes.

Taches et connaissances (n° de la grille)	Critères de qualification	Critères de développement des compétences
Savoir gérer une urgence (n°1)	Décrire la gestion en urgence d'une demande de paludisme (B, T)	Connaitre le délai et les modalités de rendu du résultat (B, T)
Accueil d'un prélèvement (n°7) Critères d'acceptation et de refus d'un prélèvement (n°8)	Connaitre les conditions de recueil et les critères de refus et d'acceptation d'une demande de paludisme (B, T)	Savoir utiliser le manuel de prélèvement et les fiches de renseignements clinico-biologiques pré-analytiques (B, T)
Recherche de paludisme (n°16)	Conduite à tenir lors d'une demande de recherche de paludisme (B, T)	Savoir appliquer les MO : - recherche sur frottis sanguin (B, T) - recherche d'antigènes (B, T) - calcul parasitémie (B) - conditions de rendu du résultat (B, T) - transmission du résultat et traçabilité (B)
Connaissances des procédures dégradées (n°39)	Que faire en cas de panne : - du microscope - du colorateur - de l'informatique	Indiquer les différentes procédures dégradées et connaitre les documents concernés (B, T)
Savoir utiliser le colorateur MGG (n°26)	Demander au personnel formé de faire chacune des taches (B, T)	Montrer comment réaliser chacun de ces points (B, T)
Savoir réaliser une coloration de MGG manuellement (n°41)	Réaliser une coloration de MGG manuelle (B, T)	-Comment réaliser un frottis sanguin -Comment réaliser cette coloration (B, T)

Des Indicateurs Qualité (IQ) ont été définis afin de maîtriser ces critères et de s'assurer que la prestation est conforme (annexe IX). Ces indicateurs sont accompagnés d'objectifs :

Processus Pré-analytique	IQ 21	Taux de renseignements cliniques	> 80 % dossiers renseignés
Processus Analytique	IQ 10	% EEQ conformes	> 90% par famille
Processus Urgence	IQ 20	Délai de rendu des résultats	> 90% dans les délais promis
Processus RH	IQ 18a	Taux habilitation du personnel	> 90% pour les sites périphériques et examens accrédités
	IQ 18b	Taux maintien des compétences	> 80% pour toutes les fonctions

La conformité des objectifs est analysée et tracée lors des revues qualité mensuelles par site (annexe X).

Le suivi des non-conformités et actions d'amélioration (correctives et préventives) déclenchées si les objectifs ne sont pas conformes a lieu au moment des revues trimestrielles des non-conformités et lors de la RDD. Le bilan de la RDD met à jour la liste des indicateurs et les objectifs attendus (annexe IX).

II – 4) Analyse des résultats et axes d'amélioration

II-4-1) Gestion documentaire

La rédaction, la vérification et la validation des procédures et MO pour la recherche de paludisme ont été réalisées suivant le format des procédures transversales du LBM. Cependant cette étude a permis de mettre en évidence que certains documents sont incomplets et demandent à être modifiés :

► La note d'information listant la liste des prélèvements nécessitant des renseignements particuliers ne mentionne pas la recherche de paludisme (annexe XI). La notion de voyage en zone d'endémie palustre, la prise ou non d'une chimioprophylaxie ainsi que son

observance, la présence d'une hyperthermie et/ou d'une anémie sont des renseignements indispensables.

Il conviendra de compléter cette note et de saisir ces renseignements dans le dossier informatique du patient.

► Le MO du dépistage du paludisme est incomplet : seules les étapes du TDR sont écrites. Celles décrivant l'étalement et coloration d'un frottis sanguin par l'étaleur colorateur SPS de la société HORIBA ne sont pas mentionnées.

Il conviendra de revoir et modifier le MO en s'aidant du schéma réalisé par la technicienne D.GIANFROTTA (annexe XII). De même il conviendra de préciser de prélever un tube EDTA supplémentaire pour dosage de la numération formule sanguine si la prescription ne mentionne que la recherche de paludisme pour dépister une anémie et/ou thrombopénie associées.

► Les conditions d'acheminement ainsi que les préconisations concernant le délai de rendu du résultat n'apparaissent pas clairement dans les différents documents concernant le dépistage du paludisme. Les préconisations de l'OMS sont à rappeler à l'ensemble du personnel concerné.

J'ai procédé, pour les 41 demandes de recherche de paludisme sur le PT des Saules sur l'année 2015 au calcul du délai moyen écoulé entre la saisie du dossier et la transmission tracée du résultat au prescripteur. Le délai de rendu pour les deux demandes confirmées positives est de 4h30. Le délai moyen pour les autres demandes (97%) est de 6h.

Le constat n'est pas satisfaisant.

II-4-2) Vérification de la méthode

► L'évaluation de l'exactitude est en cours : inscription récente (2016) à un programme d'EEQ avec quatre lectures annuelles de frottis.

► L'étude de la variabilité inter-opérateur concernant les biologistes est en cours : les résultats de la lecture des lames anonymisées sont à analyser avant la fin de l'année 2016 ou début 2017.

► L'étude croisée entre l'étalement et coloration d'un frottis par l'étaleur colorateur et par la technique manuelle est à prévoir.

► La qualité de la coloration varie en fonction de la neutralité du pH du tampon : la coloration est d'autant plus rouge que le pH est acide et d'autant plus bleue que le pH est basique. L'étude du pH de l'eau, son mode de mesure, est à prévoir. La traçabilité de cette mesure devra être faite dans un enregistrement. Le pH idéal pour l'eau tamponnée se situe autour de 7,2. En routine l'eau tamponnée utilisée a un pH de 6.8.

II-4-3) Habilitation du personnel/maintien des compétences

► L'habilitation des cinq biologistes pour la recherche de paludisme selon les critères de qualification de la grille a été faite en 2015. Celle des trois techniciennes d'hématologie en 2014. Les habilitations reposent sur un grand nombre de critères pertinents cependant certains critères plus spécifiques au paludisme sont à prévoir.

L'évaluation du maintien des compétences est prévue pour les techniciennes avant la fin de l'année 2016 et en 2017 pour les biologistes.

► Les lames d'EEQ et CNQ ne sont pas lues systématiquement par tous les biologistes. Il conviendra d'associer les trois techniciennes à la lecture de ces lames.

► En 2015 seules 41 demandes de recherche de paludisme ont été enregistrées. Ce constat pose le problème du maintien des compétences du personnel car le taux d'occupation du poste et/ou le nombre de passage au poste est trop faible.

II-4-4) Axes d'amélioration

A l'issue de cette étude et après concertation avec la RAQ il a été décidé de :

► Planifier (PLAN) courant novembre 2016 une réunion avec les biologistes et techniciennes du secteur afin de lister l'ensemble des procédures, modes opératoires et enregistrements à modifier ou à créer.

- ▶ De procéder (DO) pendant le premier semestre 2017 :
 - à l'étude de la variabilité inter-opérateurs des biologistes.
 - à l'étude croisée de la coloration entre la technique manuelle par le kit RAL 555 et l'étaleur colorateur SPS.
 - Au contrôle de la mesure du pH de l'eau tamponnée à l'aide de papier pH, d'apporter un adjuvant afin d'obtenir un pH proche de 7,2 et de tracer ces mesures dans un document à créer.
 - Afin d'améliorer le délai de rendu de résultats, d'équiper chaque site périphérique en coffrets de TDR et de former le personnel à son utilisation. En cas de test antigénique positif, le biologiste présent ou un coursier express acheminerait en urgence le tube sur le PT.

- ▶ De vérifier (CHECK) à la fin du premier semestre 2017 :
 - que les documents en vigueur sont bien révisés
 - par un audit interne de paillasse que les performances de la méthode sont atteintes
 - par l'étude de l'IQ 20 que plus de 90% des demandes de recherche de paludisme sont rendues dans le délai promis. Un indicateur de délai de rendu propre au paludisme et répondant aux critères de l'OMS est à envisager (objectif : >90% de résultats en 2 heures).

- ▶ D'améliorer (ACT) les compétences :
 - en proposant des formations théoriques suivies d'une évaluation basée sur un quiz à créer.
 - en proposant une inscription à Parasitimage.
 - en proposant que chaque opérateur procède à une lecture minimum de 5 lames/an (1CNQ-4EEQ) avec critères de 100% de reconnaissance de Plasmodium falciparum et de 80% de reconnaissance pour les autres espèces plasmodiales.

Le bilan de synthèse se fera lors de la RDD et si l'ensemble des écarts constatés sont difficiles à corriger et afin de répondre aux exigences du Cofrac une réorganisation en circuit prioritaire du diagnostic du paludisme est à envisager. Cela pourrait consister à regrouper le diagnostic du paludisme sur un seul PT, celui de la Clinique qui est déjà un pôle d'urgence.

III – Conclusion

L'examen microscopique d'un frottis coloré est une des deux techniques de référence pour le diagnostic en urgence du paludisme.

L'objet de l'étude a porté sur la préparation du dossier de vérification/validation de la recherche de paludisme par la technique du frottis mince coloré au MGG retenue en routine sur le PT des Saules depuis sa création en 2010 .Il s'agissait de s'assurer que les performances analytiques de la techniques répondaient aux critères fixés et par conséquent aux attentes des clients. La gestion documentaire, l'analyse et maîtrise des risques, l'étude de la variabilité inter-opérateurs et la gestion des habilitations et maintien des compétences ont constitué les quatre axes de ce travail.

A l'issue de cette étude, un plan d'action contenant plusieurs axes d'amélioration a été défini afin que la technique du frottis pour la recherche du paludisme soit conforme dans sa globalité aux exigences de la Norme NF EN ISO 15189 et du Cofrac.

Certaines procédures, modes opératoires et enregistrements rédigés en suivant le format des procédures transversales du LBM sont à compléter ou à créer, l'étude de la variabilité inter-opérateurs concernant les biologistes est à terminer. Le délai de rendu des résultats ne répond pas aux préconisations de l'OMS et doit être amélioré. Les habilitations du personnel sont à jour et reposent sur des critères pertinents. Cependant le faible nombre annuel de demandes de diagnostic va mettre en évidence la difficulté du maintien des compétences du personnel et une nouvelle organisation de la démarche diagnostique devra être à l'étude afin de répondre aux exigences de la Norme.

IV – Bibliographie

- 1) COFRAC, Norme NF EN ISO 15189, Laboratoires de biologie médicale : Exigences concernant la qualité et la compétence, décembre 2012.
- 2) COFRAC, SH REF 02, révision 05, Exigences pour l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189, 2016.
- 3) COFRAC, SH GTA 04, révision 01, Guide Technique d'Accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes de biologie médicale, 2015.
- 4) COFRAC, SH INF 50, révision 02, Portées types d'accréditation, 2016.
- 5) Vassault A, Hulin A, Chapuzet E, Arnaud J, Giroud C et les membres de la SFBC, Vérification/Validation des performances d'une méthode d'analyse, Ann.Biol.Clin, 2010,68(Hors-série n°1) ,247-294.
- 6) SPILF, Prise en charge et prévention du paludisme d'importation à Plasmodium falciparum : recommandations pour la pratique clinique 2007, (révision de la Conférence de Consensus 1999).
- 7) campus.cerimes.fr, Parasitologie, Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL), 2014.
- 8) Petihory J.C, Ardoin-Guidon F, Parasites sanguins, Cahier de formation biologie médicale n°23, Bioforma, 2001.
- 9) Minodier P, Dépistage du paludisme : tests rapides, Journal de Pédiatrie et de Puériculture 18 (2005), 386-388.
- 10) Siala E, Ben Abdallah R, Bouratbine A, Aoun K, Actualités du diagnostic biologique du paludisme, Revue Tunisienne d'Infectiologie, janvier 2010, vol.4, 5-9.

V – Table des annexes

Annexe I : Organigramme relationnel de Biosynergie

Annexe II : Organigramme nominatif du site des Saules

Annexe III : MO Dépistage du paludisme

Annexe IV : Etalement et coloration manuelle d'un frottis

Annexe V : Coloration manuelle au MGG avec réactifs RAL 555

Annexe VI : Gestion de l'urgence

Annexe VII: Fiche type de vérification (portée A) /validation (portée B)

Recherche de Plasmodium sur frottis

Annexe VIII : Grille de formation-habilitation aux postes de microbiologie

Annexe IX : Liste des indicateurs 2016

Annexe X : Revue qualité mensuelle par site

Annexe XI : Liste des prélèvements nécessitant des renseignements particuliers

Annexe XII : Recherche de paludisme- proposition de MO

RESUME

Le Laboratoire de Biologie Médicale (LBM) Biosynergie, laboratoire multi-sites exploitant dix laboratoires, est accrédité par le Cofrac selon la Norme NF EN ISO 15189 depuis le 1^{er} octobre 2014. Le diagnostic biologique du paludisme, urgence médicale, est effectué en routine sur les deux Plateaux Techniques (PT) du laboratoire en associant deux techniques : l'examen morphologique microscopique du frottis sanguin (technique de référence) et la recherche d'antigènes de Plasmodium. L'étude a porté sur la préparation du dossier de vérification/validation de la recherche de paludisme par la technique du frottis mince coloré au MGG sur le PT des Saules à Guyancourt (78). Il s'agit d'une méthode normalisée qui s'inscrit dans une portée A de type qualitatif. L'évaluation des critères de performance, l'analyse et maîtrise des risques, l'étude de la variabilité inter-opérateurs et les preuves d'habilitation et de maintien des compétences du personnel sont autant de points critiques à maîtriser afin d'être conforme aux exigences de la Norme NF EN ISO 15189 et de pouvoir rédiger le formulaire SH FORM 43 et l'adresser au Cofrac. A l'issue de l'étude, plusieurs axes d'amélioration concernant les processus de réalisation et les processus support sont à définir et seront à ajuster après réalisation d'un audit interne de paillasse. Un plan d'action redéfinissant les objectifs qualité en particulier l'amélioration du délai de rendu du résultat est à envisager. Devant le constat d'un nombre faible de demandes et donc d'un faible taux d'occupation du poste une réorganisation en circuit prioritaire devra être à l'étude pour assurer la qualité de cet examen d'urgence et répondre aux exigences normatives.