

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE

**Recherche et identification des agents pathogènes du Paludisme en Urgence :  
Techniques Qualitatives. Technique Quantitative pour calcul de la parasitémie**

Portée A  ; Portée B

Le diagnostic doit répondre à la question présence ou absence de *Plasmodium*

Le diagnostic du paludisme en urgence nécessite la recherche d'hématozoaires du genre *Plasmodium* et du diagnostic d'espèce *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*

Il est nécessaire de faire **un diagnostic de genre et d'espèce**. Le calcul **de la parasitémie** (nombre d'hématies parasitées ramené au nombre total sur un frottis sanguin coloré) est **exprimé en pourcentage**.

**Il existe plusieurs types de recherche en Urgence**

**1- Recherche directe du plasmodium:**

Frottis mince coloré au M.G.G ou GIEMSA qui permet le diagnostic de genre et d'espèce et qui seul permet le calcul de la Parasitémie

Goutte épaisse/ QBC malaria (concentration/coloration à l'acridine orange) qui permettent le diagnostic de genre lorsque la parasitémie est faible mais pas d'espèce

**2- Recherche antigénique:**

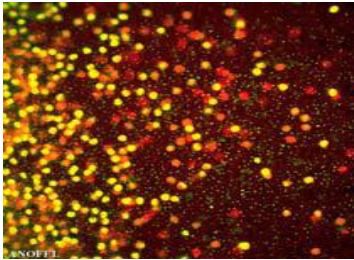
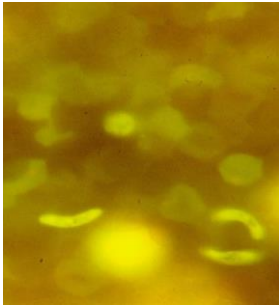
Tests rapides pour recherche HRP2 avec aldolase et/ou LDH qui permettent le diagnostic d'espèce mais pas le calcul de la Parasitémie

**3- Amplification génique** par PCR

Les deux premiers types de recherches sont utilisées par tous les LBM la troisième est réservée à des LBM plus spécialisés

Ce formulaire concerne la vérification des méthodes Frottis mince coloré M.G.G, Technique QBC et Technique PALUTOP+ 4®

## DESCRIPTION DES METHODES

|  |  |
|--|--|
| <b>Analyte / Mesurande :</b>   | Identification d'agents pathogènes du Paludisme dans le sang total   |
| <b>Méthode du frottis Mince</b>  | <b>Examen morphologique direct microscopique</b> (examen en immersion 100 x10) d'un frottis sanguin coloré M.G.G ou GIEMSA avec calcul de la Parasitémie   |
| <b>Méthode QBC Malaria</b>   | <p><b>Concentration –Coloration à l'acridine orange par lecture d'une fluorescence QBC</b> <u>Fluorescence :</u></p> <p>Présence ou absence de Plasmodium : <b>La lecture se fait à l'objectif X 60 à immersion avec 2 à 3 gouttes d'huile à immersion.</b></p> <p>Sur un fond sombre, le noyau des trophozoïtes apparaît en vert</p> <p>La couleur du cytoplasme varie du vert au rouge,</p>  <p><b>parfois</b> mise en évidence de gamétocytes</p>  <p><u>Lumière Blanche :</u> <b>mise en évidence des pigments malariques</b></p> |
| <b>Méthode de recherche antigénique</b>                                  | <p><b>Méthode immuno- chromatographique sur membrane PALUTOP + 4®</b></p> <p>Mise en évidence de la protéine Pf HRP-2 spécifique de l'espèce <i>P.falciparum</i>, l'enzyme Pv LDH spécifique de l'espèce <i>P.vivax</i> et de l'enzyme pLDH commune à toutes les espèces de plasmodium</p>   |
| <b>Type d'échantillon primaire :</b>                                     | Sang Total quelque- soit la technique  |
| <b>Type de récipient, additifs :</b>                                     | Sang total sur tube EDTA quelque- soit la technique  |
| <b>Prétraitement de l'échantillon : Méthode du frottis Mince</b>         | Réalisation d'un frottis en couche mince   |
| <b>Prétraitement de l'échantillon : Méthode QBC Malaria</b>              | Centrifugation avec centrifugeuse spécifique QBC : Centrifugation (600g/5min)  |
| <b>Prétraitement de l'échantillon : Méthode de recherche antigénique</b> | Aucun  |
| <b>Unités :</b>  | % pour la parasitémie du frottis mince   |

|                                    |               |
|------------------------------------|---------------|
| Document<br>d'enregistrement<br>DE | Page : 3 / 17 |
|------------------------------------|---------------|

| DESCRIPTION DES METHODES                                 |   |
|--|---|
| <b>Marquage CE (Oui/Non) :</b>                           | OUI   |
| <b>Codage C.N.Q. (s'il existe) :</b>                     | PAR1 pour le frottis  |
| <b>Equipement : Frottis</b>                              | Microscope optique à lumière blanche                                      |
| <b>Equipement : QBC</b>                                  | Microscope à Fluorescence   |
| <b>Equipement : Recherche antigénique</b>                | Aucun   |
| <b>Référence du réactif :</b>                            | référence fournisseur, version notice (cf ANNEXE 1 tableau récapitulatif) |
| <b>Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :</b> | NA  |

| MISE EN ŒUVRE  |   |
|--|---|
| <b>Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :</b> | Techniciens du secteur morphologie Parasitologie + internes du secteur + Biologistes du secteur   |
| <b>Procédure de validation/mode opératoire :</b>   | <a href="http://srv-kalilab/PG-BIO-MS-QUAL-018-01">http://srv-kalilab/PG-BIO-MS-QUAL-018-01</a>   |
| <b>Procédure de gestion de la portée flexible :</b>  | <a href="http://srv-kalilab/PG-BIO-MS-QUAL-019-01">http://srv-kalilab/PG-BIO-MS-QUAL-019-01</a>   |
| <b>Période d'étude :</b>   | Méthodes utilisées dans le LBM depuis des années.<br>Etude rétrospectives avec exploitation des EEQ + étude sur site<br>2005 pour Frottis et goutte épaisse<br>2008 pour méthode QBC<br>2011 pour méthode de recherche d'antigène |
| <b>Date de 1<sup>ère</sup> utilisation :</b>   | Plus de 10 ans  |

| DESCRIPTION DU PROCESSUS           |    |                                     |  |
|------------------------------------|----|-------------------------------------|--|
| Peu pertinent                      | NA | <input type="checkbox"/>            | 1. Répétabilité                          |
| Peu pertinent                      | NA | <input type="checkbox"/>            | 2. Fidélité intermédiaire                |
| Comparaisons inter-lecteurs        | E  | <input checked="" type="checkbox"/> | 3. Variabilité inter-opérateurs          |
| Discordance : exploitation des EEQ | E  | <input checked="" type="checkbox"/> | 4. Justesse                              |
| Cf ci dessus                       | E  | <input checked="" type="checkbox"/> | 5. Exactitude                            |
|                                    | B  | <input type="checkbox"/>            | 6. Sensibilité et spécificité analytique |
| Tableau de maîtrise des risques    | E  | <input checked="" type="checkbox"/> | 7. Incertitudes                          |
| Peu pertinent                      | NA | <input type="checkbox"/>            | 8. Etendue de mesure                     |
| Voir résultats                     | E  | <input checked="" type="checkbox"/> | 9. Comparaison de méthodes               |
|                                    | B  | <input type="checkbox"/>            | 10. Interférences                        |
| Test unitaire                      | NA | <input type="checkbox"/>            | 11. Contamination                        |
| Voir résultats                     | E  | <input checked="" type="checkbox"/> | 12. Robustesse et fiabilité des réactifs |
| Technique qualitative              | NA | <input type="checkbox"/>            | 13. Intervalle de référence              |

NA : Non Applicable  
B : Bibliographie  
E : Evaluation sur site

## MAITRISE DES RISQUES

| 5M   | Points critiques   | Echelle de criticité <sup>1</sup> | Eléments à maîtriser             | Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...)             |                          |
|--|--|-----------------------------------|----------------------------------|--|--------------------------|
| <b>Eléments identiques quelque – soit la méthode</b> |  |                                   |                                  |  |                          |
| Matière (échantillons)                               | Identito vigilance   | 4                                 | Formation du personnel préleveur | Procédure d'identito-vigilance du laboratoire<br><a href="http://srv-kalilab/IT-PERI-PREA-002-01">http://srv-kalilab/IT-PERI-PREA-002-01</a>                     |                          |
|  | Type de contenants<br>Tube EDTA  | 4                                 | Information des préleveurs       | Catalogue des Analyses du Pôle de Biologie du CHU de TOULOUSE<br><a href="http://chu-toulouse.manuelprelevement.fr">http://chu-toulouse.manuelprelevement.fr</a> |                          |
|  | Nature et volume de l'échantillon :<br>Prélèvement veineux<br>Minimum 1 tube de 5ml pour adulte, de 2ml pour enfant                                  | 3                                 |                                  |  |                          |
|  | Renseignements épidémiologiques :<br>Zone de séjour<br>Durée du séjour<br>Prophylaxie.....<br>Renseignements cliniques :<br>Hyperthermie, anémie.... | 3                                 |                                  |  | Formation des préleveurs |
|  | Délai de réception :<br>Urgence <1h  | 4                                 | Contrôle à la réception          | Critères d'acceptation/de refus  |                          |
|  | <b>Eléments fonctions de la méthode</b>  |                                   |                                  |  |                          |
|  | Méthodes Frottis + Goutte épaisse + Recherche immuno chromatographique : RAS   |                                   |                                  |  |                          |
|  | Méthode QBC Malaria  |                                   |                                  |  |                          |
|  | Centrifugation   | 4                                 | Centrifugeuse spécifique QBC     | Maintenance + mode opératoire <a href="http://srv-kalilab/MT-PTI-MYPA-050-01">http://srv-kalilab/MT-PTI-MYPA-050-01</a>  |                          |

<sup>1</sup> A préciser par le laboratoire, par exemple 1 non critique – 5 très critique ;

## MAITRISE DES RISQUES

| 5M                     | Points critiques   | Echelle de criticité <sup>1</sup>  | Éléments à maîtriser   | Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...)  |
|------------------------|--|------------------------------------|--|---|
| Milieu                 | <b>Eléments identiques quelque – soit la méthode</b>         |                                    |  |   |
|                        | Exigences environnementales pour le matériel                 | 0                                  | Aucune incidence   |   |
|                        | Conditions de conservation et d'utilisation des échantillons | 2                                  | Conservation des tubes EDTA à 5°C± 3°C   | Présents dans chaque mode opératoire<br><a href="http://srv-kalilab/MT-MYPA-049/050/051-01">http://srv-kalilab/MT-MYPA-049/050/051-01</a>             |
|                        | Conditions de conservation et d'utilisation des Réactifs     | 3                                  | Conservation des réactifs en fonction de la méthode                                  | Présents dans chaque mode opératoire<br><a href="http://srv-kalilab/MT-MYPA-049/050/051-01">http://srv-kalilab/MT-MYPA-049/050/051-01</a>             |
| Matériel (équipements) | <b>Techniques de coloration</b>                              |                                    |  |   |
|                        | Qualité de l'eau   | 3                                  | Mesure du pH (neutralité)  | Mode opératoire <a href="http://srv-kalilab/MT-BIO-MS-METR-015-01">http://srv-kalilab/MT-BIO-MS-METR-015-01</a><br>Traçabilité des vérifications (DE) |
|                        | Microscope à lumière blanche                                 | 3                                  | Nettoyage quotidien des objectifs<br>Maintenance                                     | Consignes de nettoyage des objectifs<br>Enregistrements des maintenances (Kalilab)  |
|                        | pH mètre   | 3                                  | Étalonnage   | Enregistrements de l'étalonnage (DE)  |
|                        | Colorateur si automatisé                                     | 3                                  | Maintenance  | Enregistrements des maintenances (Kalilab)  |
|                        | Lames dégraissées  | 2                                  | Absence de rupture   | Gestion des stocks de consommables (Kalistock)  |
|                        | Surveillance des dérives                                     | 3                                  | ANSM 1 fois/an<br>EEQ CTCB + UKNEQAS<br><br>CIQ                                      | Exploitation des résultats tableau excel des EEQ DE-PTI-QUAL-040 (dans sharepoint)<br>Enregistrement sur tableau excel                                |
| Informatique           | 3  | Vérification de la saisie manuelle | Signature du biologiste sur la feuille de paillasse lors de la validation biologique |   |

## MAITRISE DES RISQUES

| 5M                     | Points critiques                      | Echelle de criticité <sup>1</sup>               | Eléments à maîtriser   | Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) |
|------------------------|---------------------------------------|---|--|--|
| Matériel (équipements) | <b>Technique QBC Malaria</b>          |   |  |  |
|                        | Microscope à Fluorescence             | 3   | Nettoyage quotidien des objectifs<br>Maintenance   | Consignes de nettoyage des objectifs<br>Enregistrements des maintenances   |
|                        | Centrifugeuse spécifique              |   | Vérification annuelle  | Enregistrement   |
|                        | Parawiever                            | 3   | Support non cassé  | Mode opératoire<br><a href="http://srv-kalilab/MT-MYPA-050-01">http://srv-kalilab/MT-MYPA-050-01</a>   |
|                        | Tubes capillaires spécifiques         | 2   | Absence de rupture   | Gestion des stocks de consommables (Kalistock)   |
|                        | Informatique                          | 3   | Vérification de la saisie manuelle   | Signature du biologiste sur la feuille de paillasse lors de la validation biologique   |
|                        | <b>Technique Détection d'antigène</b> |   |  |  |
| Chronomètre            | 2                                     | Vérification du temps annuel (Horloge parlante) | Enregistrement annuel du contrôle<br><a href="http://srv-kalilab/MT-BIO-MS-METR-003-01">http://srv-kalilab/MT-BIO-MS-METR-003-01</a> |  |
| Informatique           | 3                                     | Vérification de la saisie manuelle              | Signature du biologiste sur la feuille de paillasse lors de la validation biologique   |  |

**MAITRISE DES RISQUES**

| 5M   | Points critiques   | Echelle de criticité <sup>1</sup> | Éléments à maîtriser  | Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...)  |
|--|--|-----------------------------------|---|---|
| <b>Eléments identiques quelque – soit la méthode</b> |  |                                   |   |   |
| <b>Matériel (réactifs)</b>                           | Conservation et conditions d'utilisation                 | 3                                 | Respect des consignes fournisseurs<br><br>Métrologie des enceintes<br>Surveillance par sondes (Système VIGITEMP)<br>Contrôle des sondes tous les ans<br><br>Cartographie tous les 5 ans | Fiches techniques fournisseur avec vérification de la dernière version+ fiches de donnée de sécurité (pour colorants)<br><br>Logiciel VIGITEMP<br><a href="http://srv-kalilab/IT-BIO-MS-METR-001-01">http://srv-kalilab/IT-BIO-MS-METR-001-01</a><br><br>Etalonnage des sondes annuel<br><a href="http://srv-kalilab/MT-BIO-MS-METR-010-01">http://srv-kalilab/MT-BIO-MS-METR-010-01</a><br><br>Cartographie avec enregistrement<br><a href="http://srv-kalilab/MT-BIO-MS-METR-013-01">http://srv-kalilab/MT-BIO-MS-METR-013-01</a> |
|  | Acceptation à réception des réactifs, gestion des stocks | 3                                 | Gestion des stocks<br>Avec traçabilité des lots   | Procédure de gestion des stocks (y compris acceptation)<br><a href="http://srv-kalilab/IT-PTI-APPRO-001/003-01">http://srv-kalilab/IT-PTI-APPRO-001/003-01</a><br>Enregistrement dans kalistock   |
| <b>Techniques de coloration</b>                      |  |                                   |   |   |
| <b>Méthode</b>                                       | Limites de la méthode                                    | 2                                 | Faible Parasitémie surtout si traitement avant le diagnostic<br><br>Comptage de la Parasitémie  | Renseignements cliniques (Feuille de marque de Parasitologie) N° 036245 (v MARS 2014) et renseignements cliniques insérés dans SIL<br><br>Enregistrement des EEQ et des CIQ par opérateur   |
|  | Causes d'incertitude de mesure                           | 2                                 | Mauvais étalement ou mauvaise coloration  | Formation du personnel et respect du mode opératoire<br><a href="http://srv-kalilab/MT-PTI-MYPA-049">http://srv-kalilab/MT-PTI-MYPA-049</a>   |

## MAITRISE DES RISQUES

| 5M                       | Points critiques                                  | Echelle de criticité <sup>1</sup> | Éléments à maîtriser  | Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...)  |
|--------------------------|---|-----------------------------------|---|---|
| Main d'œuvre (Personnel) | Compétence et maintien de compétence du personnel | 4                                 | Formation et Habilitation initiale + vérification des compétences | Procédure d'habilitation<br><a href="http://srv-kalilab/PG-BIO-MS-QUAL-010-01">http://srv-kalilab/PG-BIO-MS-QUAL-010-01</a><br>Enregistrements d'habilitation du personnel <a href="http://srv-kalilab/DE-PTI-QUAL-004-02">http://srv-kalilab/DE-PTI-QUAL-004-02</a><br>Inscription et participation à Parasitimage (e-learning)<br>Enregistrement des EEQ (DE) |

## EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

**Echantillon biologique sang total : Tube EDTA**

La Répétabilité et Fidélité intermédiaire ne sont pas applicables :

**Répétabilité :**

Techniques de coloration :

L'étalement sur lame d'un frottis ne peut pas être strictement répétable.

Technique QBC : Chaque capillaire est unique

Détection d'antigène : test unitaire

**Fidélité intermédiaire**

Impossible pour les techniques de coloration et QBC

Pour la technique PALUTOP + 4® il existe un CIQ (Tube EDTA positif aliquoté) qui permet seulement d'évaluer la conformité du KIT et pas de CV calculable

## REPETABILITE

Applicable  ; non applicable (à justifier)

## FIDELITE INTERMEDIAIRE

Applicable  ; non applicable (à justifier)



|                                    |               |
|------------------------------------|---------------|
| Document<br>d'enregistrement<br>DE | Page : 9 / 17 |
|------------------------------------|---------------|

| <b>VARIABILITE INTER-OPERATEURS</b><br>Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/> |  |
|---|--|
| <b>Frottis coloré par M.G.G</b>   |  |
| <b>Opérateur évalué 1</b>   | <p>Existence de lames de CIQ anonymisées :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Reconnaissance du type d'hématozoaire sur plusieurs lames (si possible minimum 5) :</b><br/>Le CV de variabilité doit être Nul pour la reconnaissance de <b><i>Plasmodium falciparum</i></b><br/>Le CV de variabilité doit être &lt; 2% pour les autres types de Plasmodium</li> <li>- <b>Calcul de la Parasitémie :</b><br/>Lecture de 10 champs par lames (Nbre d'hématies parasitées/nbre total d'hématies) et calcul de la moyenne<br/>Faire plusieurs lames par opérateur (si possible minimum 5)<br/>Le CV de variabilité doit être &lt; 30% pour une parasitémie faible (&lt; 3%)<br/>Le CV de variabilité doit être &lt; 20% pour une parasitémie &gt; 10%</li> <li>- <b>Pour chaque opérateur</b> il existe des critères d'habilitation pour la reconnaissance du type de plasmodium (lecture minimum de 5 lames) :<br/>100% de reconnaissance de <b><i>Plasmodium falciparum</i></b><br/>80% de reconnaissance pour les autres espèces de Plasmodium</li> </ul> |
| <b>Opérateur évalué 2</b>   |  |
| ...   |  |
| <b>Technique QBC</b>  |  |
|   | <p>NA en inter -opérateur<br/>Pour chaque opérateur : savoir lire dans la bonne zone et lire en fluorescence + lumière blanche</p>   |
| <b>PALUTOP +4@</b>  |  |
| Le CV de variabilité doit être Nul car il consiste à l'interprétation de la présence des bandes                                 |  |

|   |
|---|
| <b>JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)</b><br>Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/> |
|---|

**Pas de CIQ Externalisés existants**

| <b>EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ)</b><br>Contrôles quantitatifs <input type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input checked="" type="checkbox"/> |             |                         |                           |  |                             |                               |                         |
|--|-------------|-------------------------|---------------------------|--|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Echantillons   | Valeur Labo | Cible (groupe de pairs) | Cible (toutes techniques) | Biais (%) / groupe de pairs                  | Biais (%) / toute technique | Biais (%) limite <sup>2</sup> | Conclusion <sup>3</sup> |
|  |             |                         |                           | A renseigner pour les contrôles quantitatifs |                             |                               |                         |

**Frottis coloré au M.G.G :**

1 contrôle ANSM / an

1 contrôle CTCB /an

8 contrôles UKNEQAS/an

Les EEQ sont réalisés par les technicien(ne)s et Biologistes du secteur

Les résultats sont OK (voir tableau de gestion des EEQ)

<sup>2</sup> Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

<sup>3</sup> Conforme/non conforme, argumentaire de la conclusion

|                                    |                |
|------------------------------------|----------------|
| Document<br>d'enregistrement<br>DE | Page : 10 / 17 |
|------------------------------------|----------------|

**PALUTOP+4®: 1° contrôle en 2014 CTGB**

**QBC** : contrôle inter-laboratoires à réaliser en 2014-2015

| SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE<br>(étude expérimentale indispensable en portée B)<br>(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)<br>Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/> |                                     |
|--|-------------------------------------|
| <b>Spécificité Bibliographie</b>   | 90-95% pour PALUTOP4®, 97% pour QBC |
| <b>Sensibilité Bibliographie</b>   | 85-92% Pour PALUTOP4®, 97% pour QBC |

Utilisation des fiches fournisseur et de la bibliographie scientifique

| INCERTITUDES (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation)<br>Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input checked="" type="checkbox"/> ; calcul <input type="checkbox"/> |   |
|---|---|
| Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :  | <input type="checkbox"/> CIQ + EEQ<br><input type="checkbox"/> CIQ externalisés<br><input type="checkbox"/><br><input type="checkbox"/><br><input type="checkbox"/> autre formule : |

Méthode qualitative où le calcul est impossible

| ETENDUE DE MESURE<br>Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/> |  |
|---|--|
| <b>Frottis coloré au M.G.G</b>  |  |
| Limite de détection :   | <u>Bibliographie</u><br>Parasitémie faible et patient traité avant la demande de diagnostic  |
| <b>PALUTOP 4+ ®</b>   |  |
| Limite de détection :   | <u>Bibliographie</u><br><p>Chez <i>P. falciparum</i> l'antigène HRP-2 n'est pas sécrété au stade gamétoocyte.<br/>Par conséquent, la bande HRP-2 peut être absente chez les porteurs</p> <p>En cas d'infection à <i>P. vivax</i> ou <i>P. falciparum</i>, ou d'infection mixte à <i>P. vivax</i> et <i>P. falciparum</i> la bande pan est également positive empêchant ainsi la différenciation avec <i>P. ovale</i> ou <i>P. malariae</i></p> <p>Des absences de bandes pan ont été notées dans certaines infections à Plasmodium ovale.</p> <p>Des résultats négatifs peuvent être observés en cas de parasitémies inférieures au seuil de détection du test</p> |
| <b>Technique QBC</b>  |  |
| Limite de détection :   | une concentration très faible en parasites peut entraîner un test faussement négatif.  |

| <b>COMPARAISON DE METHODES :</b><br>Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/> |  |
|--|--|
| <b>Méthodes comparées : méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareils en miroir ou back-up, EBMD, ...</b>      | Comparaisons des méthodes<br>Frottis coloré au M.G.G/QBC/ PALUTOP+4® / PCR   |
| <b>Nombre de mesures :</b>   | 38   |
| <b>Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :</b>  | Présence ou absence du Plasmodium et espèce plasmodiale  |
| <b>Méthode d'exploitation des résultats :</b>  | Analyse des discordances   |
| <b>Equation de la droite de régression :</b>   | NA   |
| <b>Exploitation des résultats de comparaison (diagramme de différences, concordance catégorielle) :</b>                                    | <p><u>ANNEXE 2 : Présence ou absence de Plasmodium</u><br/>il y a 3 discordances entre le PALUTOP4® et la PCR dont :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 dossier positif uniquement en PCR due à une charge parasitaire trop faible. Soit au total 7.9 % de discordance entre le PALUTOP4® et la PCR</li> </ul> <p>On note également :<br/>2 discordances du PALUTOP4® avec la coloration au MGG (présence de plasmodium avec toutes les techniques sauf la coloration au MGG)<br/>1 dossier positif en PCR et en PALUTOP4® et PCR négatif en QBC et sur le frottis au MGG mais il s'agissait d'un patient en traité.<br/>Discordance de 3% du QBC vis-à-vis de la PCR s'expliquant par le traitement du patient avant le test<br/>Discordance de 3% du QBC vis-à-vis du PALUTOP4® car <i>Plasmodium vivax</i><br/>Pas de discordance entre M.G.G et QBC</p> <p><u>ANNEXE 3 : Détermination de l'espèce plasmodiale</u><br/>Au total on obtient 7.5% de discordance de la détermination de l'espèce plasmodiale entre le PALUTOP4® et la PCR :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 dossier positif pour <i>P.vivax</i> en MGG et PCR et négatif avec le PALUTOP4®</li> <li>- 1 dossier positif uniquement en PCR due à une trop faible parasitémie.</li> <li>- 1 dossier négatif en PCR et MGG, avec un PALUTOP4® positif à <i>P.falciparum</i> et <i>P.vivax</i>.</li> </ul> <p>Les 4 autres discordances ne concernent que des MGG négatifs rendus positif à <i>P.falciparum</i> en PCR et PALUTOP4®</p> |

**INTERFERENCES**

Applicable  ; non applicable (à justifier)

Tube EDTA

Applicable  ; non applicable (à justifier)

**Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, HCG, ...)** :

Etude bibliographique  
(sources et valeurs)

Etude expérimentale  
(valeurs)

**Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...)** :

Etude bibliographique  
(sources et valeurs)

Etude expérimentale  
(valeurs)

Tests unitaires

**ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS**

Applicable  ; non applicable (à justifier)

**Frottis colorés au M.G.G**

**Paramètres sensibles testés pH**

Vérification de la qualité de la coloration en fonction de la neutralité du pH

**Stabilité des échantillons**

**Tube EDTA conservé plusieurs jours**

Réalisation d'un frottis tous les jours pour vérifier : la présence ou absence de l'hématozoaire et sa facilité d'identification  
Détection des hématozoaires pendant 5 jours et identification de l'espèce facile pendant 48h

**PALUTOP +4®**

**Stabilité des échantillons**

**Tube EDTA conservé plusieurs jours**

Réalisation d'un test tous les jours pendant 96 h puis après congélation  
Pas de modification (cf ANNEXE 4)

**INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils**

(étude expérimentale indispensable en portée B en fonction des données démographiques)

Applicable  ; non applicable (à justifier)

Préciser les sources et les valeurs retenues

Technique qualitative

**DECLARATION d'APTITUDE**

Il est nécessaire en routine de valider une technique d'enrichissement et la technique de frottis mince pour détecter la présence de plasmodium même en cas de faible parasitémie. La parasitémie n'est réalisable que par le frottis colorée et sert à l'évaluation de l'efficacité thérapeutique.

La détection d'Antigènes par le PALUTOP+ 4® est une technique simple et de bonne spécificité qui peut être utilisée en dépistage rapide.

Signature biologiste

**Annexe 1 : Tableau des réactifs**

| Nom                 | Fournisseur     | Référence    |
|---------------------|-----------------|--------------|
| MAY-GRUNWALD        | MERCK (CE)      | 1.01424.2500 |
| GIEMSA              | MERCK (CE)      | 1.09204.0500 |
| Eau                 | EVIAN           |              |
| PALUTOP+4®          | ALL DIAG (CE)   | 5481         |
| QBC Acridine orange | QBC EUROPE (CE) | 253037       |

Annexe 2 : Détection du *Plasmodium*

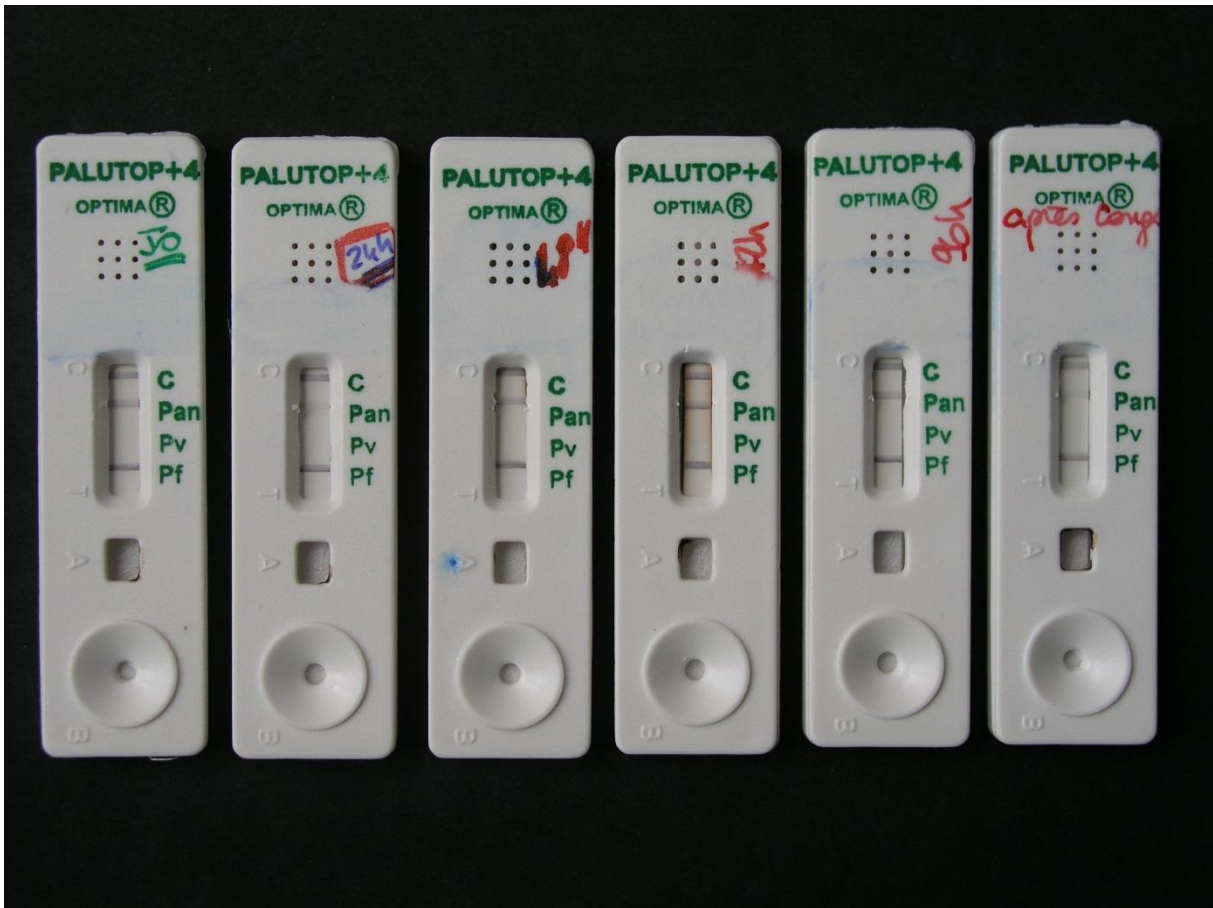
| N° Dossier | Coloration MGG |         | PALUTOP4® |         | QBC     |         | PCR     |         |
|------------|----------------|---------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|
|            | Positif        | Négatif | Positif   | Négatif | Positif | Négatif | Positif | Négatif |
| 7302-185   |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |
| 7302-153   | *              |         | *         |         | *       |         | *       |         |
| 7300-24    |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |
| 7298-89    |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |
| 7298-50    |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |
| 7297-10    |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |
| 7296-71    |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |
| 7296-33    |                | *       |           |         |         | *       | *       | *       |
| 7296-12    |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |
| 7295-28    | *              |         |           | *       | *       |         | *       | *       |
| 7295-27    |                | *       |           | *       |         | *       |         | *       |
| 7292-106   | *              |         | *         |         | *       |         | *       |         |
| 7292-89    | *              |         |           |         | *       |         | *       |         |
| 7292-75    | *              |         |           |         | *       |         | *       |         |
| 7292-74    |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |
| 7292-69    |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |
| 7292-68    |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |
| 7290-72    |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |
| 7289-52    |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |
| 7285-103   | *              |         |           |         | *       |         | *       |         |
| 7285-99    |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |
| 7285-1     |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |
| 7284-5     | *              |         | *         |         | *       |         | *       |         |
| 7283-41    |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |
| 7282-105   | *              |         | *         |         | *       |         | *       |         |
| 7282-87    |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |
| 7282-7     | *              |         |           |         | *       |         |         | *       |
| 7281-20    |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |
| 7281-21    |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |
| 7279-11    | *              |         | *         |         | *       |         | *       |         |
| 7278-8     |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |
| 7277-61    |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |
| 7277-5     |                | *       |           |         |         | *       |         | *       |

Annexe 3 : Espèce Plasmodiale

| N°Dossier | Coloration MGG      |                |                |                   |     | PALUTOP4®           |                |                 |     | PCR                 |                |                |                   |          |     |
|-----------|---------------------|----------------|----------------|-------------------|-----|---------------------|----------------|-----------------|-----|---------------------|----------------|----------------|-------------------|----------|-----|
|           | <i>P.falciparum</i> | <i>P.vivax</i> | <i>P.ovale</i> | <i>P.malariae</i> | Neg | <i>P.falciparum</i> | <i>P.vivax</i> | <i>P.autres</i> | Neg | <i>P.falciparum</i> | <i>P.vivax</i> | <i>P.ovale</i> | <i>P.malariae</i> | Psce ADN | Neg |
| 1258-1416 | P                   |                |                |                   |     | P                   |                |                 |     | NF                  | N              | N              | N                 | P        |     |
| 1276-2003 | P                   |                |                |                   |     | P                   |                |                 |     | NF                  | N              | N              | N                 | P        |     |
| 1283-1806 | P                   |                |                |                   |     | P                   |                |                 |     | NF                  | N              | N              | N                 | P        |     |
| 1290-1738 | P                   |                |                |                   |     | P                   |                |                 |     | NF                  | N              | N              | N                 | P        |     |
| 1316-1212 | P                   |                |                |                   |     | P                   |                |                 |     | NF                  | N              | N              | N                 | P        |     |
| 1320-1638 | P                   |                |                |                   |     | P                   |                |                 |     | NF                  | N              | N              | N                 | P        |     |
| 1351-1203 | P                   |                |                |                   |     | P                   |                |                 |     | NF                  | N              | N              | N                 | P        |     |
| 2009-1871 | P                   |                |                |                   |     | P                   |                |                 |     | NF                  | N              | N              | N                 | P        |     |
| 2016-1962 | P                   |                |                |                   |     | P                   |                |                 |     | NF                  | N              | N              | N                 | P        |     |
| 2061-1901 | P                   |                |                |                   |     | P                   |                |                 |     | NF                  | N              | N              | N                 | P        |     |
| 2073-1331 | P                   |                |                |                   |     | P                   |                |                 |     | NF                  | N              | N              | N                 | P        |     |
| 2075-1778 | P                   |                |                |                   |     | P                   |                |                 |     | NF                  | N              | N              | N                 | P        |     |
| 2086-1669 | P                   |                |                |                   |     | P                   |                |                 |     | NF                  | N              | N              | N                 | P        |     |
| 2090-1755 | P                   |                |                |                   |     | P                   |                |                 |     | NF                  | N              | N              | N                 | P        |     |
| 2121-1948 | P                   |                |                |                   |     | P                   |                |                 |     | NF                  | N              | N              | N                 | P        |     |
| 2139-1472 | P                   |                |                |                   |     | P                   |                |                 |     | NF                  | N              | N              | N                 | P        |     |
| 1290-1740 |                     |                |                |                   | Neg |                     |                |                 | Neg |                     |                |                |                   |          | Neg |
| 1297-1810 |                     |                |                |                   | Neg |                     |                |                 | Neg |                     |                |                |                   |          | Neg |
| 1303-1322 |                     |                |                |                   | Neg |                     |                |                 | Neg |                     |                |                |                   |          | Neg |
| 1318-1922 |                     |                |                |                   | Neg |                     |                |                 | Neg |                     |                |                |                   |          | Neg |
| 1335-1602 |                     |                |                |                   | Neg |                     |                |                 | Neg |                     |                |                |                   |          | Neg |
| 1337-1273 |                     |                |                |                   | Neg |                     |                |                 | Neg |                     |                |                |                   |          | Neg |
| 1350-1687 |                     |                |                |                   | Neg |                     |                |                 | Neg |                     |                |                |                   |          | Neg |
| 1358-1008 |                     |                |                |                   | Neg |                     |                |                 | Neg |                     |                |                |                   |          | Neg |
| 1364-1744 |                     |                |                |                   | Neg |                     |                |                 | Neg |                     |                |                |                   |          | Neg |
| 2009-1872 |                     |                |                |                   | Neg |                     |                |                 | Neg |                     |                |                |                   |          | Neg |
| 2009-1973 |                     |                |                |                   | Neg |                     |                |                 | Neg |                     |                |                |                   |          | Neg |
| 2010-1875 |                     |                |                |                   | Neg |                     |                |                 | Neg |                     |                |                |                   |          | Neg |
| 2118-1611 |                     |                |                |                   | Neg |                     |                |                 | Neg |                     |                |                |                   |          | Neg |
| 2154-1291 |                     |                |                |                   | Neg |                     |                |                 | Neg |                     |                |                |                   |          | Neg |
| 2121-2048 |                     |                |                |                   | Neg |                     |                |                 | Neg |                     |                |                |                   |          | Neg |
| 2136-1699 |                     |                |                |                   | Neg |                     |                |                 | Neg |                     |                |                |                   |          | Neg |
| 2130-1345 |                     |                | P              |                   |     |                     |                | P               |     |                     | N              | P              | N                 |          |     |
| 2143-1945 |                     | P              |                |                   |     |                     |                |                 | Neg |                     | P              |                |                   |          |     |
| 2052-3548 |                     |                |                |                   | Neg |                     |                |                 | Neg | N                   | N              | N              | N                 | P        |     |
| 2093-1824 |                     |                |                |                   | Neg | P                   |                | P               |     |                     |                |                |                   |          | Neg |
| 1273-1550 |                     |                |                |                   | Neg | P                   |                |                 |     | P                   | N              | N              | N                 | P        |     |
| 2135-1700 |                     |                |                |                   | Neg | P                   |                |                 |     | NF                  | N              | N              | N                 | P        |     |
| 1259-1739 |                     |                |                |                   | Neg | P                   |                |                 |     | NF                  | N              | N              | N                 | P        |     |

La PCR étant la technique de référence, il y a 2 Faux négatifs avec PALUTOP4® 1 pour l'identification de *P.vivax* et 1 due à une trop faible charge parasitaire. On note aussi 1 faux positif par rapport à la PCR et au MGG. Au total on obtient un taux de discordance de 7,5 %  
On retrouve 3 discordances avec la technique de coloration au MGG et les deux autres techniques.

**Annexe 4 :** Robustesse PALUTOP





## **BIBLIOGRAPHIE**

**Conférence de consensus 2007** : Prise en charge et prévention du paludisme d'importation à *Plasmodium falciparum* Société de Pathologie Infectieuse

### **M.G.G**

**1- F. Talarmin, J.M. Sicard, M. Mounem, D. Verrot, J.A. Husser..** Paludisme d'importation en Moselle: à propos de 75 cas en trois ans. Rev. Med. Int. 21:242-246.

### **QBC**

**1 Secardin Y, Le Bras:** Diagnostic test to identify human Plasmodium species by the quantitative buffy coat test **Med Trop (Mars. 1999; 59(3):276-8**

### **Palutop 4 +®**

1. **Michael L. Wilson:** Malaria Rapid Diagnostic Tests, MEDICAL MICROBIOLOGY d CID 2012:54 (1 June) d 1637
2. **Ousmane A. Koita:** False-Negative Rapid Diagnostic Tests for Malaria and Deletion of the Histidine-Rich Repeat Region of the hrp2 Gene, Am. J. Trop. Med. Hyg., 86(2), 2012, pp. 194–198
3. **Albertini :** Preliminary enquiry into the availability, price and quality of malaria rapid diagnostic tests in the private health sector of six malaria-endemic countries, Tropical Medicine and International Health doi:10.1111/j.1365-3156.2011.02904.x
4. **Eyal Leshem:** False-Positive Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein 2Immunocapture Assay Results for Acute Schistosomiasis Caused by Schistosoma mekongi, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, June 2011, p. 2331–2332 Vol. 49, No. 6