WHO/CDS/EPR/LYO/2007.3

Principes et procédures du

Programme OMS/NICD d'Evaluation Externe de la Qualité en microbiologie en Afrique

Années 1 à 4
2002-2006

ALERTE ET ACTION EN CAS
D'EPIDEMIE ET DE PANDEMIE

Organisation mondiale de la Santé

WHO/CDS/EPR/LYO/2007.3

Principes et procédures du

Programme OMS/NICD d'Evaluation Externe de la Qualité en microbiologie en Afrique

Années 1 à 4
2002-2006

Organisation mondiale de la Santé

© Organisation mondiale de la Santé 2007

Tous droits réservés.

Les appellations employées dans la présente publication et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part de l'Organisation mondiale de la Santé aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites. Les lignes en pointillé sur les cartes représentent des frontières approximatives dont le tracé peut ne pas avoir fait l'objet d'un accord définitif.

La mention de firmes et de produits commerciaux ne signifie pas que ces firmes et ces produits commerciaux sont agréés ou recommandés par l'Organisation mondiale de la Santé, de préférence à d'autres de nature analogue. Sauf erreur ou omission, une majuscule initiale indique qu'il s'agit d'un nom déposé.

L'Organisation mondiale de la Santé a pris toutes les dispositions voulues pour vérifier les informations contenues dans la présente publication. Toutefois, le matériel publié est diffusé sans aucune garantie, expresse ou implicite. La responsabilité de l'interprétation et de l'utilisation dudit matériel incombe au lecteur. En aucun cas, l'Organisation mondiale de la Santé ne saurait être tenue responsable des préjudices subis du fait de son utilisation.

Sommaire

Remerciements 6

Abréviations 8

Glossaire 10

Introduction 13

- **Contexte** 13
- **Historique du programme d'EEQ en microbiologie OMS/NICD** 13
- **Objectif de ce document** 14
- **Public ciblé** 15
- **Diffusion et utilisation du document** 15

Assurance qualité et programme d'EEQ en microbiologie OMS/NICD 17

- **Assurance qualité** 17
- **Evaluation externe de la qualité** 17
- **Objectifs du programme d'EEQ en microbiologie OMS/NICD** 18

Pathologies et tests diagnostiques 21

- **Pathologies** 21
- **Tests diagnostiques** 21

Organisation du programme d'EEQ en microbiologie OMS/NICD ... 23

- **Comité Technique de Mise en Oeuvre** 23
- **Laboratoires participants** 24
- **Laboratoires de référence** 25
- **Comité Technique Consultatif** 25
- **Comité Consultatif Régional** 25
- **Interactions** 27

Analyse de la situation 29

- **Evaluations OMS** 29
- **Questionnaires NICD** 29

Processus du programme d'EEQ 31

Choix des laboratoires participants 31

Contenu des enquêtes 31

Préparation et distribution des enquêtes 32

Calendrier 33

Evaluation des résultats de l'enquête 34

Documentation des résultats et retour d'information aux laboratoires participants 36

Gestion des données 38

Documents 39

Documents techniques 39

Documents de communication 40

Contrôle et évaluation du programme d'EEQ en microbiologie OMS/NICD 41

Surveillance des indicateurs de processus 41

Evaluation externe 41

Suivi 43

Suivi informel 43

Suivi officiel 43

Suivi sur le Web 43

Perspectives et défis 45

Perspectives 45

Défis 45

Bibliographie 47

ANNEXE 1 Comités d'organisation et laboratoires participants du programme OMS/NICD d'EEQ en microbiologie 48

Comité technique de mise en oeuvre (CTMO) 48

Laboratoires participants (4ème année, 2005-2006) 49

Laboratoires de référence 54

Comité technique consultatif (CTC) 56

ANNEXE 2 Questionnaires envoyés aux laboratoires participants 57

ANNEXE 3 Résumé des enquêtes d'évaluation et des réponses attendues pour l'EEQ de microbiologie OMS/NICD 69

ANNEXE 4 Procédures opératoires standardisées 85

Annexe 4A Procédures opératoires standardisées pour l'EEQ de la bactériologie 86

Annexe 4B Procédures opératoires standardisées pour l'EEQ de la bacilloscopie 124

Annexe 4C Procédures opératoires standardisées pour l'EEQ de la microscopie du paludisme 136

ANNEXE 5 Exemples de notice d'instructions et de formulaire de réponse envoyés aux laboratoires participants 157

ANNEXE 6 Etat financier du programme d'EEQ OMS/NICD 190

Remerciements

Outre le rôle inestimable joué par les laboratoires participants et les laboratoires de référence, l'OMS souhaite exprimer toute sa gratitude envers les personnes suivantes pour leur contribution au développement et à la mise en oeuvre du Programme d'Evaluation Externe de la Qualité en microbiologie en Afrique :

Madame Vivian Fensham,
Technicienne de laboratoire, Unité d'Evaluation Externe de la Qualité, NICD, Johannesburg, Afrique du Sud

Madame Mary Harvey
Agence des Etats-Unis pour le Développement International (USAID) Bureau Afrique

Dr Kerrigan McCarthy
Microbiologiste médical, Unité d'Evaluation Externe de la Qualité, NICD, Johannesburg, Afrique du Sud

Dr Jean-Bosco Ndihokubwayo
Conseiller Régional pour les laboratoires, Bureau regional OMS de l'Afrique

Dr Murray Trostle
Agence des Etats-Unis pour le Développement International (USAID)

Dr. Michael Noble
Managing director, Clinical Microbiology Proficiency Testing
Department of Pathology and Laboratory Medicine, The University of British Columbia, Vancouver, BC Canada

La mise en œuvre de ce programme a été réalisée grâce au soutien financier de :

L'Alliance Mondiale pour les vaccins et la vaccination, à travers le Programme de surveillance des méningites bactériennes pédiatriques de l'OMS

Le Gouvernement du Royaume des Pays-Bas

L'Agence des Etats-Unis pour le Développement International (USAID)

Ce document a été préparé par le Dr Antoine Pierson et le Dr Sébastien Cognat, responsables des programmes d'assurance qualité, Bureau OMS de Lyon pour la Préparation et la Réponse des pays aux Epidémies, en collaboration avec Madame Kathleen Cavallaro, Point focal pour le renforcement des laboratoires, Surveillance Intégrée de la Maladie et Réponse, division Méningite et Pathogènes spéciaux, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Etats-Unis d'Amérique.

Les rédacteurs remercient les personnes suivantes pour leur contribution à la révision de ce document :

Centers for Disease Control and Prevention, Etats-Unis d'Amérique :

Madame Cheryl Bopp
Dr Leonard Mayer
Madame Helen Perry
Dr Martin Schriefer
Madame Jeanette St. Pierre

National Institute for Communicable Diseases, National Health Laboratory Service, Afrique du Sud :

Madame Lorraine Arntzen
Madame Rita van Deventer
Madame Leigh Dini
Professeur John Frean
Docteur Anne von Gottberg
Docteur Karen Keddy
Madame Rebecca Landsberg
Madame Helen Haritos

Les rédacteurs tiennent à remercier tout particulièrement le National Institute for Communicable Diseases, National Health Laboratory Service et Centers for Disease Control and Prevention pour avoir autorisé la reproduction des annexes 2-6.

Abréviations

AFRO	Bureau OMS pour la région Afrique
CDC	Centers for Disease Control and Prevention, Etats Unis d'Amérique
CSR	Department of Communicable Disease Surveillance and Response (département Maladies Transmissibles : Surveillance et Action)
EMR	Région OMS de la Méditerranée Orientale
EMRO	Bureau OMS pour la région de la Méditerranée orientale
EPR	Department of Epidemic and Pandemic Alert and Response (Département Alerte et Action en cas d'Epidémie et de Pandémie)
EEQ	Evaluation Externe de la Qualité
GAVI	Global Alliance for Vaccine Initiative (Alliance mondiale pour les Vaccins et la Vaccination)
SIMR	Surveillance Intégrée de la Maladie et Réponse
RSI	Règlement Sanitaire International
IEC	Commission Electrotechnique Internationale (International Electrotechnical Commission)
ISO	International Organization for Standardization (Organisation Internationale de Normalisation)
LYO	Bureau OMS de Lyon pour la Préparation et la Réponse des pays aux Epidémies
MdS	Ministère de la Santé
NHLS	National Health Laboratory Service, Afrique du Sud
NICD	National Institute for Communicable Diseases (Institut National des Maladies Transmissibles), division du National Health Laboratory Service, South Africa
PBM	Regional Pediatric Bacterial Meningitis Surveillance (Surveillance régionale des méningites bactériennes de l'enfant)

PT	Proficiency Testing (essai d'aptitude)
GMP	Global Malaria Programme (Programme mondial de lutte contre le paludisme)
STB	Stop Tuberculosis Partnership (Partenariat mondial Halte à la Tuberculose)
TB	Tuberculose
USAID	United States Agency for International Development (L'Agence des Etats-Unis pour le Développement International)
OMS	Organisation mondiale de la Santé
CC OMS	Centre collaborateur OMS

Glossaire

Analyte — substance analysée.
Action corrective — action visant à une amélioration technique.
Evaluation Externe de la Qualité (EEQ) — dans ce document, détermination de la performance d'un laboratoire participant au moyen de comparaisons inter-laboratoires[1]. Parfois appelé "essais d'aptitude".
Score — note donnée par l'organisateur en fonction du résultat attendu et tenant compte des comparaisons inter-laboratoires, des observations et des retours d'information.
Domaine de notation — Test analytique pratiqué par le laboratoire participant et pour lequel l'organisateur donne une note.
Score (voir ci-dessus).
Domaine de notation (voir ci-dessus).
Organisateur — agence ou laboratoire chargé de coordonner toutes les activités nécessaires au bon déroulement du programme d'EEQ.
Participants — laboratoires de référence et laboratoires participants.
Essais d'aptitude — cf. Evaluation Externe de la Qualité (EEQ).
Assurance qualité — ensemble des activités par lesquelles le laboratoire s'engage à ce que les informations qu'il produit soient correctes[2]. Ensemble des actions systématiques et pré-établies nécessaires pour donner l'assurance qu'un produit, un procédé ou un service satisfont bien aux exigences de qualité[3]. Système conçu pour améliorer de façon continue la fiabilité et l'efficacité des services de laboratoire, comprenant le contrôle qualité, l'évaluation externe de la qualité et l'amélioration de la qualité[4].
Qualité — ensemble des caractéristiques d'un produit ou d'un service qui attestent de sa capacité à satisfaire un besoin donné[5].
Contrôle de qualité — techniques opérationnelles assurant la précision et l'exactitude des procédures de laboratoire, des équipements et des matériels.

[1] ISO/IEC Guide 43, part 1, 3.6 :1997.
[2] Inhorn, S.L. *Quality Assurance Practices for Health Laboratories*, American Public Health Association, 1978, p. 3.
[3] ISO 8402, 23.5 :1994.
[4] External Quality Assessment for AFB smear microscopy. Association of Public Health Laboratories, 2002, p. 6.
[5] Inhorn, S.L. *Quality Assurance Practices for Health Laboratories*, American Public Health Association, 1978, p. 252.

Laboratoire de référence — laboratoire spécialisé qui s'appuie sur son expertise pour fournir un appui technique à l'organisateur.
Enquête — ensemble de matériels envoyés par l'organisateur à un laboratoire participant afin d'évaluer la performance de celui-ci. L'enquête consiste en une combinaison de matériels : instructions, échantillons accompagnés de leur contexte clinique, un formulaire de réponse et des ressources pédagogiques.

1 Introduction

1.1 Contexte

La mise en place du Programme d'Evaluation Externe de la Qualité (EEQ) en microbiologie OMS/NICD est une conséquence directe de la stratégie de Surveillance Intégrée de la Maladie et de la Réponse (SIMR) [6], adoptée en 1999 par le bureau régional OMS pour l'Afrique (AFRO) visant à améliorer la capacité de surveillance et de riposte pour les maladies prioritaires. Selon les directives SIMR, il est nécessaire de s'appuyer sur un diagnostic de laboratoire pour confirmer la nature des épidémies suspectées et guider la riposte de santé publique. AFRO a conseillé l'utilisation de méthodes diagnostiques de laboratoire standardisées pour la confirmation des maladies prioritaires dans tous les pays de la région Afrique. Pour évaluer la capacité nationale des laboratoires à mettre en oeuvre ces méthodes standardisées, le bureau OMS de Lyon pour la Préparation et la Réponse des pays aux Epidémies et AFRO ont mis en place le programme d'EEQ en microbiologie OMS/NICD, en collaboration avec l'Institut National des Maladies Transmissibles (NICD), une division du National Health Laboratory Service (NHLS) d'Afrique du Sud, basée à Johannesburg.

1.2 Historique du programme d'EEQ en microbiologie OMS/NICD

En 2002, l'OMS a développé le concept d'un programme régional d'EEQ en microbiologie pour les laboratoires nationaux en Afrique, en ciblant tout particulièrement le diagnostic de laboratoire des maladies bactériennes à potentiel épidémique. Il a choisi le NICD comme organisateur technique. Le NCID est en effet reconnu pour son expertise technique en matière de diagnostic de laboratoire des maladies prioritaires et pour son expérience dans la mise en place de programmes nationaux et internationaux d'EEQ destinés aux laboratoires de santé publique dans la région OMS Afrique.

Le programme a pris exemple sur le programme canadien d'essais d'aptitude (Canadian Microbiology Proficiency Testing (CMPT) Program[7]) organisé par le Département de Pathologie et de Médecine de Laboratoire à l'Université de Colombie Britannique, Vancouver, Canada. En juin 2002, le programme CMPT a offert au NCID une consultation et une formation techniques concernant la préparation des échantillons d'EEQ et les différentes opérations d'un tel programme. Les principes et procédures d'EEQ ont été élaborés selon les normes et les standards d'organismes internationalement reconnus dans le domaine de la qualité, notamment l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO), la Commission Internationale

[6] Centers for Disease Control and Prevention and World Health Organization. Technical Guidelines for Integrated Disease Surveillance and Response in the African Region. Atlanta, Centers for Disease Control and Prevention, 2001 : 1-229.

[7] Voir www.cmpt.ca

d'Electrotechnique (IEC), la Fédération Internationale de Chimie Clinique (IFCC) et European Eurachem[8].

En juillet 2002, c'est avec le soutien de l'Agence des Etats-Unis pour le Développement International (USAID) et l'Alliance mondiale pour les vaccins et la vaccination (GAVI) que le programme d'EEQ en microbiologie OMS/NICD a été initié. Trente-six laboratoires dans 29 pays de la région OMS Afrique y ont participé et ont été évalués pour leur capacité à diagnostiquer des maladies bactériennes à potentiel épidémique, comme les méningites bactériennes, les diarrhées bactériennes et la peste. Depuis lors, le programme s'est considérablement étendu. En décembre 2006, il concernait en effet 68 laboratoires dans 43 des 46 pays de la région OMS Afrique et 4 laboratoires dans 3 pays de la région OMS de la Méditerranée orientale. Par ailleurs, le nombre et la complexité des enquêtes ont augmenté, si bien qu'en septembre 2005, deux maladies supplémentaires (paludisme et tuberculose) étaient également au menu des évaluations. Le programme a servi d'exemple pour les programmes d'EEQ nationaux et régionaux en Afrique et au-delà[9], attestant ainsi de sa valeur. Le soutien et les encouragements constants de USAID et GAVI ont permis au programme d'entrer dans sa cinquième année en juin 2006.

1.3 Objectif de ce document

Ce document vise à :

- décrire le programme d'EEQ en microbiologie OMS/NICD
- décrire les principes et les procédures en cours
- donner des modèles de documents techniques
- faire la synthèse du contenu des précédentes enquêtes (juillet 2002–janvier 2006).

Ce document n'est en aucune façon destiné à donner les résultats des enquêtes passées.

[8] Eurachem est en Europe un réseau d'organisations dont l'objectif est d'établir la traçabilité internationale des mesures en chimie analytique et d'assurer la promotion des bonnes pratiques en matière de qualité.
[9] En 2004, le bureau régional OMS pour la Méditerranée orientale (EMRO) a commencé à mettre en place un programme régional d'EEQ en microbiologie. En 2006, des représentants du Niger, du Mali, du Rwanda, du Sénégal, d'Ouganda et de la Zambie ont été formés et ont planifié la mise en place de programmes nationaux d'EEQ, tous d'après le schéma de l'EEQ OMS/NICD.

1.4 Public ciblé

Ce document est avant tout destiné aux personnes participant au programme d'EEQ OMS/NICD, à savoir :

- les responsables de laboratoire et le personnel des laboratoires participants et de référence
- le comité technique NICD chargé de la mise en œuvre du programme.

Ce document peut aussi servir à la formation des superviseurs des systèmes nationaux de surveillance de santé publique. Il s'adresse également aux personnes ayant des responsabilités dans le domaine du développement des capacités de laboratoire, à savoir :

- les directeurs des laboratoires nationaux de santé publique
- les cadres de santé au niveau national chargés de renforcer les systèmes de qualité et la capacité de laboratoire
- les directeurs des programmes nationaux de prévention de la maladie
- toute partie concernée au plan international, désireuse de soutenir le renforcement des capacités des laboratoires.

1.5 Diffusion et utilisation du document

Ce document est distribué aux participants et aux parties concernées par le programme d'EEQ en microbiologie OMS/NICD. Il est également disponible sous forme de fichier téléchargeable sur le site Internet de l'OMS.[10] Ce document se veut un outil pratique servant non seulement de référence pour les principes et les procédures du programme d'EEQ en microbiologie OMS/NICD, mais aussi de modèle pour la mise en place d'autres programmes d'EEQ dans des pays aux ressources limitées.

[10] www.who.int

2 Assurance qualité et programme d'EEQ en microbiologie OMS/NICD

2.1 Assurance qualité

L'assurance qualité (AQ) est un élément essentiel de la gestion d'un laboratoire médical. Elle désigne l'ensemble des actions menées par le laboratoire pour garantir qu'il remplit bien les objectifs de qualité et ce, dans tous les domaines. L'AQ doit impliquer tous ceux qui participent à l'ensemble du processus d'analyse de laboratoire. Elle doit au minimum garantir que :

- les analyses sont correctement exécutées
- les résultats sont précis, comparables et reproductibles
- les erreurs sont détectées et corrigées afin d'éviter tout problème.

2.2 Evaluation externe de la qualité

L'évaluation externe de la qualité (EEQ) constitue l'un des éléments de l'assurance qualité (AQ). Il existe plusieurs définitions de l'EEQ, ce qui donne lieu à des confusions. En effet, l'EEQ peut consister en :

- une évaluation sur site des laboratoires grâce à des techniques standardisées
- un panel d'échantillons à analyser, également désigné sous le terme de « panel testing » ou « proficiency testing » (essai d'aptitude)
- un réexamen des échantillons (vérification).[11,12]

Dans ce document, le terme EEQ est employé au sens de « proficiency testing », c'est-à-dire une évaluation systématique des compétences par un organisme extérieur chargé de distribuer des enquêtes aux laboratoires participants qui seront en retour évalués d'après leurs réponses à ces enquêtes.

Chaque enquête comporte une série d'échantillons et un questionnaire concernant des syndromes ou des pathologies particulières (par exemple les méningites, les diarrhées, la peste).

Les laboratoires participants analysent les échantillons selon des techniques recommandées, remplissent le questionnaire et envoient leurs résultats à

[11] External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy. Association of Public Health Laboratories, 2002.
[12] Basics of Quality Assurance for Intermediate and Peripheral Laboratories, WHO/EMRO, 2002.

l'organisateur. Ce dernier étudie les résultats, attribue une note à chaque laboratoire participant et communique ensuite ces notes en les accompagnant d'explications.

Les enquêtes sont identiques pour tous les laboratoires participants et, lorsque c'est possible, les échantillons fournis simulent de véritables prélèvements cliniques. Les laboratoires participants sont censés procéder à l'analyse de ces spécimens en se servant des techniques qu'ils utilisent au quotidien pour analyser les échantillons de patients qui leur sont confiés. Par conséquent, l'EEQ est considérée comme une évaluation indirecte de la performance du laboratoire sur des échantillons cliniques.

Dans le cas de l'EEQ de la microbiologie, les réponses sont évaluées par rapport à un résultat prédéterminé (par exemple la nature du microorganisme et le profil de sensibilité aux antimicrobiens). Dans le cas de l'EEQ des analyses biochimiques et de l'hématologie, les réponses sont plutôt comparées avec la performance moyenne d'un certain nombre de laboratoires.

De nombreux programmes d'EEQ procurent également des ressources pédagogiques telles que des commentaires techniques, des monographies ou des documents de référence sur des sujets donnés.

2.3 Objectifs du programme d'EEQ en microbiologie OMS/NICD

Les objectifs du programme d'EEQ en microbiologie OMS/NICD sont censés bénéficier à la fois aux laboratoires participants et aux programmes de santé publique.

Ce programme doit permettre aux laboratoires participants :

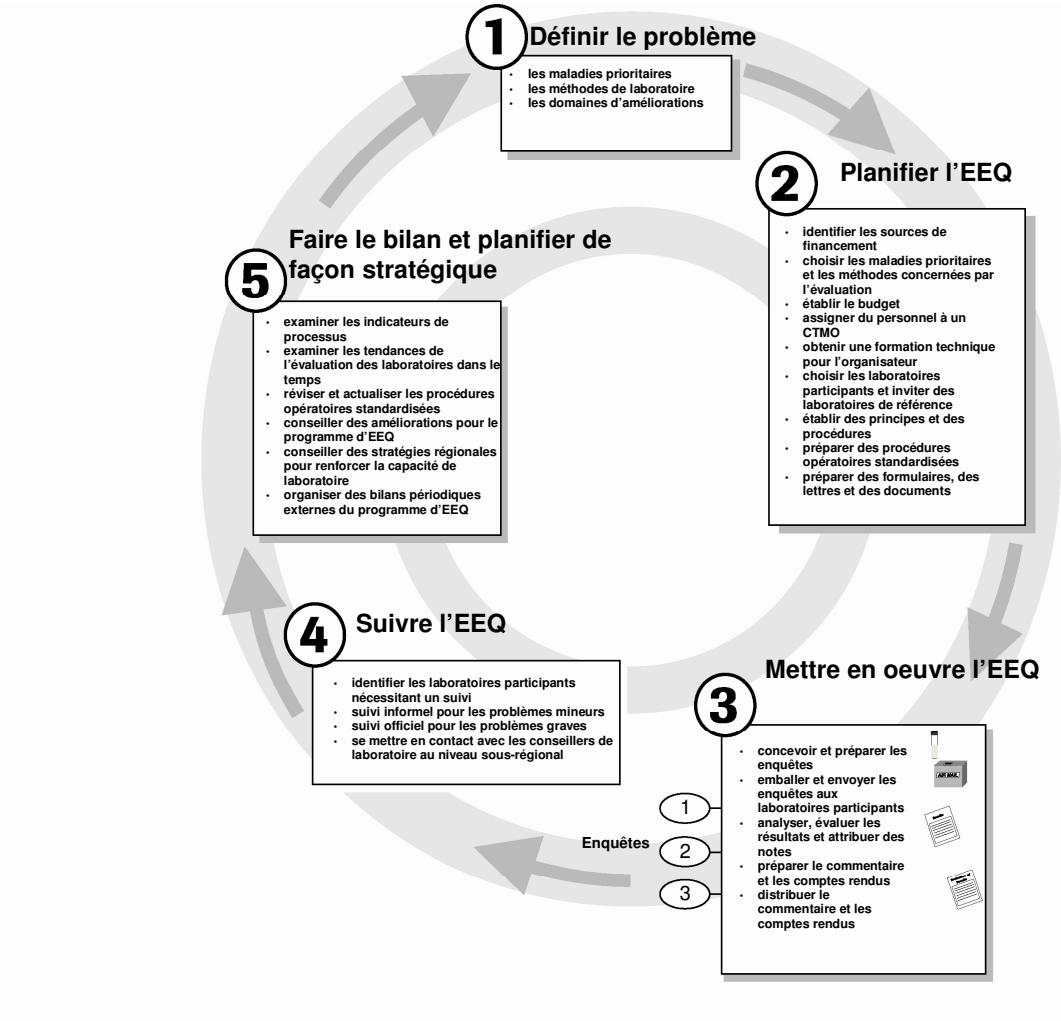
- D'identifier et évaluer leurs capacités par le biais d'une évaluation externe
- De les orienter vers des mesures correctives et une amélioration continue
- D'offrir au personnel de laboratoire une formation continue sur des méthodes diagnostiques standardisées
- De sensibiliser aux succès et aux difficultés des pratiques de laboratoire
- De donner des arguments pour plaider en faveur du développement des capacités de laboratoire.

Ce programme doit permettre aux programmes de santé publique de :

- fournir des données permettant d'identifier des stratégies pour améliorer les moyens de laboratoire
- guider la planification et l'évaluation des formations de laboratoire
- d'identifier les laboratoires d'excellence
- de renforcer les réseaux de communication entre les laboratoires
- de donner des arguments pour plaider en faveur du développement des laboratoires
- de renforcer les liens entre les différents programmes verticaux de l'OMS pour la prévention et la lutte contre les maladies.

La mise en oeuvre de ces objectifs nécessite une approche systématique illustrée dans la Figure 1.

Figure 1 : Déroulement du programme d'EEQ[13]
Mise en Oeuvre de l'Evaluation Externe de la Qualité



[13] Reproduit avec la permission du CDC.

3 Pathologies et tests diagnostiques

3.1 Pathologies

Au départ, le programme d'EEQ en microbiologie OMS/NICD concernait la méningite bactérienne, les diarrhées bactériennes et la peste. La tuberculose et le paludisme sont venus s'y ajouter au cours de la quatrième année (2005–2006). Ces pathologies ont été choisies pour faire partie du programme d'EEQ parce qu'elles figurent parmi les maladies prioritaires sélectionnées dans le cadre de la SIMR par AFRO.[14] Elles sont dites prioritaires parce qu'elles appartiennent à l'une ou l'autre des catégories suivantes :

- maladies qui sont parmi les premières causes de morbidité et de mortalité en Afrique (paludisme, diarrhées bactériennes, tuberculose et méningite à méningocoque)
- maladies à potentiel épidémique (méningite à méningocoque, choléra, peste)
- maladies qui nécessitent une surveillance internationale (peste et choléra)
- maladies pour lesquelles il existe des actions de lutte et de prévention efficaces (méningite, diarrhées bactériennes, peste et paludisme)

Par ailleurs, si ces maladies ont été ciblées par le programme d'EEQ, c'est aussi parce qu'il existe des tests de laboratoire permettant de confirmer leur diagnostic et d'orienter les directives de lutte et de prévention. Enfin, dans certaines zones aux ressources limitées, les laboratoires disposent de peu de moyens d'évaluation externe de la qualité pour ces maladies.

3.2 Tests diagnostiques

Ce programme d'EEQ évalue les tests diagnostiques conseillés par AFRO pour confirmer les épidémies, s'il s'agit de maladies prioritaires[15] (Tableau 1).

[14] Centers for Disease Control and Prevention and World Health Organization. Technical Guidelines for Integrated Disease Surveillance and Response in the African Region. Atlanta, Centers for Disease Control and Prevention, 2001 : *13*.

[15] Directives OMS CDC pour la Surveillance Intégrée de la Maladie et la Réponse dans la région Afrique.

Tableau 1. Pathologies et tests diagnostiques

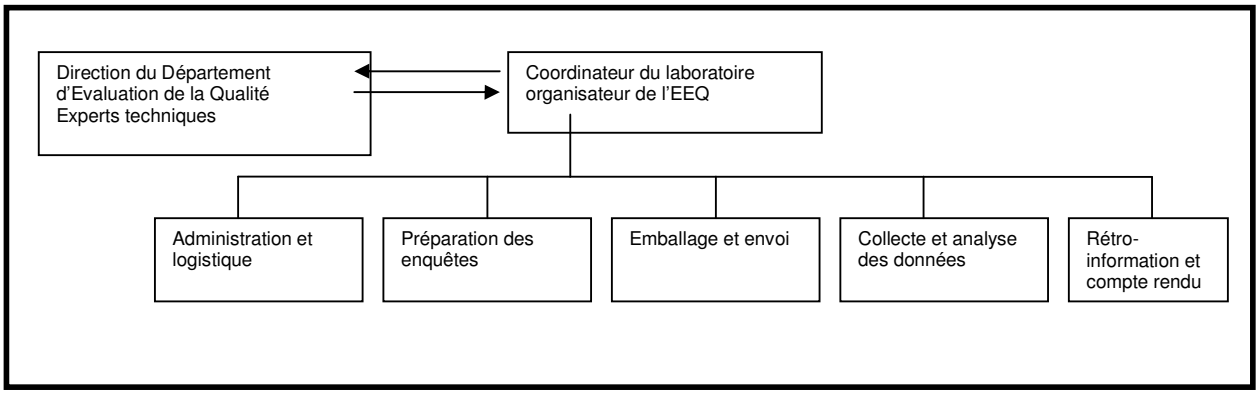
Pathologies (agents responsables)	Tests diagnostiques concernés par l'EEQ
Méningites bactériennes (*Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*)	Microscopie Culture et identification Antibiogramme
Diarrhées bactériennes (*Salmonella* spp., *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*)	Culture et identification Antibiogramme
Peste (*Yersinia pestis*)	Microscopie Culture et identification Antibiogramme Sérologie Bandelettes (immunochromatographie) pour détection de l'antigène F1
Paludisme (*Plasmodium* spp. essentiellement *Plasmodium falciparum*)	Microscopie et mesure de la parasitémie
Tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*)	Microscopie

4 Organisation du programme d'EEQ en microbiologie OMS/NICD

4.1 Comité Technique de Mise en Oeuvre

Le Comité Technique de Mise en Œuvre (CTMO) coordonne les opérations du programme d'EEQ. Ce comité siège dans une division du National Health Laboratory Service : l'Institut National des Maladies Transmissibles (NICD) à Johannesbourg, en République d'Afrique du Sud. A l'intérieur de ce comité, le coordinateur de l'EEQ supervise toutes les opérations en consultation avec les experts techniques et la direction du Département d'Evaluation de la Qualité.

Figure 2 : Fonctions du CTMO



Les responsabilités du CTMO sont de :

- planifier la **fréquence** des enquêtes
- définir la **nature et le nombre d'échantillons** à fournir pour chaque enquête;
- choisir les **matériels de contrôle qualité** à distribuer aux laboratoires participants
- élaborer des **Procédures Opératoires Standardisées** (POS) pour toutes les opérations de mise en œuvre
- fixer des **délais** acceptables pour l'envoi des enquêtes et l'échange d'information
- **préparer** des enquêtes
- **empaqueter** le matériel des enquêtes afin d'éviter toute détérioration pendant le transport
- **envoyer** les enquêtes en respectant les réglementations nationales et internationales
- définir un schéma de **notation** des résultats
- **évaluer** tous les resultats
- définir les limites des **résultats acceptables**

- garantir la **confidentialité** des résultats
- fournir des **comptes rendus** de l'évaluation à tous les laboratoires participants et au Comité Technique Consultatif (voir ci-dessous)
- orienter les laboratoires participants vers des **améliorations**
- participer à une é**valuation externe** pour s'assurer que leur niveau de performance est bien conforme aux standards requis
- **assurer la coordination** avec les laboratoires de référence

4.2 Laboratoires participants

C'est le bureau régional OMS pour l'Afrique qui choisit les laboratoires qui participeront à l'EEQ dans le but d'évaluer leur performance. Il s'agit de laboratoires désignés par le ministère de la Santé comme laboratoires nationaux de santé publique. De plus, les principaux laboratoires qui participent à la surveillance et à la réponse aux maladies dans le pays sont également invités à participer à l'EEQ. La plupart des laboratoires participants sont affiliés aux hôpitaux publics et leur fonction dans le domaine de la santé publique ne représentent qu'une part minime des services qu'ils proposent. Certains des laboratoires participants sont affiliés soit à des organismes de santé publique, soit à des organismes de recherche médicale.

Dès sa quatrième année, le programme d'EEQ en microbiologie OMS/NICD concernait 72 laboratoires, dont 68 situés dans 43 des 46 pays de la région OMS Afrique[16] et 4 dans 3 pays situés dans la ceinture de la méningite de la région OMS de la Méditerranée Orientale[17] (voir Annexe 1).

Les laboratoires participent de leur plein gré et gratuitement au programme d'EEQ.

Chaque laboratoire participant s'engage à :

- fournir des **coordonnées correctes** pour faciliter la communication et la réception rapide des enquêtes et des comptes rendus
- **attribuer les responsabilités** à tous les membres du personnel qui participeront aux enquêtes
- **traiter** les échantillons des enquêtes de la même façon dont sont traités les échantillons en routine
- **garantir** (par signature au bas du compte rendu) que toutes les analyses de l'enquête ont bien été réalisées conformément aux méthodes indiquées dans le compte rendu
- fournir les renseignements demandés concernant les **méthodes et les résultats**
- **communiquer les résultats** de chaque enquête au laboratoire organisateur de l'EEQ dans les délais impartis
- communiquer tout **problème** à propos des enquêtes au laboratoire organisateur de l'EEQ
- **partager les résultats** de l'EEQ avec tous les membres du personnel

[16] Le Libéria, l'Ile Maurice et l'Afrique du Sud n'ont pas été enrôlés.
[17] Djibouti, la Somalie et le Soudan

- **collaborer** avec le laboratoire organisateur, l'OMS, les autorités sanitaires et des partenaires pour résoudre les problèmes révélés par l'EEQ.

4.3 Laboratoires de référence

Les laboratoires de référence sont des laboratoires spécialisés invités à participer au programme d'EEQ dans leur domaine d'expertise. Pour certains, il s'agit de centres collaborateurs OMS qui ont été choisis pour leur compétence de renommée internationale en matière de diagnostic de laboratoire pour certaines maladies. Ces laboratoires de référence reçoivent des enquêtes correspondant à leur spécialité, dont la composition est rigoureusement identique à celle des enquêtes reçues par les laboratoires participants. Ils fournissent ainsi un contrôle qualité des échantillons de l'enquête, leurs résultats et leurs commentaires aidant le CTMO, lors du retour d'information, à déterminer les limites des réponses acceptables. L'EEQ exige au moins deux laboratoires de référence pour chaque pathologie. On trouvera en Annexe 1 la liste des laboratoires de référence pour le programme d'EEQ depuis 2002.

4.4 Comité Technique Consultatif

Le Comité Technique Consultatif (CTC) est constitué de personnels techniques du siège et du bureau régional de l'OMS dotés d'une solide expérience en matière de développement des laboratoires en Afrique, et qui peuvent ainsi donner des conseils au CTMO. Une fois chaque enquête terminée, le CTC reçoit un compte rendu du CTMO, étudie les résultats, donne des conseils sur la façon d'identifier les forces et les faiblesses des laboratoires participants, et fait des recommandations de suivi pour les laboratoires qui en ont besoin.

Le CTC est chargé de :

- **examiner** les résultats de chaque enquête
- identifier les laboratoires **d'excellence**
- identifier les facteurs qui contribuent à une **mauvaise performance** des laboratoires participants
- identifier la nécessité ou non d'**actions de suivi** pour les laboratoires participants
- **donner des conseils** auprès de l'administration des laboratoires participants selon les besoins, d'après les résultats de l'EEQ
- **inviter les partenaires techniques** à donner leur avis et des conseils en matière de préparation, de mise en oeuvre et d'évaluation des enquêtes.

4.5 Comité Consultatif Régional

Le Comité Consultatif Régional (CCR) est composé de partenaires techniques qui participent avec le CTMO et le CTC au bilan technique annuel du programme d'EEQ

en microbiologie OMS/NICD et au développement du plan d'action annuel pour le programme. Ils sont invités par AFRO sur la base de leur expertise en matière de tests diagnostiques, de renforcement de laboratoire et de systèmes de qualité. Le Conseiller Régional pour les Laboratoires de l'unité AFRO/CSR est chargé de la coordination du comité.

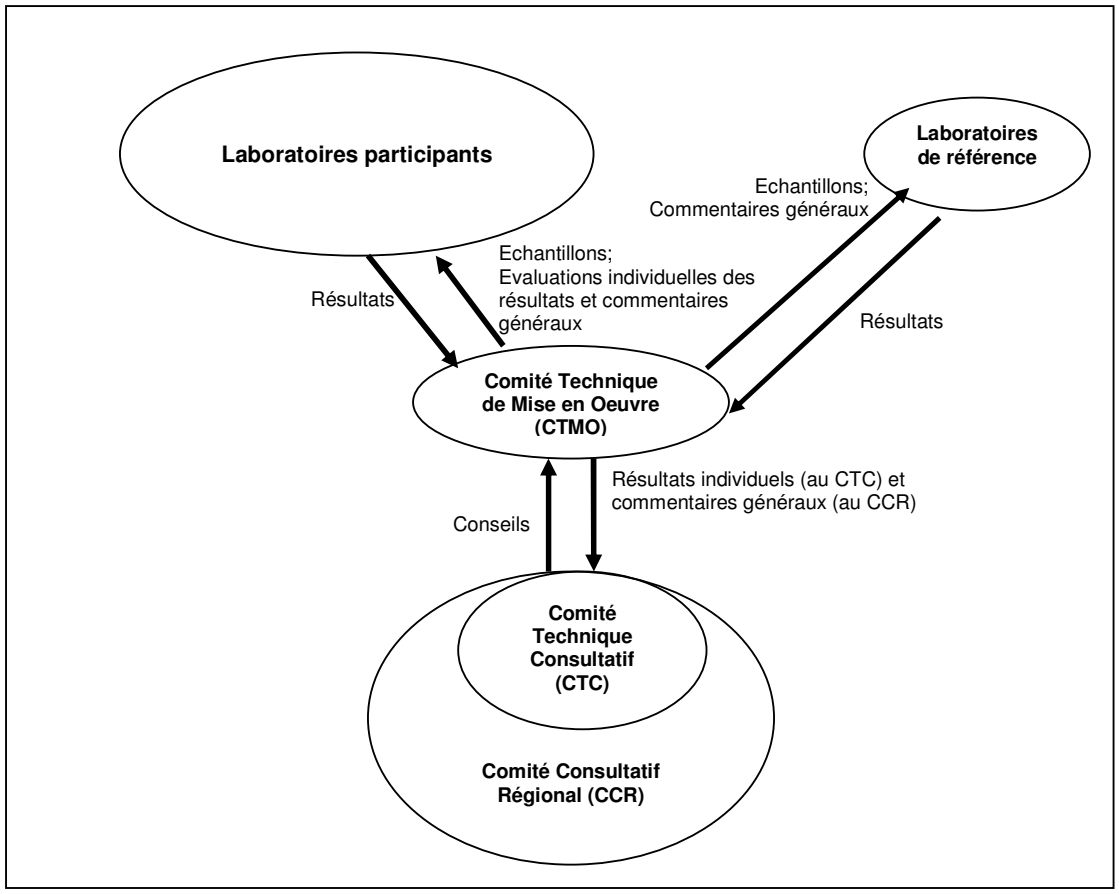
Le CCR est chargé de :

- examiner les opérations techniques et les documents du programme d'EEQ en microbiologie OMS/NCID
- fournir une **assistance technique** pour le suivi des activités proposées par le CTC et mises en oeuvre par le CTMO après chaque réunion de bilan annuelle
- informer **AFRO** des stratégies et des actions nécessaires au renforcement de la capacité de laboratoire;
- **faire des recommandations** concernant les futures orientations du programme d'EEQ OMS/NICD
- **assurer les liens** entre les programmes verticaux impliqués dans les questions d'évaluation de la qualité des laboratoires de la région OMS Afrique.

4.6 Interactions

Les comités décrits ci-dessus interagissent entre eux comme l'illustre la Figure 3.

Figure 3 : Interactions entre les différents comités oeuvrant au programme d'EEQ



5 Analyse de la situation

Analyser une situation consiste à rassembler et à analyser les informations relatives à la situation en cours d'une organisation ou d'un programme. Ainsi, tout renseignement concernant les laboratoires participants à l'EEQ peut aider l'organisateur à planifier et à décider des opérations d'EEQ. Par exemple, les renseignements concernant les stocks, les fournitures et les équipements donnent une idée des capacités techniques des laboratoires. De la même façon, des informations récentes concernant les moyens de communication permettent à l'organisateur de déterminer la meilleure façon de communiquer avec les laboratoires participants.

Pour obtenir des renseignements sur les laboratoires participants au programme d'EEQ OMS/NCID, le CTMO s'appuie non seulement sur les évaluations réalisées par les Ministères de la Santé et l'OMS, mais aussi sur des questionnaires spécifiques.

5.1 Evaluations OMS

5.1.1 Evaluations du bureau régional OMS pour l'Afrique concernant la mise en place de la SIMR

Le bureau régional OMS pour l'Afrique conseille aux pays d'évaluer la capacité de leurs systèmes nationaux de surveillance et de laboratoire pour faciliter la SIMR. L'évaluation des laboratoires vise à déterminer la capacité de ceux-ci à dispenser aux différents niveaux, les services nécessaires à la surveillance des maladies prioritaires.

5.1.2 Evaluations OMS/EPR/LYO pour le Programme de Développement Intégré des Capacités de Laboratoire

Depuis 2002, le bureau OMS de Lyon a évalué les laboratoires africains participant aux cohortes de formation du Programme de Développement Intégré des Capacités pour les Spécialistes de Laboratoire. Ces évaluations étaient destinées à rassembler des données de base concernant les laboratoires avant qu'ils ne participent au programme et à déterminer leur capacité à assurer les fonctions essentielles d'un laboratoire national de référence. Un outil standardisé d'évaluation de laboratoire a donc été conçu à cette occasion[18] .

5.2 Questionnaires NICD

Le NICD inclut périodiquement des questionnaires dans les enquêtes envoyées aux laboratoires participants. Ces questionnaires abordent des questions techniques et de logistique, telles que la liste des analyses pratiquées, l'équipement de laboratoire disponible et les moyens de communication (voir quelques exemples en Annexe 2). Une fois ces questionnaires remplis, le CTMO les étudie et en fait la synthèse avant de

[18] Pour toute information concernant la méthodologie d'évaluation, merci de contacter le bureau OMS de Lyon à oms@lyon.who.int

les présenter au CCR lors des réunions annuelles de bilan qui permettent d'orienter les améliorations à apporter au programme.

6 Processus du programme d'EEQ

6.1 Choix des laboratoires participants

Les laboratoires qui vont participer au programme d'EEQ OMS/NICD sont désignés par AFRO (cf. paragraphe 4.2). Une fois sélectionnés, les laboratoires participants reçoivent du NICD (par e-mail et par la poste) une notice d'introduction qui est envoyée en même temps aux responsables des Départements d'Epidémiologie et de Laboratoire du Ministère de la Santé du pays correspondant, ainsi qu'au bureau OMS du pays concerné par l'intermédiaire du bureau régional OMS pour l'Afrique.

Cette notice d'introduction constitue un premier contact entre l'organisateur, les laboratoires participants, les laboratoires de référence et les partenaires concernés au niveau local. Elle est destinée à informer non seulement des objectifs du programme d'EEQ, mais aussi des rôles et des responsabilités de tous ceux qui y participent. Naturellement, ces renseignements s'adressent avant tout au directeur et au personnel des laboratoires participants et de référence.

6.2 Contenu des enquêtes

Les enquêtes sont conçues de façon à évaluer la capacité des laboratoires participants à appliquer des méthodes diagnostiques standardisées pour les maladies prioritaires. Chaque enquête concerne les pathologies suivantes : méningite bactérienne, diarrhée bactérienne, peste, paludisme et tuberculose. On trouvera en Annexe 3 un résumé des enquêtes expédiées entre juillet 2002 et janvier 2006.

Chaque enquête contient :

6.2.1 Des instructions

Un document imprimé intitulé « instructions » accompagne chaque enquête envoyée aux laboratoires participants. Il leur explique comment traiter l'enquête et y répondre. Il précise aussi le délai limite de retour des résultats et la date à laquelle le laboratoire participant peut espérer un retour d'information.

6.2.2 Des échantillons

Les échantillons sont similaires à ceux qui sont régulièrement analysés par les laboratoires participants. Il peut s'agir d'échantillons cliniques, de souches lyophilisées ou d'échantillons simulés. Ces derniers sont spécifiquement préparés de façon à imiter les échantillons cliniques.

6.2.3 Formulaire de réponse

Le formulaire de réponse décrit le contexte clinique de chaque échantillon de l'enquête et permet de consigner les résultats dans un format standard. Envoyé sous forme d'imprimé avec chaque enquête, il est également disponible auprès du Centre de Ressources OMS pour les laboratoires de santé publique.[19]

Les laboratoires participants renvoient les formulaires de réponse dûment complétés par e-mail ou par fax.

Le formulaire de réponse comporte deux parties :

Le contexte clinique

Le contexte clinique décrit les antécédents du cas simulé et l'origine des échantillons. Chaque cas est adapté pour l'Afrique. Par exemple, une enquête concernant la méningite bactérienne décrira un cas clinique de méningite (provoquée par le sérogroupe W135 de *Neisseria meningitidis*) compatible avec les récentes épidémies de méningite en Afrique de l'Ouest. De la même façon, une enquête concernant les diarrhées bactériennes pourra décrire un cas de shigellose (provoquée par *Shigella dysenteriae* type 1) comparable à ceux qui surviennent en Afrique centrale. Le contexte clinique peut également donner des renseignements pertinents sur les échantillons, par exemple les résultats d'autres analyses, des consignes de manipulation, etc.

Questionnaire

Le questionnaire est un document standardisé à l'usage du laboratoire pour enregistrer les résultats de l'enquête. Il peut aussi comporter des questions concernant la méthodologie et l'algorithme d'analyse utilisés par le laboratoire.

6.3 Préparation et distribution des enquêtes

6.3.1 Préparation des enquêtes

Environ trois semaines avant la date prévue pour l'enquête, l'organisateur commence à préparer les histoires cliniques et les échantillons simulés, selon les Procédures Opératoires Standardisées (POS; cf. Annexe 4).

NB : Si pour les besoins de l'EEQ, il faut prélever des échantillons chez des personnes, il est nécessaire d'obtenir leur consentement éclairé conformément aux règlements des Comités de Révision Interne et d'éthique du NICD et de l'Université de Witwatersrand, Afrique du Sud.

6.3.2 Emballage

Les enquêtes sont emballées avant envoi, en suivant des POS pour être en conformité avec :

[19] Le Centre de Ressources internet pour les laboratoires de santé publique a été établi par le Bureau OMS de Lyon en mai 2005. Son adresse est : www.who.int/labresources

- Les directives de l'association internationale des transporteurs aériens (IATA) pour l'envoi des substances infectieuses
- Les recommandations des Nations Unies à propos du transport des substances dangereuses (Classe 6)[20]

6.3.3 Distribution

Les enquêtes sont distribuées en fonction des analyses réalisées régulièrement par le laboratoire participant. Par exemple, tous les laboratoires participants reçoivent des enquêtes concernant la méningite bactérienne et les diarrhées bactériennes, parce qu'ils font tous ces analyses en routine. Cependant, seuls quelques-uns de ces laboratoires reçoivent des enquêtes sur la peste, parce que tous ne pratiquent pas les tests diagnostiques de la peste.

6.3.4 Envoi et suivi

L'envoi des enquêtes se fait par transporteur aérien express. Ce moyen de transport offre un service rapide, fiable et dont on peut suivre la trace dans des zones ne disposant pas de services postaux efficaces. Il permet à l'expéditeur de suivre son envoi.

La compagnie de transport aérien express livre les colis contenant les enquêtes en fonction des règlements en vigueur pour le transport des substances non dangereuses ou dangereuses, selon le cas, et de préférence de porte à porte, à chaque fois que cela est possible. Si le règlement permet de livrer le colis seulement à l'aéroport le plus proche, l'organisateur doit fournir des instructions spécifiques au transporteur pour que celui-ci puisse assurer une bonne conservation du contenu et prévenir le laboratoire destinataire par téléphone ou par courrier électronique qu'il peut venir chercher son colis.

Le CTMO suit les envois grâce au service de suivi sur le site web du transporteur aérien. Ce service de suivi permet de connaître la date exacte de livraison de l'enquête au laboratoire participant et de calculer ainsi le délai de réponse.

6.4 Calendrier

6.4.1 Date de l'enquête

La date de l'enquête correspond à la date d'envoi des échantillons par l'organisateur. Le nombre d'enquêtes envoyées chaque année dépend du budget disponible, du temps nécessaire au déroulement de chaque enquête et du nombre d'enquêtes jugées nécessaires pour une EEQ efficace. D'après ces critères, il a été convenu de distribuer trois enquêtes par an.

[20] Selon les règlements en vigueur, les cultures pures de *V. cholerae, S. dysenteriae* 1, et *Y. pestis* sont classées dans la catégorie des « Matières infectieuses, Catégorie A ».

6.4.2 Date du courrier électronique de rappel

Un message de courrier électonique est expédié à chaque laboratoire participant qui n'a pas encore rendu les résultats de l'enquête en cours, pour lui rappeler qu'il doit impérativement rendre son formulaire de réponse avant la date de clôture. Ce courrier électonique de rappel est envoyé quatre jours avant la date de clôture.

6.4.3 Date de clôture

La date de clôture correspond à la date après laquelle on considère que les résultats des laboratoires participants sont en retard et par conséquent inacceptables.

La date de clôture correspond à 15 jours ouvrés après la date de réception de l'enquête par le dernier laboratoire participant, d'après les données de suivi obtenues du transporteur aérien. On considère qu'il s'agit d'un délai raisonnable pour l'analyse des échantillons par les laboratoires participants.

6.5 Evaluation des résultats de l'enquête

Le CTMO reçoit les formulaires de réponse des laboratoires participants et des laboratoires de référence. Il les analyse et leur attribue à chacun une note ou un score.

Les évaluations tiennent compte des informations suivantes :

- résultats attendus pour les analyses requises
- résultats, observations et retour d'information des laboratoires de référence
- résultats, observations et retour d'information des laboratoires participants.

Il faut tenir compte de tous ces renseignements car des imprévus peuvent parfois empêcher les laboratoires participants d'obtenir les résultats attendus. En effet, si les pratiques de contrôle qualité pendant la préparation des enquêtes permettent d'éviter de nombreux problèmes, des éléments défavorables peuvent toutefois passer inaperçus jusqu'à ce que les échantillons soient analysés par d'autres laboratoires. De plus, des conditions d'envoi perturbées peuvent également compromettre la viabilité des pathogènes ou la stabilité des échantillons.

Le CTMO conclut le processus d'évaluation lors de la réunion officielle de revue de l'enquête.

6.5.1 Domaines de notation (ou de classement)

Les domaines de notation correspondent aux différentes catégories de résultats de l'enquête auxquelles le CTMO attribue des notes. Chaque domaine de notation correspond à un point de décision important ou à un test analytique pratiqué par le laboratoire participant. Selon les échantillons de l'enquête et les analyses demandées, les domaines de notation peuvent englober une ou plusieurs des catégories suivantes :

- microscopie
- culture et identification
- sérotypage
- choix des antimicrobiens
- résultats d'antibiogramme et compte-rendu
- résultats de test rapide (antigène F1 pour la peste)
- résultats de la parasitémie pour le paludisme.

Le laboratoire participant reçoit une note séparée dans chaque catégorie. La note finale de l'enquête correspond à la somme de toutes ces notes. Ce n'est que dans des circonstances exceptionnelles qu'il est parfois procédé à une évaluation partielle, c'est-à-dire, le retrait d'une catégorie de notation sans que cela affecte le score final.

6.5.2 Notes (scores)

Le CTMO essaie de noter toutes les enquêtes de façon cohérente. Il utilise pour cela le schéma suivant.[21]

Note	Description	Critère d'attribution du score
4	Réponse parfaitement correcte	Réponse jugée correcte par le comité aussi bien en terme de nomenclature qu'en terme de pertinence clinique.
3	Réponse correcte ou acceptable pour l'essentiel	Erreur de nomenclature, le plus souvent au niveau de l'espèce, ou erreur d'antibiogramme du germe, et dont l'imprécision n'a pas ou peu d'impact clinique. Divergence par rapport au résultat jugé le plus pertinent au plan clinique, mais qui ne devrait pas poser de difficulté d'interprétation du résultat.
Séparateur		**Pour amplifier la différence entre les deux groupes.**
1	Réponse incorrecte ou inacceptable	Erreur de nomenclature au niveau de l'espèce, mais qui serait susceptible d'affecter l'interprétation clinique et provoquer potentiellement une erreur de traitement. Erreur majeure concernant l'antibiogramme. Résultat cliniquement pertinent qui pourrait entraîner une erreur de diagnostic ou de traitement.

[21] Le schéma de notation a été choisi d'après la méthodologie utilisée par le Canadian Microbiology Proficiency Testing Program.

0	Très mauvaise réponse ou réponse totalement inacceptable	Erreur de nomenclature au niveau du genre et de l'espèce ou erreur importante concernant l'antibiogramme qui pourrait entraîner une grave erreur d'interprétation ou de traitement. Résultat cliniquement pertinent qui pourrait entraîner une grave erreur de diagnostic ou de traitement.

Les réponses de chaque laboratoire participant sont notées conformément au schéma de notation établi. Tous les laboratoires participants reçoivent un compte rendu individuel de ses scores, accompagnés d'un commentaire général (voir ci-dessous). Les laboratoires de référence reçoivent uniquement le commentaire général. Quant au CTC, il reçoit le commentaire général, ainsi qu'une feuille confidentielle des données de l'enquête (voir ci-dessous).

6.6 Documentation des résultats et retour d'information aux laboratoires participants

6.6.1 Confidentialité des comptes rendus

Les résultats des laboratoires participants sont traités de façon confidentielle. Les comptes rendus non anonymes, c'est à dire identifiant le laboratoire participant, ne sont pas diffusés en dehors du CTC. Ces derniers respectent par ailleurs l'anonymat des laboratoires participants lorsqu'ils sont amenés à se servir de ces rapports d'évaluation.

6.6.2 Rapport confidentiel de l'EEQ OMS/NICD

Il s'agit d'un rapport de rétro-information individuel aux laboratoires participants. Ce rapport est adapté à chaque laboratoire de façon à présenter uniquement les scores de ce laboratoire. Il comporte également une explication des critères de notation, ainsi qu'un commentaire technique en cas de divergence des résultats par rapport aux résultats attendus. Ce document permet de donner un retour d'information individuel sur la performance du laboratoire et de faire des recommandations pour leur amélioration. Le laboratoire peut alors utiliser cette information pour revoir ses méthodes et y apporter des améliorations.

Ce rapport est envoyé par courrier électronique deux semaines après la date de clôture, et sous forme d'un document imprimé avec l'enquête suivante.

6.6.3 Feuille d'action corrective

La feuille d'action corrective est destinée à des laboratoires participants bien précis. Elle contient en effet un exercice technique d'amélioration portant sur les problèmes

du laboratoire identifiés lors d'une enquête d'EEQ. Cet exercice a pour but d'aider le personnel de laboratoire à identifier la cause des résultats inacceptables et à prendre les mesures correctives pour y remédier.

6.6.4 Commentaire général de l'EEQ OMS/NICD

Il s'agit d'un rapport détaillé de l'enquête destiné à tous les laboratoires participants, à tous les laboratoires de référence et au CCR. Ce document présente les réponses correctes ou acceptables et les scores de tous les laboratoires participants (sans identifiant), accompagnés de commentaires décrivant les problèmes rencontrés qu'ils soient mineurs ou sérieux.

Ce document permet de comparer les laboratoires entre eux et de mettre l'accent sur les problèmes susceptibles d'affecter les performances. Les laboratoires peuvent ainsi se servir de ce rapport pour mieux comprendre leurs propres difficultés et celles rencontrées par d'autres laboratoires.

Ce commentaire général est envoyé par courrier électronique cinq semaines après la date de clôture, et sous forme d'imprimé avec l'enquête suivante.

6.6.5 Données confidentielles de l'enquête

Les données confidentielles de l'enquête sont présentées sous forme d'un tableau contenant tous les résultats et tous les scores d'une seule enquête. Il englobe les résultats corrects ou attendus, les résultats de tous les laboratoires participants et ceux des laboratoires de référence. Tous les laboratoires sont identifiés dans ce document qui vise à comparer les laboratoires entre eux et à mettre l'accent sur les problèmes qui ont pu les empêcher d'obtenir des performances acceptables.

Ce document est uniquement destiné au CTC qui utilise ces données pour évaluer les performances, identifier les problèmes et conseiller un suivi approprié. Le CTC le reçoit par courrier électronique quatre semaines après la date de clôture.

6.6.6 Rapport annuel de l'EEQ OMS/NICD

Le rapport annuel de l'EEQ OMS/NICD résume tous les scores de toutes les enquêtes de l'année. Il contient les résultats corrects ou attendus et les scores de tous les laboratoires participants et des laboratoires de référence. Aucun laboratoire n'est identifié dans ce document.

Le rapport annuel de l'EEQ OMS/NICD est destiné à l'ensemble des laboratoires participants et de référence, aux parties concernées au niveau local et international, au CTC et CCR. Il est distribué par courrier électronique quatre semaines après la date de clôture de la dernière enquête de l'année et sous forme imprimée lors de la réunion annuelle du CCR.

6.7 Gestion des données

Les données de l'EEQ sont enregistrées dans des bases de données électroniques Microsoft Excel® et Access®, sauvegardées chaque semaine. Tous les résultats, les analyses de données, les évaluations et les rapports sont archivés et accessibles pendant cinq ans.

7 Documents

Des documents standardisés facilitent la mise en œuvre de l'EEQ. Certains traitent des procédures techniques et sont destinés à promouvoir la qualité au niveau des opérations techniques et de la gestion des activités d'EEQ. D'autres documents servent à la communication entre le CTMO, les laboratoires participants et de référence, les comités consultatifs et les parties concernées. Ces documents sont destinés à promouvoir une bonne compréhension des buts, des objectifs et des conclusions du programme d'EEQ.

Tous les documents sont préparés par le CTMO. Ils sont revus et approuvés par le CCR.

7.1 Documents techniques

7.1.1 Procédures Opératoires Standardisées

Une POS est une procédure écrite qui doit être suivie par tout le personnel lorsqu'il effectue son travail de laboratoire au quotidien. Chaque POS détaille les étapes d'une tâche précise dans l'ordre où elles doivent être exécutées. L'utilisation de POS écrites garantit la qualité et la fiabilité du résultat des tests diagnostiques et du déroulement des enquêtes d'EEQ. Ces protocoles écrits donnent également une base pour régler tout problème susceptible de survenir. On trouvera en Annexe 4 les POS préparées pour le programme d'EEQ en microbiologie OMS/NICD.

7.1.2 Monographies techniques

Les monographies sont destinées à donner une information théorique et pratique pour améliorer les connaissances et la compétence technique du personnel des laboratoires participants. Elles comportent des documents provenant de l'OMS et du NICD. Les laboratoires participants peuvent s'en servir en interne pour la formation et pour faire le point sur leurs pratiques. Les monographies sont distribuées (sous forme d'imprimés) avec les enquêtes et sont également disponibles auprès du Centre de ressources OMS pour les laboratoires de santé publique.

7.2 Documents de communication

Ces documents permettent la communication de l'information, des résultats, du retour d'information et des rapports de l'EEQ. Ils englobent en effet la notice d'information préliminaire, les instructions, les formulaires de réponse (avec contexte clinique et questionnaire), les formulaires de rétro-information aux laboratoires participants, au CTMO et au CCR, la feuille d'action corrective et le commentaire général OMS/NICD de l'EEQ. Leur utilisation est décrite en détail dans le paragraphe 6. On trouvera des modèles de ces documents en Annexe 5. Tous ces documents sont préparés en anglais et en français, et quand c'est possible, en portugais. Les différentes versions sont distribuées selon les besoins de chaque pays.

8 Contrôle et évaluation du programme d'EEQ en microbiologie OMS/NICD

8.1 Surveillance des indicateurs de processus

Le CTMO surveille des indicateurs de processus pour chaque enquête. Ces indicateurs sont les suivants :

- le pourcentage de laboratoires participants qui envoient une réponse
- le délai moyen de réponse en jours
- le score moyen global
- le pourcentage de laboratoires participants ayant obtenu des scores acceptables dans chaque domaine de notation.

Ces données sont disponibles sur un CD-Rom préparé après chaque réunion de bilan annuelle et distribué aux membres du CCR. Il est également possible de les consulter dans le rapport annuel de l'EEQ OMS/NICD.

8.2 Evaluation externe

Afin de garantir la conformité avec des standards reconnus au niveau international, l'unité d'EEQ du NICD s'est engagée en 2006 dans une démarche d'accréditation vis-à-vis de la norme ISO 43-1 : 1997 sur la base du Système d'Accréditation Nationale Sud-Africaine (South African National Accreditation System /SANAS). Il est prévu que l'impact auprès des laboratoires participants au programme OMS/NICD d'EEQ soit également évalué en 2007 par un expert externe reconnu dans le domaine de l'évaluation externe de la qualité.

9 Suivi

Le suivi des laboratoires participants va de la consultation informelle nécessitant un minimum de ressources, aux évaluations officielles et aux activités de formation qui entraînent des investissements importants et l'engagement de partenaires extérieurs.

9.1 Suivi informel

Le suivi informel consiste en des consultations par courrier électronique ou par téléphone entre le CTMO et un laboratoire participant. Tout laboratoire a droit à un suivi informel s'il le demande.

9.2 Suivi officiel

Le suivi officiel consiste en une série d'activités adaptées aux besoins d'un laboratoire participant. Il peut consister en une visite du laboratoire par un membre du CTMO et d'autres experts techniques afin d'analyser la situation et/ou dispenser une formation ciblée. Une visite sur site permet d'apprécier directement l'environnement de travail et la formation des personnels technique et clinique. C'est également l'occasion de plaider en faveur d'un soutien de la part du ministère de la Santé.

9.3 Suivi sur le Web

Un suivi est également proposé à travers un Centre de ressources Internet interactif.[22] Une section dédiée a été créée pour tous les participants aux programmes régionaux OMS d'EEQ en microbiologie soutenus par le Bureau OMS de Lyon. Cette section permet :

- le téléchargement de la documentation générale sur l'EEQ
- le téléchargement de documents spécifiques pour les programmes OMS d'EEQ en microbiologie
- le téléchargement des formulaires de compte rendu à remplir
- un forum de discussion avec les autres participants.

[22] www.who.int/labresources

10 Perspectives et défis

10.1 Perspectives

Le programme OMS/NICD d'EEQ en microbiologie constitue pour les pays un outil essentiel afin qu'ils puissent remplir leur rôle national et international en matière de sécurité sanitaire.

Selon l'Annexe 1 du Règlement Sanitaire International (2005), les Etats Parties doivent être capables d'apporter un soutien à la réponse à une urgence de santé publique de portée internationale (USPPI)

> "par la mise à disposition de personnel spécialisé, l'analyse au laboratoire des prélèvements (au niveau national ou par l'intermédiaire des centres collaborateurs) et une aide logistique (équipement, fournitures et transport)."

Le programme OMS/NICD d'EEQ en microbiologie offre la garantie que telle ou telle analyse de laboratoire est d'excellente qualité. Il permet également de documenter la capacité de laboratoire au niveau national et d'orienter les actions d'amélioration. Par ailleurs, les pays prennent conscience de la nécessité d'établir des réseaux nationaux de laboratoires de district et de laboratoires régionaux (ou provinciaux) pour remplir leur mission en santé publique. Cet effort doit s'appuyer sur un développement et une évaluation permanente des laboratoires.

Le programme OMS/NICD d'EEQ en microbiologie décrit dans ce document peut être adapté par les ministères de la Santé en fonction de leurs propres besoins pour évaluer les laboratoires et les réseaux nationaux. De nombreuses ressources sont à disposition des spécialistes de laboratoire chargés de cette adaptation :

- tous les modèles et les POS présentés dans ce document peuvent être adaptés gratuitement
- les échantillons viables reçus par les laboratoires participants peuvent être repiqués et distribués à d'autres laboratoires (en accord avec les recommandations nationales et la réglementation concernant la manipulation et le transport sécurisés des échantillons)
- les matériels de formation, de référence, ou les monographies utilisés lors des ateliers organisés par l'OMS et liés à ce programme d'EEQ ou distribués via la canal de ce programme sont disponibles chez les laboratoires participants
- les matériels et les outils développés par le bureau OMS de Lyon pour les laboratoires de santé publique peuvent être consultés sur demande.[23]

10.2 Défis

Pour le programme d'EEQ en microbiologie OMS/NICD, la principale difficulté consiste à obtenir le soutien financier permanent et l'engagement politique à long terme dont dépendent trois principaux aspects du programme.

[23] oms@lyon.who.int

10.2.1 La portée du programme

Le cœur du programme, soutenu par USAID, cible les diarrhées bactériennes, la méningite et la peste. En 2005, avec le soutien du gouvernement des Pays-Bas, les EEQ de la microscopie du paludisme et de la tuberculose ont été ajoutées au programme. Il faut encore davantage de soutien pour maintenir le programme à son niveau actuel et l'étendre à d'autres maladies à potentiel épidémique ou d'autres disciplines biologiques. Il est donc nécessaire d'encourager la collaboration entre les programmes OMS spécifiques de maladies, comme le Partenariat Halte à la Tuberculose et le Programme Mondial de Lutte contre le Paludisme, dans la mesure où la qualité des services de laboratoire représente une préoccupation commune à tous ces programmes.

10.2.2 Activités de suivi pour les laboratoires qui en ont besoin

Les activités décrites au paragraphe 9 permettent d'identifier avec précision les problèmes rencontrés dans les laboratoires en difficulté et de leur proposer une aide parfaitement ciblée. Ces étapes sont essentielles pour améliorer la performance des laboratoires. Un suivi efficace nécessite un soutien financier important, notamment pour les visites sur site des laboratoires sélectionnés. Tout aussi important est l'engagement politique des autorités de santé pour mettre en œuvre les recommandations issues du suivi.

10.2.3 Principales ressources humaines et matérielles

Les performances des laboratoires participants ne dépendent pas seulement de l'expertise technique, mais aussi de leurs ressources en personnel, en fournitures et en réactifs. L'engagement politique au niveau des gouvernements et des Ministères de la Santé est indispensable pour donner aux laboratoires les ressources nécessaires qui leur permettront de remplir leur rôle essentiel en santé publique.

11 Bibliographie

Selection, use, and interpretation of proficiency testing schemes for laboratories, 1st ed. Eurachem Nederland, 2000 :1–47 (http ://www.eurachem.org/guides/ptguide2000.pdf , accédé le 8 mai 2007).

International Federation of Clinical Chemistry. *Fundamentals of External Quality Assessment (EQA). Guidelines for improving analytical quality by establishing and managing EQA schemes* (http ://www.ifcc.org accédé le 8 mai 2007).

International Laboratory Accreditation Cooperation. *Guidelines for the requirements of the competence for providers of proficiency testing schemes*; 2000 (http://www.ilac.org/documents/ILAC_G13_2000_guidelines_for_the_requirements_for_the_competence_of_providers_of_proficiency_testing_schemes.pdf accédé le 8 mai 2007).

Organisation Internationale de Normalisation et Commission Electrotechnique Internationale. *Essais d'aptitude des laboratoires par intercomparaison -- Partie 1 : Développement et opération des arrangements d'essai d'aptitude*; 1997; ISO/IEC Guide 43-1 :1–16.

Organisation Internationale de Normalisation et Commission Electrotechnique Internationale. *Essais d'aptitude des laboratoires par intercomparaison – Partie 2 : Sélection et utilisation de systèmes d'essais d'aptitude par des organismes d'accréditation de laboratoires*; 1997; ISO/IEC Guide 43-2 :1–3.

UNAIDS. *Guidelines for Organizing National External Quality Assessment Schemes for HIV Serological Testing*; 1996; UNAIDS/96.5 :1–35.

World Health Organization. *Requirements and guidance for external quality assessment schemes for health laboratories*; 1999; WHO/DIL/LAB/99.2 :1–65.

Association of Public Health Laboratories. *External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy*, 2002. (http ://www.aphl.org/programs/infectious_diseases/EQA.cfm accédé le 8 mai 2007).

ANNEXE 1

Comités d'organisation et laboratoires participants du programme OMS/NICD d'EEQ en microbiologie

1.1 Comité technique de mise en oeuvre (CTMO)

Nom	Rôle dans le Comité technique de mise en oeuvre
Dr Kerrigan McCarthy	Directeur, Département d'Evaluation Externe de la Qualité
Ms Vivian Fensham	Manager du laboratoire organisateur de l'EEQ
Pr John Frean	Directeur adjoint, NICD
Dr Anne von Gottberg	Expert technique pour la méningite
Dr Karen Keddy	Expert technique pour les diarrhées bactériennes
Ms Lorraine Arntzen	Expert technique pour la peste
Ms Leigh Dini	Expert technique pour le paludisme
Ms Linda de Gouveia	Technicienne de laboratoire, méningite
Ms Helen Haritos	Technicienne de laboratoire, Département d'EEQ

1.2 Laboratoires participants (4ème année, 2005-2006)

Pays	Laboratoire	reçoivent des spécimens de la peste	Langue*
Algérie	Faculté de Médecine d'Oran, Centre Hospitalier d'Oran, Service de Bactériologie, HAT ESSALNO no.219 Oran	Non	F
Angola	Nacional do Salude Publica, Luanda	Oui	P
Bénin	Laboratoire National de Santé Publique 01 BP 418, Cotonou	Non	F
Bénin	Centre National Hospitalier et Universitaire de COTONOU, 01 BP 386, Cotonou	Non	F
Botswana	National Public Health Reference Laboratory, Plot #5353 Ext 10, Church Road, Gaborone	Oui	A
Burkina Faso	WHO Regional Office For Africa – Multi-Disease Surveillance Centre (MDSC), Avenue Naba Zombre N :1473 -01 BP 549 Ouagadougou 01	Non	F
Burkina Faso	Laboratoire de Bactériologie, (Hôpital Yalgado Ouedraogo) CHN-YO 03, BP 022, Ouagadougou 03	Non	F
Burkina Faso	Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Hôpital Pédiatrique Charles de Gaulles, Ouagadougou	Non	F
Burkina Faso	Laboratoire National de Santé Publique, Ouagadougou	Non	F
Burundi	Laboratoire National de Référence, CHU de Bujumbura, BP 2210, Bujumbura	Non	F
Cameroun	Centre Pasteur du Cameroun, B.P. 1274 Yaoundé	Non	F
Cameroun	Laboratoire de bactériologie, Centre Pasteur du Cameroun, Garoua	Non	F

Cap Vert	Laboratorio Nacional de Referencia/ Laboratorio Hospital Agostinho Neto Praia, LP 112	Non	P
Comores	Laboratoire Hôpital EL-Maarouf B. P : 17 Moroni	Non	F
Congo	Laboratoire National de Santé Publique, Cité Louis Pasteur, Avenue du Général de Gaulle, BP 120 Brazzaville	Non	F
Côte d' Ivoire	CHU Yopougon BP 632, Abidjan 21	Non	F
Djibouti	Hôpital Général Peltier, BP 1323, Djibouti	Non	F
Djibouti	Office de Protection Sociale, Ministère du Travail, BP 21696, Djibouti	Non	F
Erythrée	National Health Laboratory, Denden Street 83, Asmara	Non	A
Ethiopie	Ethiopian Health and Nutrition Research Institute, Addis Ababa	Non	A
Ethiopie	Tikuer Anbessa Hospital, Cherchile Road, Addis Ababa	Non	A
Gabon	National Reference Laboratory, Faculté de Médecine de Libreville, University Teaching Hospital, Libreville	Non	F
Gambie	National Health Laboratories, Royal Victoria Hospital, Independence Drive, Banjul	Non	A
Ghana	Public Health and Reference Laboratory, Health Laboratory Services, Box 300, Korlebu Hospital, Accra	Non	A
Ghana	U.G.M.S. Department of Microbiology Accra	Non	A
Ghana	Laboratory Microbiology Department, Komfo ANonkye Teaching hospital (KATH), Kumasi, P.O.Box 1934	Non	A
Guinée	Laboratoire National de Santé Publique, Division de la Prévention, BP 3820, Conakry	Non	F

Guinée	Laboratoire de Bactériologie, CHU DONKA, Conakry	Non	F
Guinée-Bissau	Laboratoire National de Santé Publique, BP 50, Bissau-MINISAP, Avenue Unité Africaine	Non	P
Guinée équatoriale	INSESO Laboratory (Instituto de Seguridad Social), Hôpital de Malabo, Malabo, Bioko Island	Non	F
Kenya	National Public Health Laboratory Service, P.O. Box 20750, Nairobi	Oui	A
Kenya	Microbiology Laboratory, Department of Laboratory Medicine, Kenyatta National Hospital, Nairobi	Non	A
Lesotho	Ministry of Health and Social Welfare P.O. Box 9560, Maseru 100	Oui	A
Madagascar	Laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalier d'Antananarivo - HRJA, BP 4150, Antananarivo 101	Oui	F
Malawi	Public Health Laboratory, Community of Health Sciences, Ministry of Health, Private Bag 65, Lilongwe	Oui	A
Malawi	Microbiology laboratory, Queen Elizabeth Central Hospital, Blantyre	Oui	A
Malawi	OECH Laboratory, Malaria Research and Wellcome Trust Centre, Microbiology Laboratory, Blantyre	Non	A
Mali	Institut National de Recherche en Santé Publique, (INRSP), BP1771, Bamako	Non	F
Mauritanie	Institut National de Recherche en Santé Publique (ex CNH) BP 695, Nouakchott	Non	F
Mauritanie	Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier de Nouakchott	Non	F
Mozambique	Faculty of Medicine Eduardo Nonndlane University, Av Salvador Allende, Non 702, Maputo	Oui	P
Mozambique	Hospital Centre de Maputo, Avenida Agostinho Neto, Maputo	Non	P

Namibie	Namibia Institute of Pathology, Ooievaart Road, Windhoek	Non	A
Namibie	Namibia Institute of Pathology, Oshakati State Hospital	Oui	A
Niger	CERMES - BP 10887 Niamey	Non	F
Niger	Hôpital National, BP238 Niamey	Non	F
Nigéria	Central Public Health Laboratory, 9 Muritala Mohammed Way, Yaba, Lagos	Non	A
Ouganda	Central Public Health Lab, P.O. Box 2210, Kampala	Oui	A
Ouganda	Microbiology Department, Mulago Hospital, Kampala	Non	A
Ouganda	St Mary's Hospital, Lacor, P.O. Box 180, Gulu	Non	A
République Centrafricaine	Laboratoire National de Santé Publique Bangui	Non	F
République démocratique du Congo	Laboratoire Provincial de Lubumbashi, Avenue Likasi N° 491, Ville de Lubumbashi, Province du Katanga	Oui	F
République démocratique du Congo	Institut National de Recherche Bio-Médicales, BP 1197, Avenue de la Démocratie, Kinshasa-Gombe	Oui	F
République Unie de Tanzanie	Dept of Microbiology, Muhimbili Medical Centre, PO Box 65000, Dar es Salaam	Oui	A
République Unie de Tanzanie	Pathology laboratory, Manzi Mmojo Hospital, Stonetown, Zanzibar	Non	A
Rwanda	Laboratoire National de Référence et de Santé Publique, BP 84, Boulevard de la Révolution, Kigali	Non	F
Rwanda	Laboratoire de Bactériologie, CHU de Butare	Non	F
Rwanda	Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier de Kigali, (CHK), Kigali	Non	F

Sao Tomé & Principe	Centre Hospitalier de Tome	Non	P
Sénégal	Laboratoire de Bactériologie-Virologie, CHU Fann, BP 288, Avenue Cheick Anta Diop, Dakar	Non	F
Sénégal	Hôpital d'Enfants, Albert Royer, CHU Fann, BP 5035, Dakar	Non	F
Sénégal	Laboratoire de Bactériologie, CHU Aristide Le Dantec, Dakar	Non	F
Seychelles	National Public Health Laboratory, Ministry of Health, P.O.Box 52, Mahe	Non	A
Sierra Leone	Central Referral Laboratory, Connaught Hospital, Freetown	Non	A
Somalie	c/o WHO Representative / Somalia, Hargeiza office	Non	A
Soudan	National Health Laboratories, P.O. Box 287, Khartoum	Non	A
Swaziland	National Reference Laboratory, Mbabane Government Hospital, Mbabane	Oui	A
Tchad	Hôpital Général de Référence BP130 N'Djamena	Non	F
Togo	Institut National d'Hygiène, Ministère de La Santé, BP 1396, Lomé	Non	F
Zambie	Tropical Diseases Research Centre, 7th Floor, Ndola Central Hospital, Nkana Road, Ndola	Oui	A
Zambie	Dept of Pathology and Microbiology, University Teaching Hospital, P/B RWIX, Lusaka	Non	A
Zimbabwe	National Microbiology Reference Laboratory, Harare Central Hospital, Southerton	Oui	A

* Langue des documents fournis : A, Anglais; F, Français; P, Portuguais

1.3 Laboratoires de référence

Institut Pasteur de Bangui BP 923, Bangui République Centrafricaine
Unité du méningocoque, IMTSSA Parc du Pharo, BP 46 13998 Marseille armées France
Laboratoire de Biologie Clinique, Hôpital des Armées Laveran 13013 Marseille France
Centre National de Référence des *Yersinia,* Centre Collaborateur de l'OMS Institut Pasteur 28 rue du Dr Roux, 75724, Paris cedex 15 France
Institut Pasteur de Madagascar BP 1274, Antananarivo 101 Madagascar
Parasitology Laboratory Research Institute for Tropical Medicine Filinvest Corporate City Compound Alabang, Muntinlupa City Philippines
WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Meningococci Dept of Bacteriology, National Institute of Public Health Oslo Norvège
Microbiology Laboratory, National Health Laboratory Service New Johannesburg General Hospital Parktown, Johannesburg Afrique du Sud
C18 Microbiology Laboratory, National Health Laboratory Service Groote Schuur Hospital Observatory Cape Town, 7925 Afrique du Sud
Hospital for Tropical Diseases Department of Clinical Parasitology Mortimer Market, Capper Street, London WC1E 3BG Royaume Uni

Meningitis Laboratory, Meningitis and Vaccine Preventable Diseases Branch Division of Bacterial and Mycotic Diseases Centers for Disease Control and Prevention 1600 Clifton Road, Atlanta, GA 30333 Etats Unis d'Amérique
Epidemic Investigations and Surveillance Laboratory Foodborne and Diarrheal Diseases Branch Division of Bacterial and Mycotic Diseases Centers for Disease Control and Prevention 1600 Clifton Road, MS CO3, Atlanta GA 30333 Etats Unis d'Amérique
Diagnostic and Reference Laboratory, Bacterial Zoonoses Branch, Division of Vector-Borne Infectious Diseases Centers for Disease Control and Prevention Rampart Road, Fort Collins, CO 80521 Etats Unis d'Amérique

1.4 Comité technique consultatif (CTC)

Nom	Titre et coordonnées
Dr Bréhima Koumaré	Directeur WHO Multi-Disease Surveillance Centre Ouagadougou Burkina Faso
Dr Antoine Pierson (remplacé par Dr Sébastien Cognat en octobre 2005)	Officier médical Laboratory Strengthening Team Bureau OMS de Lyon France
Comité technique de mise en oeuvre (Voir 1.1)	NICD Johannesburg, Afrique du Sud
Dr Thomas Aisu	Conseiller sous-régional pour les laboratoires Bureau régional OMS Afrique, Great Lakes and Horn of Africa Region Kampala, Ouganda
Dr Jean-Bosco Ndihokubwayo	Conseiller régional pour les laboratoires Bureau régional OMS Afrique CSR/LAB Harare, Zimbabwe
Dr Bekithemba Mhlanga	Coordinateur du réseau PBM Bureau régional OMS Afrique VPD/LAB Harare, Zimbabwe

ANNEXE 2

Questionnaires envoyés aux laboratoires participants

2.1 Incorporation de nouvelles disciplines aux enquêtes d'EEQ (juillet 2002)

Cher collègue,
Le NHLS et le Bureau régional OMS pour l'Afrique envisagent d'étendre le programme d'EEQ à la bacilloscopie et au diagnostic du paludisme. Pourriez-vous s'il vous plaît répondre aux questions suivantes ?

1. Votre laboratoire propose-t-il des tests diagnostiques de la **tuberculose**?
   Oui ☐ Non ☐
2. Si oui, quels sont parmi les tests suivants, ceux pratiqués dans votre laboratoire?
   a. Microscopie (coloration Ziehl–Neelsen)
      Oui ☐ Non ☐
   b. Microscopie (coloration à l'auramine)
      Oui ☐ Non ☐
   c. Culture (sur gélose Lowenstein Jensen/autre milieu)
      Oui ☐ Non ☐
   d. Culture (automatisée)
      Oui ☐ Non ☐
   e. Analyse de l'antibiosensibilité (méthode des proportions)
      Oui ☐ Non ☐
   f. Analyse de l'antibiosensibilité (automatisée)
      Oui ☐ Non ☐

3. Votre laboratoire participe-t-il à un programme d'EEQ pour les disciplines suivantes?
   a. Bacilloscopie
      Oui ☐ Non ☐
   b. Culture du bacille de la tuberculose
      Oui ☐ Non ☐
   c. Antibiogramme pour la tuberculose
      Oui ☐ Non ☐

4. Si la réponse à l'une des questions ci-dessus est oui, quel est l'organisme qui vous procure le matériel d'EEQ?

5. Votre laboratoire propose-t-il des tests diagnostiques du **paludisme**?
   Oui ☐ Non ☐

6. Si oui, quels sont parmi les tests suivants, ceux pratiqués dans votre laboratoire?
    a. Microscopie sur goutte épaisse
       Oui ☐ Non ☐
    b. Microscopie sur frottis mince
       Oui ☐ Non ☐
    c. Identification des espèces paludéennes
       Oui ☐ Non ☐
    d. Quantification de la parasitémie
       Oui ☐ Non ☐
    e. Test de détection rapide des antigènes du paludisme
       Oui ☐ Non ☐

7. Votre laboratoire participe-t-il à un programme d'EEQ pour les analyses suivantes?
    a. Microscopie du paludisme
       Oui ☐ Non ☐
    b. Détection antigénique du paludisme
       Oui ☐ Non ☐

8. Si la réponse à l'une des questions ci-dessus est oui, quel est l'organisme qui vous procure le matériel d'EEQ?

9. Votre laboratoire souhaiterait-il participer à un programme d'EEQ des tests diagnostics de la tuberculose ou du paludisme?
       Oui ☐ Non ☐

Un grand merci pour l'aide que vous nous apportez en remplissant ce questionnaire

Cordialement, l'équipe d'EEQ du NHLS.

2.2 Questionnaire d'évaluation du manuel de laboratoire pour l'identification et l'antibiogramme des bactéries importantes dans le cadre de la santé publique des pays en développement (juin 2005)

Cher Collègue,

Vous trouverez ci-joint un questionnaire de six pages, destiné à évaluer le « Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World » (photo ci-dessous). Nous nous efforçons en effet de mieux connaître les laboratoires qui ont reçu ce manuel et de savoir si leur personnel l'utilise dans le cadre de son travail quotidien. Nous souhaiterions ainsi évaluer son utilité auprès des laboratoires et identifier les améliorations à apporter aux prochains ouvrages.

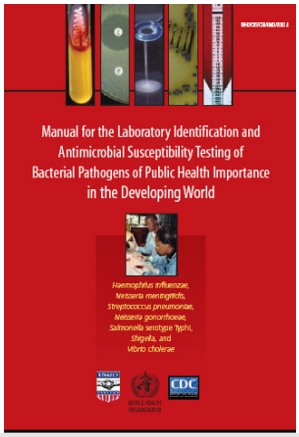
Ce questionnaire doit être de préférence rempli par une personne travaillant au minimum 30 heures par semaine dans votre laboratoire, en tant que microbiologiste ou technicien. Si vous-même ne travaillez pas à la paillasse au moins 30 heures par semaine, veuillez remettre le questionnaire à un collègue de travail remplissant cette condition.

Les avis des personnes qui travaillent dans votre laboratoire et qui utilisent ce manuel sont essentiels pour nous aider à mieux cerner les avantages et les inconvénients d'un tel ouvrage. Nous vous remercions de bien vouloir répondre très honnêtement aux questions de cette étude. Même si ce que vous avez à dire n'est pas positif – vos commentaires nous sont indispensables. Vos réponses resteront absolument confidentielles. Ainsi, lorsque nous discuterons des résultats de cette évaluation, nous ne divulguerons ni votre nom ni celui de votre laboratoire.

Nous vous sommes reconnaissants pour votre participation et les renseignements que vous pourrez nous donner.

En vous remerciant,

Heidi Brown
Carolyn Greene, MD
Centers for Disease Control and Prevention (CDC)
Atlanta, GA 30333
USA


Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World
Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae, Salmonella serotype Typhi, Shigella, and Vibrio cholerae
CDC

CE QUESTIONNAIRE DOIT ETRE REMPLI PAR UNE PERSONNE TRAVAILLANT A PLEIN TEMPS AU LABORATOIRE (30 HEURES MINIMUM PAR SEMAINE). SI CE N'EST PAS VOTRE CAS, VEUILLEZ LE REMETTRE A L'UN DE VOS COLLEGUES REMPLISSANT CETTE CONDITION, EN LUI DEMANDANT DE LE COMPLETER.
MERCI DE NOUS DONNER UN PEU DE VOTRE TEMPS.

Date : ___/___/___ (jj/mm/aa)
Votre nom et prénom :_____Age : _____
Votre fonction (microbiologiste, technicien de laboratoire…) : _____
Nom du laboratoire dans lequel vous travaillez : _____
Pays : _____

A propos de vous :

1. Pendant combien d'année(s) avez-vous suivi une formation avant de devenir laborantin/scientifique ? **(cocher une seule case)**
☐ N'a pas terminé le cycle secondaire ☐ A terminé le cycle secondaire
☐ A suivi 1 an de formation supplémentaire ☐ A suivi 2 ans de formation supplémentaire
☐ A suivi 3 ans de formation supplémentaire ☐ A suivi plus de 3 ans de formation supplémentaire
☐ Autre ? (préciser) : _____

2. Combien d'années avez-vous travaillé en tant que laborantin/scientifique ? **(cocher une seule case)**
☐ Moins d'1 an ☐ 1- 2 ans ☐ 3-5 ans ☐ Plus de 5 ans

A propos des ressources de votre laboratoire :

3. Votre laboratoire a-t-il quotidiennement accès aux ressources suivantes ?

Eau purifiée par système de filtre ou dispositif de distillation	Oui	Non	Ne sait pas
Source stable d'électricité	Oui	Non	Ne sait pas
Ordinateur	Oui	Non	Ne sait pas
Internet	Oui	Non	Ne sait pas
Accès E-mail	Oui	Non	Ne sait pas
Réfrigérateur	Oui	Non	Ne sait pas
Congélateur	Oui	Non	Ne sait pas
Autoclave	Oui	Non	Ne sait pas
Incubateur	Oui	Non	Ne sait pas
Gélose au sang fabriquée à partir de sang non humain	Oui	Non	Ne sait pas
Poudre prête à l'emploi pour la préparation de milieux sélectifs	Oui	Non	Ne sait pas
Disques antimicrobiens	Oui	Non	Ne sait pas
Tests de diffusion sur gélose (E-tests)	Oui	Non	Ne sait pas

4. Combien de personnes travaillent à la paillasse dans votre laboratoire ?
_____

5. Y a-t-il un microbiologiste de formation travaillant dans votre laboratoire ?
☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas

6. Quelles sont les sources d'informations régulièrement utilisées dans votre laboratoire ? **(cocher tout ce qui se rapporte à la question)**
☐ Manuels –> Préciser les titres et la date de publication des 2 manuels les plus fréquemment utilisés :
_____
_____
_____
_____
☐Tableaux ou guides du National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI) ou du CA-SFM (Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie)
☐ Procédures Opératoires Standardisées (POS) spécifiques à votre pays ou à votre laboratoire
☐ Méthodes de laboratoire pour le diagnostic d'une épidémie de dysenterie et de choléra
☐ Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World (photo dans la lettre)
☐ Autres manuels → Préciser le titre et la date de publication :
_____
_____
☐ Ressources Internet
☐ Autre (préciser) : _____

7. Votre laboratoire est-il considéré comme un laboratoire de ***référence*** en santé publique ? (En d'autres termes, recevez-vous des échantillons d'autres laboratoires, par exemple, pour confirmer leurs diagnostics)
☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas
(SI NON, PASSER A LA QUESTION 9)

8. Votre laboratoire fait-il fonction, dans votre pays, de laboratoire **principal** de référence pour les antibiogrammes ? ☐ Oui ☐ Non ☐Ne sait pas

A propos des pratiques de votre laboratoire

9. Parmi les structures suivantes, quelles sont celles qui envoient des échantillons à votre laboratoire ? **(cocher tout ce qui se rapporte à la question)**
a) Hôpitaux b) Dispensaires c) Médecins privés
d) Autres laboratoires e) Recherche
f) Autre (Merci de préciser où) :_____

10. De qui votre laboratoire reçoit-il le ***plus*** d'échantillons ? **(cocher une seule case)**.
a) Hôpitaux b) Dispensaires c) Médecins privés
d) Autres laboratoires e) Recherche
f) Autre (Merci de préciser où) :_____

11. Parmi les pathogènes suivants, quels sont ceux que votre laboratoire analyse ? **(cocher tout ce qui se rapporte à la question)**

a) Bactéries responsables de pneumonies et de méningites
b) Bactéries responsables d'infections sexuellement transmissibles
c) Bactéries responsables des maladies entériques constituant un réel problème de santé publique
d) Autre ? (préciser) :_____

12. Votre laboratoire réalise-t-il actuellement des antibiogrammes ?

☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas

(SI NON, PASSER A LA QUESTION 18)

13. Parmi ces différents types de tests, lesquels utilisez-vous pour étudier la sensibilité aux antimicrobiens ? **(cocher tout ce qui se rapporte à la question)**

☐ Diffusion avec disques (Kirby-Bauer)
☐ Diffusion avec disques (Méthode de Stokes)
☐ Détection de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de micro dilution en bouillon de culture
☐ E-test

14. Disposez-vous de Procédures Opératoires Standardisées (POS) écrites concernant les méthodes que vous utilisez pour tester la sensibilité aux antimicrobiens ? **(cocher une seule case)**.

☐Oui ☐Non ☐ Ne sait pas

(SI NON, PASSER A LA QUESTION 15)

Si oui, qui les a rédigées ou validées, et quand ont-elles été rédigées ?

_____
_____
_____

15. Quelles sources de critères d'interprétation utilisez-vous quand vous réalisez un antibiogramme ? **(cocher tout ce qui se rapporte à la question)**

☐ NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, USA)
☐ BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy)
☐ SFM (Société Française de Microbiologie)
☐ Autre (préciser) :
_____
☐ Pas de source

16. A qui transmettez-vous les résultats d'antibiogramme, par exemple les résultats des antibiogrammes de surveillance et de routine, ainsi que ceux de l'évaluation de la qualité. **(cocher tout ce qui se rapporte à la question)**

☐ Hôpitaux ou dispensaires
☐ Autres prestataires de soins de santé
☐ Ministère de la santé
☐ Laboratoire organisateur
☐ Equipe de recherche locale
☐ Système de surveillance national
☐ Système international de surveillance
☐ OMS (Organisation mondiale de la Santé)
☐ AFRO/NHLS EQA (National Health Laboratory Service/ External Quality Assessment) Programme
☐ Autre (préciser) : _____

17. Indiquer **approximativement** le nombre d'antibiogrammes réalisés par votre laboratoire sur les micro-organismes suivants au cours des **DOUZE DERNIERS MOIS.** Nous n'attendons pas un nombre précis ; entourer seulement ce qui vous semble être la meilleure estimation.

	Nombre d'antibiogrammes réalisés dans votre laboratoire au cours des 12 derniers mois					
Haemophilus influenzae	0	1-5	6-25	26-50	51-100	>100
Neisseria meningitidis	0	1-5	6-25	26-50	51-100	>100
Streptococcus pneumoniae	0	1-5	6-25	26-50	51-100	>100
Neisseria gonorrhoeae	0	1-5	6-25	26-50	51-100	>100
Salmonella serotype Typhi	0	1-5	6-25	26-50	51-100	>100
Shigella	0	1-5	6-25	26-50	51-100	>100
Vibrio cholerae	0	1-5	6-25	26-50	51-100	>100

18. Votre laboratoire pratique-t-il un contrôle qualité ***interne*** pour :

a) la préparation des milieux?
☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas

b) la bactériologie?
☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas

c) les antibiogrammes?
☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas

(SI NON A LA QUESTION 18c, PASSER A LA QUESTION 19)

Si votre laboratoire pratique un contrôle qualité interne des antibiogrammes, précisez comment :

_____
_____
_____

19. Votre laboratoire participe-t-il à un programme d'Evaluation Externe de la Qualité (EEQ) pour les antibiogrammes ?
☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas

(SI NON A LA QUESTION 19, PASSER A LA QUESTION 20)

Si oui, préciser quel organisme vous propose le programme d'EEQ :

_____

A propos du manuel

20. Cocher cette case si vous n'avez jamais vu le manuel en photo sur la lettre d'accompagnement : ☐

→ SI VOTRE LABORATOIRE N'A JAMAIS RECU CE MANUEL, NE REMPLISSEZ PAS LA SUITE DU QUESTIONNAIRE ET RENVOYEZ LE A : Kerrigan McCarthy

21. Combien de copies de ce manuel y a-t-il dans votre laboratoire ?_____

22. Ce manuel est-il facilement accessible à l'équipe du laboratoire ?
☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas

23. Quand avez-vous reçu ce manuel pour la première fois ? _____ (mois, année)

24. Avez-vous entendu parler de ce manuel (par exemple, par le Ministère de la santé ou par un scientifique en visite) avant ou au moment même où vous l'avez reçu ?
☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas

(SI NON, PASSER A LA QUESTION 25)

Si oui, préciser par qui vous avez entendu parler de ce manuel (cocher tout ce qui se rapporte à la question).

☐ AFRO/NHLS EQA (Nat'l Health Laboratory Service/External Quality Assessment) Programme
☐ CDC (Centers for Disease Control & Prevention)
☐ USAID (United States Agency for International Development)
☐ OMS (Organisation mondiale de la Santé)
☐ Ministère de la santé
☐ Collègue
☐ Scientifique en visite
☐ Autre (préciser) :
_____

25. Avez-vous suivi une formation sur les procédures décrites dans ce manuel quand vous l'avez reçu ?
☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas

26. Au cours des **trois premiers mois** après réception du manuel dans votre laboratoire, à quelle fréquence vous (et/ou vos collègues de laboratoire) l'avez-vous utilisé ? **(cocher une seule case)**
☐ Au moins une fois par jour ☐ Au moins une fois par semaine
☐ Au moins une fois par mois ☐ Au moins une fois tous les 3 mois
☐ Pas du tout pendant ces 3 mois

27. Au cours des **trois derniers mois**, à quelle fréquence vous (et/ou vos collègues de laboratoire) l'avez-vous utilisé ? **(cocher une seule case)**
☐ Au moins une fois par jour ☐ Au moins une fois par semaine
☐ Au moins une fois par mois ☐ Au moins une fois tous les 3 mois
☐ Pas du tout pendant ces 3 mois

28. **AVANT** de recevoir le manuel, votre laboratoire avait-il déjà réalisé des antibiogrammes ?
☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas

29. A votre avis, le ***nombre*** d'antibiogrammes réalisés dans votre laboratoire a-t-il changé après que vous ayez reçu le manuel ? **(cocher une seule case)**
☐ Oui, nous avons réalisé **plus** d'antibiogrammes après avoir reçu le manuel.
☐ Oui, nous avons réalisé **moins** d'antibiogrammes après avoir reçu le manuel.
☐ Non, le nombre d'antibiogrammes est resté le **même** après avoir reçu le manuel.

30. A votre avis, **l'exactitude** des résultats des antibiogrammes réalisés dans votre laboratoire a-t-elle changé après avoir reçu le manuel ? **(cocher une seule case).**
☐ Oui, je pense que les résultats sont devenus **plus** fiables après réception du manuel.
☐ Oui, je pense que nos résultats sont devenus **moins** fiables après réception du manuel.
☐ Non, je pense que nos résultats **n'ont pas changé** après réception du manuel.

31. Les procédures de laboratoire suivantes ont-elles changé d'une façon ou d'une autre après réception du manuel ?

Etude de l'antibiorésistance de *H. influenzae* ☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas ☐ NC*
Si oui, préciser comment :_____
Etude de l'antibiorésistance de *N. meninigitidis* ☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas ☐ NC
Si oui, préciser comment :_____
Test à l'oxacilline pour déterminer la sensibilité à la pénicilline de *S. pneumoniae* ☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas ☐ NC
Si oui, préciser comment :_____
Etude de l'antibiorésistance de *N. gonorrhoeae* ☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas ☐ NC
Si oui, préciser comment :_____
Etude de l'antibiorésistance des germes entériques ☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas ☐ NC
Si oui, préciser comment :_____
Contrôle qualité des antibiogrammes ☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas ☐ NC
Si oui, préciser comment : _____
Préparation et/ou contrôle qualité des milieux ☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas ☐ NC
Si oui, préciser comment : _____
Pratiques de sécurité dans le laboratoire ☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas ☐ NC
Si oui, préciser comment : _____

* Non concerné

32. Veuillez préciser tout autre changement observé dans votre laboratoire depuis réception du manuel ?

_____
_____
_____
_____

33. A votre avis, le ***nombre*** de graphiques (diagrammes, tableaux et photographies) dans le manuel est : **(cocher une seule case)**

☐ Insuffisant ☐ Approprié ☐ Trop important

34. Ce manuel est-il facile à comprendre en anglais ?

☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas

35. Le manuel serait-il plus facile à comprendre s'il était écrit dans une autre langue ?

☐ Oui (**préciser quelle langue)** : _____

☐ Non ☐ Ne sait pas

36. Avez-vous (ou d'autres personnes du laboratoire) utilisé l'une ou l'autre des annexes de ce manuel ?

☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas

(***SI NON, PASSER A LA QUESTION 37)***

Si oui, veuillez préciser lesquelles sont plus particulièrement utiles :

_____
_____
_____

37. Que préférez-vous dans ce manuel ?

38. Qu'aimez-vous le moins dans ce manuel ?

39. En quoi ce manuel diffère-t-il des autres sources d'informations utilisées dans votre laboratoire ?

40. Comment pourrions-nous améliorer un futur ouvrage ?

41. Y a-t-il autre chose concernant ce manuel dont vous souhaiteriez nous faire part ?

MERCI POUR VOTRE PARTICIPATION!

VEUILLEZ RETOURNER VOTRE QUESTIONNAIRE UNE FOIS REMPLI

PAR E-MAIL : Heidi Brown, HWBrown@cdc.gov

OU PAR COURRIER : Ms. Vivian Fensham,
WHO/NHLS QA Programme, National Health Laboratory Service
Watkins-Pitchford Building, P.O.Box 1038
Johannesburg 2000, South Africa

OU PAR FAX : +27 11 489 9466 (Attn : Ms. Vivian Fensham)

ANNEXE 3

Résumé des enquêtes d'évaluation et des réponses attendues pour l'EEQ de microbiologie OMS/NICD

(juillet 2002–janvier 2006)

3.1 Enquêtes d'évaluation et réponses attendues pour les diarrhées bactériennes

Numéro d'enquête	2002-1	2002-2	2003-1
Détails cliniques	Garçon de 4 ans reçu en consultation à l'hôpital local pour une diarrhée sanguinolente. Son cousin âgé de 3 ans présente les mêmes symptômes	Garçon de 3 ans souffrant de diarrhée sanguinolente et d'un syndrome urémique hémolytique (SUH)	Prélèvement rectal chez un garçon de 2 ans souffrant de diarrhée
Culture et identification	*Escherichia coli,* compte rendu des résultats de l'antibiogramme	*Shigella sp*	*Vibrio cholerae*
Sérotypage	NA	*Shigella dysenteriae* type 1	*Vibrio cholerae* sérogroupe O1
Choix des antimicrobiens	NA	Chloramphénicol, ampicilline, triméthoprime–sulphaméthoxazole, une quinolone	Triméthoprime–sulphaméthoxaole, tétracycline, chloramphénicol furazolidone, ciprofloxacine, ampicilline
Résultats de l'antibiogramme	NA	Sensible à tous les antibiotiques testés	Sensible aux 6 antibiotiques cités ci-dessus

Numéro d'enquête	2003-2	2003-3	2004-1
Détails cliniques	Germe isolé à partir d'une hémoculture chez un enfant présentant de la fièvre et envoyé au laboratoire pour confirmation du germe identifié	Cuisinier dans un grand restaurant, en ville, souffrant d'une diarrhée sans gravité. Un échantillon de selles est envoyé au laboratoire	Homme de 33 ans souffrant de dysenterie
Culture et identification	*Salmonella* sérotype Typhi	*Vibrio cholerae*, avec flore normale (+/- *Citrobacter freundii)*	*Shigella sp.*
Sérotypage	Antigène Vi et/ou O : 9 et H : positif pour l'antigène d	Sérogroupe 01, Ogawa	*Shigella flexneri*
Choix des antimicrobiens	Ampicilline, ciprofloxacine, chloramphénicol, triméthoprime–sulphaméthoxazole, ceftriaxone/ céfotaxime	chloramphénicol, triméthoprime–sulphaméthoxazole, furazolidone, tétracycline, acide nalidixique, ciprofloxacine	Ampicilline, chloramphénicol, triméthoprime–sulphaméthoxazole, acide nalidixique, ciprofloxacine
Résultats de l'antibiogramme	Sensible à tous les antibiotiques testés	Sensible à tous les antibiotiques testés sauf au triméthoprime–sulphaméthoxazole	Résistant à l'ampicilline et à la triméthoprime–sulphaméthoxazole; sensible au chloramphénicol, à l'acide nalidixique, à la ciprofloxacine

Numéro d'enquête	2004-2A	2004-3A	2005-1A
Détails cliniques	Enfant de 12 mois, hospitalisé pour dysenterie	Femme de 28 ans souffrant de dysenterie (présence de sang dans les selles) et de fièvre	Bébé de 6 mois souffrant de diarrhées et de vomissements
Culture et identification	*Salmonella sp.*	*Escherichia coli,* souche considérée diarrhéogène	'Flore normale' ou 'germes non pathogènes isolés' ou 'souche non pathogène d'*E coli* isolée
Sérotypage	*Salmonella enterica* sous-espèce enterica, sérovar Isangi ou *Salmonella enterica* O : 6,7; H : d, 1,5	O157 :H7 ou O157	NA
Choix des antimicrobiens	Amoxicilline-clavulanate, céphalosporine de 3ème génération (pour recherche de BLSE), ciprofloxacine/autres	Des études ont montré qu'une antibiothérapie pouvait aggraver l'évolution de la maladie (antibiogramme	NA

	FQ et tétracycline, cotrimoxazole, chloramphénicol	facultatif)	
Résultats de l'antibiogramme	Production de ESBL ; sensible au fluoroquinolones ; résistant à tous les autres antibiotiques qui pourraient être préconisés pour traiter cette infection	Des études ont montré qu'une antibiothérapie pouvait aggraver l'évolution de la maladie (antibiogramme facultatif)	NA
Numéro d'enquête	**2004-2B**	**2004-3B**	**2005-1B**
Détails cliniques	Infirmière souffrant de diarrhées	Enfant de 2 ans souffrant de diarrhée	Femme de 22 ans souffrant de fortes diarrhées et d'une déshydratation
Culture et identification	*Vibrio cholerae*	*Shigella sp.*	*Vibrio cholerae*
Sérotypage	Sérogroupe O1 ou sérogroupe O1, sérotype Ogawa	*Shigella sonnei*	Sérogoupe O1 sérotype Inaba, ou Sérogroupe O1
Choix des antimicrobiens	tétracycline, furazolidone, triméthoprime–sulphaméthoxazole, chloramphénicol, acide nalidixique, ciprofloxacine, testés contre *Vibrio cholerae*	acide nalidixique, triméthoprime–sulphaméthoxazole, chloramphénicol, ciprofloxacine, tétracycline, ampicilline, céphalosporine de 3^{ième} génération	tétracycline, furazolidone, triméthoprime–sulphaméthoxazole, chloramphénicol, acide nalidixique, ciprofloxacine
Résultats de l'antibiogramme	Sensible à la tétracycline, au chloramphénicol, à l'acide nalidixique, à la ciprofloxacine; résistant à la triméthoprime–sulphaméthoxazole	Sensible à la tétracycline, au chloramphénicol, à l'acide nalidixique, à la ciprofloxacine, à l'ampicilline; résistant à la triméthoprime–sulphaméthoxazole	Sensible à tous les antibiotiques ci-dessus

Numéro d'enquête	2005 2A	2005 3A	2006 1A
Détails cliniques	Selles d'un enfant de 5 ans présentant une forte fièvre et une diarrhée modérée	Diarrhée sanglante chez un homme de 30 ans	Homme de 25 ans avec diarrhée
Culture et identification	Espèce *Salmonella*	*Shigella* sp.	*Aeromonas hydrophila*
Sérotypage	*Salmonella* Paratyphi C (Vi +ve/ Vi -ve)	*Shigella dysenteriae* type 2	Non applicable
Choix des antimicrobiens	Ampicilline, Amoxicilline-clavulanate, céphalosporine de 3ème génération, ciprofloxacine / acide nalidixique, cotrimoxazole, chloramphénicol et tétracycline	acide nalidixique, trimethoprime-sulphamethoxazole, ampicilline, ciprofloxacine, chloramphénicol	Ampicilline, Amoxicilline-clavulanate, céphalosporine de 3ème génération , ciprofloxacine / acide nalidixique, cotrimoxazole, chloramphénicol et tétracycline
Résultats de l'antibiogramme	Sensible à tous les antibiotiques testés +/- BLSE négative	Sensible à tous les antibiotiques testés	Résistant à ampicilline, sensible aux autres antibiotiques
Numéro d'enquête	**2005 2B**	**2005 3B**	**2006 1B**
Détails cliniques	Enfant de 3 ans ayant développé une diarrhée pendant une épidémie de gastro-entérite lors d'un séjour dans un service d'hospitalisation de jour	Patient souffrant de diarrhée avec déshydratation sévère dans un camp de réfugiés	Selles émises par un professionnel de santé dans le cadre d'un dépistage pour la surveillance des infections nosocomiales dans une Unité de Soins Intensifs
Culture et identification	*Shigella* sp.	*Vibrio cholerae*	*Salmonella* sp.
Sérotypage	*Shigella boydii*	*Vibrio cholerae* serogroup O1 serotype Ogawa	*Salmonella enterica* subspecies enterica serotype Muenchen
Choix des antimicrobiens	Ampicilline, cotrimoxazole, chloramphénicol, acide nalidixique / ciprofloxacine	Acide nalidixique, trimethoprime-sulphamethoxazole, furazolidone, ciprofloxacine, tétracycline	Ampicilline, Amoxicilline-clavulanate, céphalosporine de 3ème génération, ciprofloxacine / acide nalidixique, cotrimoxazole, chloramphénicol et tetracycline
Résultats de l'antibiogramme	Sensible à tous les antibiotiques testés	Sensible à tous les antibiotiques testés	Sensible à tous les antibiotiques testés

NA, Non applicable; BLSE, beta-lactamase à spectre étendu

Commentaires sur les enquêtes d'évaluation pour les diarrhées bactériennes :

Les germes choisis pour les enquêtes d'évaluation portant sur les diarrhées bactériennes représentent des pathogènes importants en santé publique. Le premier microorganisme, une souche commensale d'*Escherichia coli,* a été sélectionné d'une part, pour vérifier si les systèmes de courrier express et de transport étaient capables de livrer des pathogènes viables, d'autre part, pour tester la capacité des laboratoires à identifier une bactérie non-pathogène fréquemment isolée. Les détails cliniques et la présentation des échantillons ont été ensuite compliqués. Pour toutes les enquêtes, il s'agissait d'échantillons de selles simulés (préparés à partir d'une purée de lentilles stérilisée, inoculée avec le pathogène).

Les échantillons simulés des enquêtes 2002-2, 2003-1 et 2003-2 contenaient un seul microorganisme, tandis que l'enquête 2003-3 en contenait deux, dont un seul pathogène (*Vibrio cholerae*). Le nombre d'échantillons est passé à deux, dès la troisième année du programme. Comme un CQ interne indiquait que la viabilité de *Vibrio cholerae* était limitée, ce microorganisme a été conservé sur gélose semi-solide lors de l'enquête 2005-1. Une souche *E. coli* entérohémorragique O157 :H7 a elle aussi été proposée lors d'une enquête, compte tenu du fait qu'il s'agit d'un pathogène émergent sur le continent africain. Un échantillon simulé de selles contenant uniquement une flore normale a été ajouté à l'enquête 2005-1 afin de changer des enquêtes habituelles. Au cours de l'année 4, des espèces de *Salmonella* et de *Shigella* ont été inclues 2 fois, *Vibrio cholerae* une fois, et *Aeromonas sp.* une fois.

3.2 Enquêtes d'évaluation pour la méningite et réponses attendues

Numéro d'enquête	2002-1	2002-2	2003-1
Détails cliniques	**B.** Homme de 22 ans présentant les symptômes d'une méningite. A l'examen, il apparaît émacié et souffre d'une lymphadénopathie généralisée **C.** Fillette de 2 ans arrivée à l'hôpital avec une raideur de la nuque. C'est sa tante qui l'a amenée et elle ne connaît pas les vaccinations que l'enfant a reçues	Fillette de 2 ans examinée dans le dispensaire d'une région reculée. Pas plus de renseignements cliniques. L''infirmière de soins primaires a inoculé un milieu TI et fait un frottis avec le LCR	Garçon de 4 ans souffrant de vomissements et de léthargie. Le médecin qui a examiné l'enfant pendant le week-end a inoculé un milieu TI, fait un frottis avec le LCR de l'enfant et envoyé le tout au laboratoire d'analyses
Microscopie	**B.** Diplocoques Gram-positifs, présomption de *Streptococcus pneumoniae* Diplocoques Gram-négatif, présomption de *Neisseria meningitidis*	Neutrophiles et coccobacilles Gram-négatif suggérant un *Haemophilus influenzae*	Coques Gram-positif en chaînettes suggérant une espèce de streptocoque
Culture et identification	NA	*Haemophilus influenzae*	Streptocoques du groupe B, (*Streptococcus agalactiae*)
Sérotypage	NA	*Haemophilus influenzae* type b	NA
Choix des antimicrobiens	NA	Ampicilline et/ou test β-lactamase, chloramphénicol, ceftriaxone/céfotaxime	Antibiogramme facultatif, la pénicilline est l'antibiotique de choix
Résultats de l'antibiogramme	NA	Test β-lactamase positif, résistance à l'ampicilline, au chloramphénicol; sensibilité à la ceftriaxone /céfotaxime	Sensible à la pénicilline et à l'ampicilline

Numéro d'enquête	2003-2	2003-3	2004-1
Détails cliniques	Jeune femme de 20 ans se présentant au dispensaire avec une forte migraine. Elle a été transférée sur l'hôpital régional où elle a subi une ponction lombaire. Un frottis LCR et un milieu TI inoculé avec le LCR ont été envoyés à votre laboratoire	Femme de 34 ans, séropositive pour le VIH, souffre de toux et de confusion mentale. Un examen cytologique du LCR indique 1250 neutrophiles/mm^3 et 108 lymphocytes/mm^3. Un frottis LCR non coloré et un milieu TI inoculé avec le LCR sont envoyés au laboratoire pour analyses complémentaires	Le formulaire envoyé avec le frottis LCR et le milieu TI inoculé avec le LCR précise : " âge inconnu, patient de sexe masculin incapable de donner ses antécédents médicaux". Le laboratoire ne pratiquait ni la microscopie ni les analyses biochimiques
Microscopie	Diplocoques Gram-négatif	Diplocoques Gram-positif	Diplocoques Gram-positif
Culture et identification	*Neisseria meningitidis*	*Streptococcus pneumoniae*	*Streptococcus pneumoniae*
Sérotypage	W135	23F	NA
Choix des antimicrobiens	Pénicilline, amoxicilline, rifampicine, triméthoprime-sulphaméthoxazole, chloramphénicol, et une céphalosporine de $3^{ième}$ génération et/ou test β-lactamase	Pénicilline, céfotaxime/ceftriaxone, triméthoprime–sulphaméthoxazole, chloramphénicol, rifampicine, tétracycline	Pénicilline, ceftriaxone/céfotaxime CMI/E-test
Résultats de l'antibiogramme	Résultat du E-test pour les antibiotiques ci-dessus, et/ou β-lactamase négatif	Résistant à la pénicilline d'après la CMI; CMI intermédiaire avec la ceftriaxone; résistant au triméthoprime–sulphaméthoxazole, au chloramphénicol, à la tétracycline; sensible à la rifampicine	Résistant à la pénicilline; CMI intermédiaire avec la ceftriaxone

Numéro d'enquête	2004-2C et D	2004-3C	2005-1C
Détails cliniques	Isolat identifié dans un laboratoire d'une région reculée. Il s'agit de *Neisseria meningitidis*. L'isolat a été envoyé au laboratoire pour sérotypage	LCR d'un garçon de 3 ans souffrant d'une méningite	Homme de 30 ans, atteint de SIDA, souffrant de migraine, de vomissements et de fièvre
Microscopie	NA	Coccobacilles Gram-négatif ou bâtonnets pléomorphes	Levures
Culture et identification	NA	*Haemophilus influenzae*	*Cryptococcus neoformans* ou *Cryptococcus* sp.
Sérotypage	**2C** - *Neisseria meningitidis* sérogroupe A **2D** - *Neisseria meningitidis* sérogroupe W135	Autoagglutination (Non-typable par PCR)	NA
Choix des antimicrobiens		Ampicilline, céphalosporine de 3ième génération, chloramphénicol +/- test β-lactamase	NA
Résultats de l'antibiogramme		Sensibilité à l'ampicilline, à la ceftriaxone, au chloramphénicol; β-lactamase negative	NA

Numéro d'enquête	2004-2F	2004-3D	2005-1D
Détails cliniques	L'isolat a été identifié dans un laboratoire d'une région reculée. Il s'agit d'un *Streptococcus pneumoniae*. L'échantillon a été envoyé à notre laboratoire pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens	LCR d'un adulte souffrant de méningite	Soldat de dix-huit ans souffrant de migraine, d'une raideur du cou et d'une éruption pétéchiale
Microscopie	NA	Coccobacilles Gram-positif / bacilles courts / bacilles	Diplocoques Gram-négatif
Culture et identification	NA	*Listeria monocytogenes*	*Neisseria meningitidis*
Sérotypage	NA	NA	Sérogroupe B
Méthode/choix des antimicrobiens	Acceptable, selon la procédure du NCCLS/SFM/BSAC	Cotrimoxazole, ampicilline, gentamicine	Pénicilline/ampicilline/oxacilline, ciprofloxacine/ofloxacine, sulphonamide, rifampicine, chloramphénicol, +/- céphalosporines de 3ième génération, +/-β-lactamase
Résultats de l'antibiogramme	Oxacilline : diamètre de la zone < 20mm (NCCLS/BSAC) ou < 26mm (SFM); pénicilline : CMI/E-test réalisé ou référé, résultat = 2 µg/ml (étendue 1–4 µg/ml); interprétation = forte résistance à la pénicilline	Sensible à l'ampicilline, à la gentamicine et au cotrimoxazole	Norme mentionnée (CLSI(NCCLS)/SFM/BSAC) et méthodologies respectives correctement suivies. Pénicilline: CMI = 0.047 µg/ml (sensible), sulphonamide : CMI = 4 µg/ml (résistant), rifampicine CMI = 0.094µg/ml (sensible), ciprofloxacine, CMI = 0.002µg/ml (sensible), disque oxacilline : sensible (SFM seulement)

Numéro d'enquête	2005 2C	2005 3C	2006 1C
Détails cliniques	Un nouveau-né de 18 mois présentant de la fièvre et des convulsions généralisées. Le LCR était clair sans cellules ; glucorachie et protéinorachie normales.	Fièvre et raideur méningée chez un nouveau-né de 8 mois.	Un enfant de 9 mois est admis pour léthargie et vomissements.
Microscopie	Aucun organisme observé	Cocco-bacilles Gram-negatif	Diplocoque Gram-positif
Culture et identification	*Streptococcus viridans* avec un commentaire au clinicien	*Haemophilus influenzae*	*Streptococcus pneumoniae*
Sérotypage	N/A	*Haemophilus influenzae* sérotype c	N/A
Choix des antimicrobiens	Non évalué	Ampicilline, Amoxicilline-clavulanate, ceftriaxone, chloramphénicol,	Penicilline (CMI), ceftriaxone/cefotaxime (CMI), oxacilline (disque), chloramphénicol, vancomycine
Résultats de l'antibiogramme	Non évalué	La norme utilisée est mentionnée, la méthodologie correcte, les resultats corrects (sensible à tous les antibiotiques testés)	La norme utilisée est mentionnée, la méthodologie correcte, résistant à la pénicilline, céfotaxime, sensible au chloramphénicol, vancomycine
Numéro d'enquête	**2005 2D**	**2005 3D**	**2006 1D**
Détails cliniques	Une fille de 2 ans avec un pic fébrile, céphalées et raideur de la nuque	Un enfant de 9 ans fébrile et inconscient	Un enfant de 18 mois présentant une perte de conscience et de la fièvre.
Microscopie	diplocoques Gram-positif / cocci gram-positif +/- polynucléaires neutrophiles	diplocoques/ cocci Gram-negatif	Coccobacilles Gram-négatif
Culture et identification	*Streptococcus pneumoniae*	*Neisseria meningitidis*	*Haemophilus influenzae*
Sérotypage	N/A	Sérogroup C	*Haemophilus influenzae* sérotype f
Résultats de l'antibiogramme	sensible à tous les antibiotiques testés, oxacilline S ou CMI pénicillines dans la zone sensible	La norme utilisée est mentionnée, la méthodologie correcte, les resultats corrects (sensible à tous les antibiotiques testés)	La norme utilisée est mentionnée, la méthodologie correcte, recherche de β-lactamase positive, résistant à ampicilline, sensible aux autres molécules testées

CMI, concentration minimale inhibitrice; LCR, liquide céphalorachidien; TI, milieu trans-isolate; NA, Non applicable; NCCLS, national committee for clinical laboratory standards; BSAC, British Society for Antimicrobial Chemotherapy; SFM, Société Française de Microbiologie; CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute

Commentaires sur les enquêtes d'évaluation pour la méningite :

Les germes choisis dans le cadre des enquêtes d'évaluation pour la méningite représentent des pathogènes importants en santé publique. Lors de la première enquête, il s'agissait de deux frottis simulés de LCR. Par la suite, chaque enquête comportait un frottis de LCR et un milieu TI inoculé avec le pathogène. Le milieu TI est un milieu biphasique qui peut être inoculé avec le LCR directement au chevet du patient. Il permet la croissance d'un certain nombre de pathogènes courants, responsables des méningites. Ce milieu est particulièrement utile quand le transport de l'échantillon de LCR au laboratoire exige un certain délai. C'est pourquoi plusieurs laboratoires participants l'utilisent sur le terrain. Les résultats obtenus avec ce milieu ont toujours été satisfaisants, exception faite de l'enquête 2003-3, quand le contrôle de qualité du laboratoire a montré que la croissance de *Streptococcus pneumoniae* diminuait 18 jours après l'inoculation. Etant donné qu'un grand nombre de laboratoires (17/38, 45%) n'avait pas réussi à cultiver ce germe, l'évaluation des réponses en a tenu compte.

L'enquête 2003-3 ayant mis en évidence des problèmes concernant les antibiogrammes avec les pneumocoques, l'enquête suivante contenait deux souches identifiées de pneumocoques sur lesquelles les laboratoires devaient réaliser uniquement des antibiogrammes. Une souche non typable d'*Haemophilus influenzae* qui s'auto-agglutinait dans du sérum physiologique avait également été incorporée à l'enquête pour souligner l'importance des contrôles négatifs. *Cryptococcus neoformans* et *Listeria monocytogenes* ont été introduits dans les enquêtes 2004-3D et 2005-1C pour tester la capacité des laboratoires à identifier des pathogènes peu fréquents associés à une co-infection VIH.
Lors de la quatrième année, les organismes suivants ont été inclus : *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* (2 fois), *Haemophilus influenzae* (2 fois), et un streptocoque viridans, inclus pour simuler un LCR contaminé et tester les réponses des laboratoires à un tel scénario.

3.3 Enquêtes d'évaluation pour la peste et réponses attendues

Numéro d'enquête	2002-1	2002-2	2003-1
Détails cliniques	Voyageur, récemment rentré d'Inde, ayant développé une forte fièvre. L'examen clinique indiquait une lymphadénopathie inguinale	Echantillons de sérum 1 et 2 collectés lors des opérations de surveillance de la peste sur le terrain	Ponction ganglionnaire chez un habitant d'une région rurale de Zambie qui souffrait de fièvre et d'une lymphadénopathie inguinale douloureuse. Une fois le diagnostic clinique de peste bubonique établi, un traitement antibiotique a été prescrit avant même de prélever l'échantillon pour confirmation par le laboratoire
Microscopie	Coloration bipolaire, présomptive de *Yersinia pestis*	NA	NA
Sérologie	NA	Echantillon de sérum1 : Positif Echantillon de sérum 2 : Négatif	Positif pour l'antigène F1

Numéro d'enquête	2003-2	2003-3	2004-1
Détails cliniques	Ponction ganglionnaire chez un habitant d'une région rurale de Zambie qui souffrait de fièvre et d'une lymphadénopathie inguinale douloureuse. Une fois le diagnostic clinique de peste bubonique établi, un traitement antibiotique a été prescrit avant même de prélever l'échantillon pour confirmation par le laboratoire	Isolat provenant d'un patient souffrant de septicémie, vivant dans une région endémique pour la peste	Isolat provenant d'un patient souffrant de septicémie, vivant dans une région endémique pour la peste
Microscopie	NA	NA	NA
Culture et identification	NA	*Yersinia enterocolitica*	*Klebsiella pneumoniae*
Sérologie	Positif pour l'antigène F1	NA	NA

Numéro d'enquête	2004-2G & 2004-2H	2004-3E	2005-1E
Détails cliniques	Ponctions ganglionnaires chez deux membres d'une même famille vivant en milieu rural qui présentaient de la fièvre et une lymphadénopathie. La peste bubonique ayant été suspectée à l'examen clinique, les patients ont reçu un traitement antibiotique avant même le prélèvement des échantillons pour confirmation	Voyageur, récemment rentré d'Inde, ayant développé une forte fièvre. L'examen clinique indiquait une lymphadénopathie inguinale	Ce voyageur présentait les symptômes cliniques d'une septicémie et ce microorganisme a été isolé à partir d'une hémoculture
Microscopie	NA	Bacilles/coccobacilles Gram-négatif /avec ou sans coloration bipolaire, présomptive de *Yersinia pestis*	NA
Culture et identification	NA	NA	*Yersinia enterocolitica*
Sérologie	2G – Positif pour l'antigène F1 2H – Négatif pour l'antigène F1	NA	NA

Numéro d'enquête	2005-1F
Détails cliniques	Organisme isolé chez un rongeur dans le cadre des opérations de surveillance de la peste
Microscopie	NA
Culture et identification	*Pasteurella multocida*
Sérologie	NA

Numéro d'enquête	2005 2E	2005 3E	2006 1E
Détails cliniques	NA	Adulte de sexe masculin, avec fièvre et gonflement inguinal	Un randonneur de retour d'Ouganda présentant une septicémie.
Microscopie	NA	NA	Bacille bipolaire Gram-negatif, presomptif de *Yersinia pestis*
Culture et identification	*Pasteurella multocida*	NA	NA
Sérologie	NA	Antigène F1 négatif	NA

Numéro d'enquête	2005 2F	2005 3F	2006 1F
Détails cliniques	NA	Un voyageur récemment retourné d'Inde développe un syndrome fébrile	Un habitant de Namibie présentant une fièvre inexpliquée.
Microscopie	NA	NA	Bacille bipolaire Gram-negatif, presomptif de *Yersinia pestis*
Culture et identification	*Klebsiella pneumoniae*	NA	NA
Sérologie	NA	Antigène F1 négatif	NA

NA, non applicable

Commentaires sur les enquêtes d'évaluation pour la peste :

Les germes ont été choisis en fonction des tests diagnostics supposés disponibles dans les laboratoires régionaux de la région OMS Afrique. Selon les règlements du transport aérien, le transport de *Yersinia pestis* est difficile. Ce microorganisme ne peut donc être inclus dans les enquêtes. Par conséquent, l'EEQ a porté initialement sur de simples procédés de coloration, de culture et d'identification à partir de frottis et d'une culture de *Yersinia enterocolitica*. Des bandelettes de diagnostic rapide par détection de l'antigène F1, actuellement fabriquées à Madagascar par l'Institut Pasteur, ont été distribuées aux laboratoires participants via le service courrier de l'EEQ. Un échantillon simulé (ponction ganglionnaire) a été incorporé aux enquêtes suivantes pour évaluer dans le temps la performance des laboratoires avec le test rapide.

Par la suite, le matériel d'enquête a comporté des lames de *Yersinia pestis* que les laboratoires devaient colorer et commenter ensuite pour la présence de bacilles à coloration bipolaire. Des microorganismes aux caractéristiques biochimiques identiques à celles de *Yersinia pestis* ont été incorporés aux enquêtes. Il s'agissait de *Pasteurella multocida, Yersinia enterocolitica* et *Klebsiella pneumoniae*.

Des lames pour coloration ont été proposées au cours de la quatrième année (deux fois), ainsi que des bandelettes de détection rapide de l'antigène F1(deux fois), et des microorganismes pour diagnostic différentiel de *Yersinia pestis* (*Pasteurella multocida, Klebsiella pneumoniae*)

3.4 Enquêtes d'évaluation de la microscopie du paludisme et réponses attendues

Huit échantillons ont été inclus dans chaque enquête : frottis minces et/ou gouttes épaisses colorés au Giemsa. Il a été demandé aux laboratoires d'identifier l'espèce parasitaire présente, et de quantifier la parasitémie si nécessaire.

Numéro de l'échantillon	2005 3	2006 1
M1	Non évalué	*Plasmodium falciparum*
M2	Aucun parasite observé	*Plasmodium falciparum*
M3	*Plasmodium falciparum*	*Plasmodium ovale*
M4	*Plasmodium falciparum*	*Plasmodium falciparum*
M5	*Plasmodium falciparum*	*Plasmodium falciparum*
M6	Aucun parasite observé	Aucun parasite observé
M7	Non proposé	*Trypanosoma brucei* sp
M8	Non proposé	*P. falciparum*

Commentaire sur les enquêtes paludisme :

Le nombre d'échantillons par étude a été par la suite augmenté à 10. Chaque échantillon a consisté en un frottis mince et une goutte épaisse colorées au Giemsa. La précision et l'exactitude de la mesure de la parasitémie ont également été évaluées.

3.5 Enquêtes d'évaluation de la bacilloscopie et réponses attendues

Quatre lames colorées ont été proposées, accompagnées de quatre lames non colorées. Il a été demandé aux laboratoires participants de colorer les lames non colorées en utilisant le colorant de leur choix (Ziehl-Neelsen ou Auramine-O) pour la recherche de bacilles acido-alcoolo résistants (BAAR). Seules 7 lames ont été soumises lors de la première enquête, et 8 lors de la seconde. Il a été demandé aux laboratoires de coder la présence de BAAR selon le système de notation de l'Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires (IUATLD).

Numéro d'enquête	2005 3 (notation IUATLD)	2006 1 (notation IUATLD)
T1	Négatif	Négatif
T2	2+	2+
T3	2+	1+
T4	Négatif	2+
T5	2+	2+
T6	Négatif	1+
T7	Négatif	2+
T8	Non incluse	Négatif

ANNEXE 4

Procédures opératoires standardisées

Annexe 4A : procédures opératoires standardisées pour l'EEQ de la bactériologie

Annexe 4B : procédures opératoires standardisées pour l'EEQ de la bacilloscopie

Annexe 4C : Procédures opératoires standardisées pour l'EEQ de la microscopie du paludisme

Annexe 4A
Procédures opératoires standardisées pour l'EEQ de la bactériologie

Numéro de POS	Titre	Page
OMS 0001	Isolat incorporé aux enquêtes du programme d'EEQ OMS/NICD	87
OMS 0002	Contrôle qualité inter-laboratoires des frottis préparés pour le programme d'EEQ OMS/NICD	89
OMS 0003	Echantillon entérique simulé en milieu Cary-Blair	91
OMS 0004	Pathogène méningé en milieu de transport Trans-Isolate (TI)	95
OMS 0005	Echantillons lyophilisés	101
OMS 0006	Emballage des échantillons d'EEQ	106
OMS 0007	Frottis simulés de liquide céphalorachidien (LCR)	108
OMS 0008	Traitement des résultats de l'EEQ OMS/NICD	112
OMS 0009	Peste : coloration bipolaire des bacilles sur frottis sanguin	114
OMS 0010	Peste : Sérum positif pour les anticorps anti-F1	116
OMS 0011	Frottis simulé de crachat (avec présence ou non de bactéries pathogènes)	118

Procédure OMS 0001	**ISOLAT INCORPORE AUX ENQUETES DU PROGRAMME D'EEQ OMS/NICD**	
Préparée par	**Date d'adoption**	**Signature**
Vivian Fensham/ Anne von Gottberg		

Date de révision	**Signature à la révision**	**Date de relecture**	**Signature à la relecture**

Distribué à	**Nombre de copies**	**Distribué à**	**Nombre de copies**
Lab. de microbiologie organisateur de l'EEQ.	1		

Date de repiquage de l'isolat :	**Numéro de l'enquête à laquelle est destiné l'isolat :**
Laboratoire soumettant l'isolat :	**Analysé par :**

Identification documentée de l'isolat :_____
Origine de l'isolat : _____
Numéro/s du laboratoire : _____
Date de réception : _____
Mode de conservation : _____

Identification (principales réactions : catalase, oxydase, etc. jusqu'aux tests de différenciation) :
Coloration de Gram :_____
Morphologie microscopique :_____

Test	**Résultat**	**Test**	**Résultat**

Code API (étiquette attachée) : _____

Sérotypage :

Réactif utilisé (lot) :	
Réaction :	**Commentaire concernant la qualité de la réaction :**

Antibiogramme (diffusion en disque & CMI; veuillez préciser s'il s'agit d'un E-test, d'une dilution en milieu gélosé ou d'une autre méthode) :

Nom de l'isolat	Taille de la zone (mm)	S/I/R (disque)	CMI (mg/l)	S/I/R (CMI)

Résultats de l'isolat testé dans la gamme des valeurs attendues et enregistrées :

O ☐ /N ☐

β-lactamase testée : O ☐ /N ☐ **β-lactamase positive : O ☐ /N ☐**

Autres tests ou remarques :

Date : **Signature :**

Procédure OMS 0002	**CONTROLE QUALITE INTER-LABORATOIRE DES FROTTIS PREPARES POUR LE PROGRAMME D'EEQ OMS/NICD**

Préparée par	**Date d'adoption**	**Signature**
Vivian Fensham/ Anne von Gottberg		

Date de révision	**Signature à la révision**	**Date de relecture**	**Signature à la relecture**

Distribué à	**Nombre de copies**	**Distribué à**	**Nombre de copies**
Lab. de microbiologie organisateur de l'EEQ.	1		

Contrôle de qualité des lames de l'enquête numéro : _____

Lames préparées le : _____

Soumises à : _____

Date d'envoi : _____

Veuillez noter que les frottis de LCR sont fixés à la chaleur, mais non colorés.
Veuillez noter que les frottis réservés à la bacilloscopie sont fixés à la chaleur; une lame est déjà colorée et l'autre prête à être colorée par le laboratoire avec ses propres techniques.

Renseignements donnés aux participants (uniquement s'il s'agit de frottis de LCR) :

Echantillon	Origine	Détails cliniques	Instructions

Veuillez commenter la qualité de la lame :

Qualité du frottis :
Caractéristiques des polynucléaires neutrophiles :
Caractéristiques des cellules épithéliales :
Caractéristiques des bactéries :
Autres commentaires :

Nom :_____

Date :_____

Procédure OMS 0003	**ECHANTILLON ENTERIQUE SIMULE EN MILIEU CARY–BLAIR**		
Préparée par	**Date d'adoption**	**Signature**	
Vivian Fensham/ Anne von Gottberg			

Date de révision	**Signature à la révision**	**Date de relecture**	**Signature à la relecture**

Distribué à	**Nombre de copies**	**Distribué à**	**Nombre de copies**
Lab. de microbiologie organisateur de l'EEQ	1		

Objet :

Préparer un échantillon de selles simulé en mélangeant des lentilles avec un pathogène (e.g. *Shigella dysenteriae* type 2) en milieu de transport Cary–Blair.

Choix du pathogène :

Les isolats peuvent être choisis à partir de souches cliniques conservées ou de souches de collection – on choisit des isolats spécifiques qui mettent en évidence différents aspects de l'identification, du sérotypage/groupage ou de l'antibiogramme :

1. Décision du Comité Technique de Mise en Œuvre (CTMO)
2. Soumission par un laboratoire spécialisé d'un isolat (identifié par un numéro de souche de collection ou de laboratoire, sa date de réception au laboratoire de référence) accompagné d'une fiche de paillasse (voir POS OMS0001) confirmant son identification, son sérotypage/groupage et son antibiogramme (selon le cas, recherche de β-lactamase, diffusion en disque, CMI)
3. Contrôle qualité indépendant réalisé dans le laboratoire organisateur de l'EEQ – tout résultat divergent sera soumis pour vérification à un laboratoire spécialisé (si possible un laboratoire clinique indépendant : Laboratoire de Lutte contre les Infections/ Laboratoire de Microbiologie, Johannesburg General Hospital et/ou Laboratoire de Microbiologie, Chris Hani Baragwanath Hospital, Cape Town).

Préparation des lentilles :

1. **Jour 1 :** faire bouillir les lentilles et les mixer (ceci peut être fait chez soi).
2. **Jour 2 :** amener cette purée de lentille au laboratoire pour l'autoclaver. A l'aide d'une spatule passée à la flamme, peser 42g de cette préparation dans un bécher préalablement autoclavé. Préparer ainsi 5 béchers. Si le mélange est trop sec, ajouter de l'eau stérile avant autoclavage. Recouvrir les béchers de papier d'aluminium et autoclaver pendant 15 minutes. Une fois refroidie, cette

préparation de lentilles toujours recouverte de son papier d'aluminium peut être conservée au réfrigérateur.
3. Chaque bécher contient suffisamment de matériel pour ensemencer environ 35 flacons de milieu Cary–Blair.
4. Avoir toujours à disposition de l'eau ou du bouillon stériles car après autoclavage, il est parfois nécessaire de rajouter un peu de liquide pour rendre la préparation de lentilles plus crémeuse.

Préparation de la suspension bactérienne :

1. **Jour 1** : Ensemencer 2–3 boîtes de gélose au sang par étalement d'une culture pure du microorganisme afin d'obtenir une pousse rapide. Incuber toute la nuit à 37 ºC en aérobie.
2. **Jour 2 :** Prélever sur la gélose au sang une bonne quantité de culture bactérienne à l'aide d'un écouvillon stérile. Mettre en suspension le microorganisme dans 6 ml de bouillon de Mueller-Hinton, dans un tube à centrifuger en plastique, stérile.
3. Vortexer.
4. Vérifier à l'aide d'un spectrophotomètre si la densité optique est de 0,8 à 570 nm de longueur d'onde (McFarland 4), équivalent à 12×10^8 ufc/ml — faire le blanc avec du milieu de Mueller-Hinton
5. Ajuster la densité optique à 0,8 en ajoutant, soit du milieu de Mueller-Hinton, soit de la culture bactérienne.
6. On obtient ainsi la suspension bactérienne avec laquelle on va travailler.

Méthode d'inoculation du milieu Cary–Blair :

1. Répartir 2 ml de la suspension bactérienne dans chaque bécher contenant 42 g de purée de lentilles.
2. Mélanger soigneusement à l'aide d'une spatule ou d'un bâtonnet applicateur stérile.
3. A l'aide d'un écouvillon ou d'une spatule stérile, inoculer chaque flacon de Cary–Blair avec une généreuse portion (de la taille d'un petit pois) du mélange lentilles/microorganisme.
4. Si nécessaire, insérer l'écouvillon et casser le manche pour pouvoir fermer le flacon.
5. Fermer hermétiquement en vissant le bouchon.
6. Conserver à température ambiante jusqu'à l'envoi.

Contrôle qualité :

1. Il faut vérifier la stérilité de tous les milieux et réactifs utilisés pour réaliser le mélange lentilles/microorganisme.
2. Il faut vérifier la stérilité de la purée de lentilles après autoclavage et avant incorporation du microorganisme.
3. Le mélange lentilles/microorganisme doit être étalé sur des milieux non sélectifs, au début et à la fin de l'inoculation du milieu Cary–Blair, ceci pour vérifier non seulement la croissance du germe, mais aussi pour rechercher s'il n'y a pas eu contamination des échantillons.
4. Tous les flacons inoculés doivent être conservés à température ambiante jusqu'à l'envoi.

5. Organisation du contrôle qualité : si 90 échantillons sont préparés : 68 sont destinés à l'envoi, et 22 seront réservés au contrôle qualité) :

    - 5 flacons sont repiqués chaque semaine
    - tous les flacons sont numérotés de façon à identifier le moment où ils ont été repiqués
    - A la fin d'un envoi (quand le CTMO décide que plus aucune réponse ne peut être raisonnablement attendue), tous les flacons restants sont repiqués
    - Les flacons sont conservés dans le laboratoire organisateur de l'EEQ jusqu'à ce que le bilan des réponses et les résultats du contrôle qualité soient concordants
    -

6. Echec du contrôle qualité (CQ) :

    - Il faut 100% de conformité
    - Si le pathogène n'est pas viable lors du repiquage initial avant inoculation des flacons de Cary-Blair, il y a échec (dans le cas de cultures mixtes – nécessité d'évaluer la prédominance du pathogène)
    - différer l'envoi, répéter les analyses
    - Si les analyses confirment le problème initialement observé, stopper l'envoi, examiner les mesures correctives nécessaires et recommencer la procédure à partir du début
    - Les flacons restants sont testés pour la viabilité du pathogène dans le temps ; s'il n'est pas viable, il ne sera donc pas possible d'évaluer les laboratoires qui déclareront n'avoir pas pu cultiver le germe qu'ils sont censés analyser
    - Il est parfois nécessaire d'inclure une culture pure du pathogène lyophilisée ou sur gélose semi-solide dans un milieu de transport adéquat, s'il y a le moindre doute quant à sa viabilité dans le temps

FICHE DE PAILLASSE

CONTROLE QUALITE DES ECHANTILLONS SIMULES DE SELLES

Numéro d'enquête : _____
Microorganisme utilisé : _____
Densité optique : _____
Date de préparation : _____

1. Vérification de la stérilité (sur gélose au sang)

Echantillon	24 h	48 h
a. Bouillon de Mueller-Hinton		
b. Lentilles après autoclavage		
c. Mélange lentilles/microorganisme avant inoculation		
d. Mélange lentilles/microorganisme après inoculation		

2. Viabilité de l'isolat

Numéro de l'échantillon	Date de repiquage	Date de lecture	Tous les milieux sont incubés 24–48 h à 37 ºC					
			Gélose au sang	Mac	XLD	DCA	SS	TCBS
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								

Procédure OMS 0004	**PATHOGENE MENINGE EN MILIEU DE TRANSPORT TRANS-ISOLATE (TI)**		
Préparée par	**Date d'adoption**	**Signature**	
Vivian Fensham/ Anne von Gottberg			

Date de révision	**Signature à la révision**	**Date de relecture**	**Signature à la relecture**

Distribué à	**Nombre de copies**	**Distribué à**	**Nombre de copies**
Lab. de microbiologie organisateur de l'EEQ.	1		

Objet :

Simuler un échantillon de LCR contenant un pathogène spécifique.

Choix du pathogène :

Les isolats peuvent être choisis à partir de souches cliniques conservées ou de souches de collection – on choisit des isolats spécifiques qui mettent en évidence les différents aspects de l'identification, du sérotypage/groupage ou de l'antibiogramme :

1. Décision du Comité Technique de Mise en Œuvre (CTMO).
2. Soumission par un laboratoire spécialisé d'un isolat (identifié par un numéro de souche de collection ou de laboratoire, sa date de réception au laboratoire de référence) accompagné d'une fiche de paillasse confirmant son identification (voir POS OMS0001), son sérotypage/groupage et son antibiogramme (selon le cas, recherche de β-lactamase, diffusion en disque, CMI)
3. Contrôle qualité indépendant réalisé dans le laboratoire organisateur de l'EEQ – tout résultat divergent sera soumis pour vérification à un laboratoire spécialisé (si possible un laboratoire clinique indépendant : Laboratoire de Lutte contre les Infections/ Laboratoire de Microbiologie, Johannesburg General Hospital et/ou Laboratoire de Microbiologie, Chris Hani Baragwanath Hospital, Cape Town).

Préparation de l'isolat :

1. Repiquer l'isolat sur 3-4 boîtes de gélose chocolat ou de gélose au sang (milieux non sélectifs) et incuber toute la nuit à 37 ºC sous atmosphère à 5% de CO_2 ou en aérobie (les conditions d'incubation optimum dépendent du pathogène)
2. Rechercher une culture pure après incubation

3. Vérifier la stérilité des stocks de bouillon de Mueller-Hinton ou de tout autre bouillon approprié et des milieux TI (2 flacons non inoculés)
4. Inoculer un flacon de 100 ml de bouillon (ou tout autre volume approprié) avec le microorganisme (à l'aide d'un écouvillon stérile). Le volume de bouillon dépend du nombre d'échantillons à préparer
5. Mesurer la turbidité du bouillon inoculé à l'aide d'un spectrophotomètre à 570 nm et noter le résultat sur la feuille de travail. Pour la plupart des microorganismes, la densité optique idéale est de 0,8
6. Inoculer ensuite chaque flacon de TI avec 0,5–1 ml de cette suspension

Méthode :

1. Travailler dans une enceinte de sécurité biologique de classe II
2. Oter l'opercule aluminium du flacon de TI, nettoyer la surface d'inoculation avec un écouvillon imbibé d'alcool et passer à la flamme si nécessaire
3. Inoculer chaque flacon de milieu TI avec 0,5–1 ml de la suspension bactérienne, en utilisant une seringue et une aiguille stériles
4. Incuber en atmosphère ambiante à 37 ºC pendant 24 h
5. Vérifier la contamination des échantillons après 24 h d'incubation, en prenant au hasard 5 flacons dans le lot, dont on prélèvera aseptiquement 0,1 ml pour ensemencer une gélose au sang qui sera incubée pendant 24 h. Ces flacons seront étiquetés sous le nom d'échantillons CQ (contrôle qualité) 1 à 5 et conservés avec les échantillons CQ suivants
6. Traiter 2 flacons de milieu TI non ensemencés de la même façon (incubation, ventilation, retrait de l'aiguille); il s'agit d'un contrôle qualité du milieu TI
7. Le reste du lot sera ventilé à l'aide d'aiguilles stériles Airway® (commercialisées par Organon Teknika Corporation); les capuchons des flacons sont d'abord nettoyés avec un écouvillon imbibé d'alcool avant d'y insérer l'aiguille qui sera laissée en place
8. Laisser les flacons sur la paillasse jusqu'à la fin des envois (il est préférable de ne pas dépasser 5 jours)
9. Retirer les aiguilles de ventilation avant l'envoi
10. Avant l'envoi (la veille), 5 autres échantillons CQ seront pris au hasard (échantillons CQ 6 à 10) et traités comme les 5 premiers (voir point 5. ci-dessus), afin de tester la viabilité du pathogène et les contaminations éventuelles lors de la ventilation
11. A ce stade, confirmer les réactions biochimiques et/ou le sérotypage du microorganisme

Contrôle Qualité :

(On prépare généralement des échantillons pour 77 laboratoires, et 5 échantillons supplémentaires pour d'éventuelles réexpéditions ou accidents. Pour chaque type de spécimen, au total, au moins 80 échantillons sont donc destinés à l'envoi et 30 échantillons supplémentaires sont réservés au CQ).

1. Organisation du CQ (30 flacons au total) :
   - 5 flacons après 24 heures d'incubation à 37 °C
   - 5 flacons, le jour précédent l'envoi (après ventilation)
   - Tous les flacons conservés à température ambiante, non ventilés, pendant toute la durée de l'envoi, prélèvement de 5 flacons deux fois par semaine pour tester la viabilité du pathogène (lundi et jeudi)
   - Numéroter tous les flacons, en indiquant à quel stade ils ont été repiqués
   - A la date de clôture des envois (quand le CTMO décide que plus aucune réponse ne peut être raisonnablement espérée), tous les flacons sont repiqués
   - Les flacons sont conservés dans le laboratoire organisateur de l'EEQ jusqu'à ce que le bilan des réponses et les résultats du CQ soient concordants
   -
2. Retirer les aiguilles de ventilation de tous les flacons réservés au CQ en même temps que celles des flacons destinés à l'envoi

3. Echec du CQ :
   - Il faut 100% de conformité
   - Toute contamination ou absence de viabilité du pathogène dans les flacons 1 à 10 constitue un échec; différer l'envoi, répéter le test
   - Si lors de la répétition du test, le problème se confirme, arrêter l'envoi, étudier les mesures correctives nécessaires et recommencer la procédure depuis le départ
   - Les flacons restants sont testés pour la viabilité du pathogène dans le temps : si le pathogène n'est pas viable, il ne sera donc pas possible d'évaluer les laboratoires qui déclareront n'avoir pas pu cultiver le germe
   - Pendant toute la durée du CQ, si on constate l'absence de croissance bactérienne dans un seul des échantillons CQ, alors la viabilité devra être aussitôt testée dans les 30 échantillons CQ

Méthode de repiquage à partir des flacons de milieu TI :

1. nettoyer le sommet du flacon avec un écouvillon imbibé d'alcool et passer à la flamme si nécessaire
2. à l'aide d'une seringue et d'une aiguille stériles, aspirer 0,1 ml de liquide
3. inoculer le matériel aspiré directement sur les milieux appropriés
4. incuber à 37 ºC pendant 24 h sous atmosphère enrichie en CO_2 à 5% ou en aérobie (les conditions d'incubation optimum dépendent du pathogène)

Méthode de repiquage à partir des flacons de milieu TI s'il n'y a pas de croissance dans un ou plusieurs échantillons :

1. nettoyer le sommet du flacon avec un écouvillon imbibé d'alcool et passer à la flamme si nécessaire
2. à l'aide d'une seringue et d'une aiguille stériles, aspirer 1 ml de liquide et le transférer dans un tube à centrifuger plastique stérile
3. centrifuger l'échantillon et ôter le surnageant
4. ensemencer une boîte de gélose chocolat ou de gélose au sang (90 mm) avec le culot, étaler pour obtenir des colonies;
5. incuber à 37 ºC pendant 24 h sous atmosphère enrichie en CO_2 à 5% ou en aérobie (les conditions d'incubation optimum dépendent du pathogène);
6. Si après qu'1 ml ait été ainsi repiqué (prélevé, centrifugé et étalé sur gélose), le germe ne pousse toujours pas, il faut alors centrifuger tout le contenu du flacon et étaler le culot;
7. répéter la méthode décrite ci-dessus sur tout échantillon qui ne pousse pas dans un délai au-delà duquel les germes ne sont plus viables de toute façon.

FICHE DE PAILLASSE

CONTROLE DE QUALITE DES MILIEUX TI

Numéro d'enquête : _____
Microorganisme utilisé :_____
Densité optique :_____
Date de préparation : _____

Analyse minimale de la stérilité de tous les milieux et réactifs utilisés : incubation à 37ºC pendant 48 h en aérobie (une analyse complète de la stérilité des milieux est pratiquée avant leur sortie de DMP (Diagnostic Media Product : division du NHLS, Afrique du Sud). La stérilité des milieux TI est également vérifiée au niveau de DMP, mais aucun test de croissance bactérienne n'est réalisé. L'étude de la croissance bactérienne en milieu TI est réalisée uniquement par l'Unité de Référence des Pathogènes Méningés et Respiratoires (RMPRU) et par le laboratoire organisateur de l'EEQ).

Contrôle de qualité des milieux non inoculés :

Milieux/réactifs	Date de repiquage	Date de lecture	24 h d'incubation	48 h d'incubation
Bouillon de Mueller-Hinton, sérum ou BCC (bouillon cœur-cervelle)				
Milieu TI (2 flacons) non inoculé				

Contrôle de qualité des milieux inoculés :

Milieux/réactifs	Date de repiquage	Date de lecture	24 h d'incubation	48 h d'incubation
Bouillon de Mueller-Hinton, sérum ou BCC inoculé avec le microorganisme				

Contrôle de qualité du processus de préparation des échantillons envoyés aux laboratoires participants :

Tous les échantillons doivent être repiqués sur un milieu approprié, par exemple : gélose au sang à 5 % ou gélose chocolat

Numéro d'échantillon	Date de repiquage	Date de lecture	Croissance	Date de clôture	Croissance de tous les échantillons
1 (après 24 h à 37 ºC)					
2 (après 24 h à 37 ºC)					
3 (après 24 h à 37 ºC)					
4 (après 24 h à 37 ºC)					
5 (après 24 h à 37 ºC)					
6 (veille de l'envoi)					
7 (veille de l'envoi)					
8 (veille de l'envoi)					
9 (veille de l'envoi)					
10 (veille de l'envoi)					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					

Procédure OMS 0005	**ECHANTILLONS LYOPHILISES**

Préparée par	**Date d'adoption**	**Signature**
Vivian Fensham/ Anne von Gottberg		

Date de révision	**Signature à la révision**	**Date de relecture**	**Signature à la relecture**

Distribué à	**Nombre de copies**	**Distribué à**	**Nombre de copies**
Lab. de microbiologie organisateur de l'EEQ	1		

Préparation de l'isolat :

Jour 1 :

1. Isolat proposé par un laboratoire spécialisé (laboratoire de référence) accompagné de sa fiche de paillasse **ou** isolat conservé dans le laboratoire d'EEQ à –70 °C, accompagné d'une fiche de paillasse identique remplie par le personnel du laboratoire organisateur de l'EEQ.
2. Se procurer auprès de Diagnostic Media Products un mélange à 10% de lait écrémé et 5% inositol.
3. Contrôle qualité de la stérilité du lait écrémé employé (repiquer un aliquot de lait écrémé sur milieu non sélectif et incuber 48 h à 37 °C et à température ambiante)

Jour 2 :

1. Repiquer le microorganisme sur des boîtes de Pétri (le nombre dépend du microorganisme et de la quantité nécessaire).
2. Incuber 24 h dans les conditions optimale pour la croissance du germe.

Jour 3 :

1. Observer s'il y a une pousse dans les repiquages du 1er jour réservés au CQ de la stérilité (après 48 h d'incubation).
2. Vérifier qu'il y a bien culture pure de l'isolat à lyophiliser sur les boîtes de gélose du 2^{ième} jour.
3. Dans une enceinte de sécurité biologique de classe II, à partir des géloses, récupérer les colonies et les mettre en suspension dans le lait écrémé, à l'aide d'un écouvillon stérile pour chaque boîte.

4. Passer à la flamme le goulot de la bouteille de lait écrémé après chaque opération pour assurer la stérilité.
5. Contrôle qualité du stock de suspension bactérienne ainsi constituée dans le lait écrémé en repiquant un aliquot (avant répartition et après répartition) sur un milieu non sélectif incubé d'une part, dans les conditions optimales pour la pousse de l'isolat, d'autre part à température ambiante et à 37 °C.
6. Répartir des volumes de 1,0 ml de cette suspension stock dans des ampoules en verre stériles de 6 ml, fermées par des bouchons en caoutchouc stériles.
7. Les ampoules sont prêtes à être lyophilisées.
8. Placer les ampoules au congélateur à −70 °C pendant une heure, le temps de mettre en route le lyophilisateur.
9. Placer les ampoules dans le lyophilisateur pour toute la nuit; vérifier que la température et le vide sont corrects.

Jour 4 :

1. Fermer toutes les ampoules sous vide.
2. Coiffer les ampoules d'un capuchon en aluminium.
3. Remettre en suspension dans 1,0 ml de bouillon approprié le contenu lyophilisé d'un certain nombre d'ampoules réservées au CQ.
4. Incuber 30 minutes.
5. Repiquer l'échantillon après qu'il ait été lyophilisé pour vérifier la viabilité du germe ou toute contamination éventuelle; le nombre d'ampoules à tester dépend du nombre qui doit être envoyé.

Contrôle qualité :

1. Il faut vérifier la stérilité de tous les milieux et réactifs employés pour la préparation du germe.
2. La stérilité du lait écrémé doit être vérifiée après autoclavage et avant d'y ajouter le microorganisme.
3. Organisation du CQ (préparation d'environ 100 spécimens : 80 sont destinés à l'envoi, 5 supplémentaires sont prévus pour remplacement en cas d'imprévu, le reste est réservé au CQ).
   - 3 ampoules sont repiquées immédiatement après que le lot ait été préparé, afin de vérifier la pousse du germe prédominant sur milieux sélectif et non sélectif.
   - Le reste des ampoules réservées au CQ sont conservées à température ambiante et repiquées chaque semaine.
   - Toutes les ampoules sont numérotées, en identifiant à quel stade elles ont été repiquées.
   - A la fin des envois (quand le CTMO décide que plus aucune réponse ne peut être raisonnablement attendue), on estime le nombre d'ampoules restantes et les bactéries lyophilisées seront repiquées en fonction des problèmes mis en évidence lors du bilan des réponses.
   - Les ampoules sont conservées par le laboratoire organisateur de l'EEQ jusqu'à ce que le bilan des réponses et les résultats du CQ soient concordants. Elles peuvent être conservées pour de prochaines utilisations.

4. Echec du CQ :
   - Il faut 100% de conformité.
   - L'absence de viabilité du pathogène dans les ampoules 1, 2 et 3 constitue un échec (dans le cas de cultures mixtes – nécessité d'étudier la prédominance du pathogène). Différer l'envoi, répéter l'analyse sur un plus grand nombre d'ampoules (ce nombre est fonction de la taille de l'envoi).
   - Si l'analyse confirme le problème, stopper l'envoi, examiner les mesures correctives nécessaires et recommencer la procédure à partir du début.
   - Les ampoules restantes sont testées pour la viabilité du pathogène dans le temps ; s'il n'est pas viable, il ne sera pas possible d'évaluer les laboratoires puisqu'il leur sera difficile, voire impossible, de faire pousser le germe qu'ils sont censés analyser.

FICHE DE PAILLASSE
CONTROLE QUALITE DES SPECIMENS LYOPHILISES

Numéro d'enquête : _____
Microorganisme : _____
Date de préparation :_____

1. CQ de la stérilité (sur milieux non sélectifs)

Echantillon	24 h	48 h
Lait écrémé obtenu auprès de DMP		

2. CQ de la contamination (après addition du microorganisme)

Echantillon avec microorganisme	24 h	48 h
Avant répartition		
Après répartition		

3. CQ de la viabilité du microorganisme et de la contamination après lyophilisation

Le nombre d'échantillons dépend du lot préparé ; des lyophilisats doivent être repiqués immédiatement puis ensuite il faut repiquer un échantillon par semaine pendant toute la durée de l'envoi.

Numéro d'échantillon	Date de repiquage	Date de lecture	Tous les milieux sont incubés 24 heures à 37 °C		
			Gélose au sang	Mac	Autre
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					

Procédure OMS 0006	**EMBALLAGE DES ECHANTILLONS D'EEQ**		
Préparée par	**Date d'adoption**	**Signature**	
Vivian Fensham/ Anne von Gottberg			

Date de révision	**Signature à la révision**	**Date de relecture**	**Signature à la relecture**

Distribué à	**Nombre de copies**	**Distribué à**	**Nombre de copies**
Lab. de microbiologie organisateur de l'EEQ	1		

Objet :

Tous les échantillons préparés pour le programme d'EEQ doivent être étiquetés et emballés pour être envoyés par courrier.

Procédure d'étiquetage :

- Pour étiqueter les échantillons, on se sert d'un modèle d'étiquette indiquant le numéro de l'enquête et le numéro de l'échantillon, par exemple **Enquête 2005-1A.**
- Tous les échantillons sont étiquetés avant emballage.
- Chaque échantillon est conservé séparément dans sa propre boîte d'emballage.
- Le même nombre de spécimens est préparé pour chaque numéro d'échantillon. La procédure d'emballage est ainsi facilitée, en évitant qu'un laboratoire ne reçoive des échantillons en double. En effet, si la boîte contient un échantillon de trop, une erreur a forcément eu lieu à l'emballage et pourra être corrigée avant que l'enquête ne soit expédiée.
- Les frottis portent leur numéro d'enquête respective et celui de l'échantillon écrits au crayon à papier sur la partie en verre dépoli de la lame. Ils sont ensuite étiquetés si nécessaire avec une petite étiquette mentionnant respectivement leur numéro d'enquête et les renseignements relatifs à l'échantillon.

Procédure d'emballage :

- Les flacons contenant les échantillons simulés de selles en milieu Cary–Blair sont d'abord emballés chacun dans un container universel fermé par un bouchon à vis et contenant du matériel absorbant.
- Les flacons de milieu TI sont d'abord fermés avec du parafilm, avant d'être ensuite enveloppés individuellement dans du papier bulle et scotchés.
- Tous les frottis sont mis dans des étuis de transport.
- Chaque étui porte les renseignements cliniques, par exemple frottis (coloré ou non) destiné à la microscopie pour le paludisme ou la tuberculose, etc.
- Les sérums destinés à la sérologie de la peste sont répartis dans des tubes en plastique (1,5 ml) avec bouchon à vis. Ces tubes sont aussitôt placés dans des containers universels contenant du matériel absorbant.
- Tous les échantillons sont ensuite emballés individuellement dans un container DHL Express étanche, fermé par un bouchon à vis et contenant du matériel absorbant, conformément à la réglementation de l'IATA pour le transport des échantillons diagnostiques.
- Le container étanche est ensuite placé dans un container DHL réservé aux échantillons diagnostiques, conformément à la réglementation de l'IATA pour les produits PI650 (substances infectieuses de catégorie B). La boîte est fermée et tous les documents nécessaires (formulaires de réponse et de retour d'information) sont placés dans une enveloppe à fenêtre, attachée à l'extérieur de la boîte.
- La boîte et les documents sont ensuite placés dans un sac DHL réservé au transport express aérien, contenant dans une poche extérieure, le billet d'avion et les documents commerciaux.
- Si l'envoi est classé dans la catégorie A des substances infectieuses, il faut fournir des documents complémentaires et se plier aux exigences d'emballage. Dans ce cas, l'envoi doit être emballé selon les dispositions arrêtées pour les produits PI 602, UN 2814, et l'expéditeur doit faire une déclaration d'envoi de produits dangereux.
- La personne qui signe la "Déclaration d'envoi pour des produits dangereux" doit avoir suivi une formation IATA sur l'emballage des produits dangereux ou des substances infectieuses de classe 6.2. Cette personne doit suivre des cours de recyclage tous les deux ans.

Procédure OMS 0007	**FROTTIS SIMULES DE LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN (LCR)**		
Préparée par	**Date d'adoption**	**Signature**	
Vivian Fensham/ Anne von Gottberg			

Date de révision	**Signature à la révision**	**Date de relecture**	**Signature à la relecture**

Distribué à	**Nombre de copies**	**Distribué à**	**Nombre de copies**
Lab. de microbiologie organisateur de l'EEQ	1		

Objet :

Des leucocytes polynucléaires (PN) sont mélangés avec une suspension bactérienne pour simuler l'apparence d'un échantillon de LCR contenant un pathogène.

Préparation des PMN :

1. Mettre 6 ml de Polymorphprep™ (AXIS-SHIELD, PoC AS, Oslo, Norvège) dans un tube à centrifuger stérile, fermé par un bouchon à vis.
2. Déposer soigneusement 6 ml de sang-EDTA fraîchement prélevé à la surface du Polymorphprep™, en prenant soin de ne pas mélanger les deux solutions.
3. Centrifuger le tube 35 minutes à 1600 tours/minute (rpm).
4. Après centrifugation, examiner les différentes couches : il y a une importante couche de sérum, une couche très dense d'aspect pelucheux de lymphocytes, une couche blanchâtre avec un très léger nuage d'un matériel plus dense à l'intérieur (PN), puis la couche de réactif avec un culot d'érythrocytes.
5. Chaque couche est soigneusement retirée et placée dans un tube séparé.
6. Ajouter dans le tube contenant les PN, 4 ml de milieu essentiel minimum (MEM) préalablement porté à température ambiante.
7. Mélanger doucement, puis centrifuger 10 minutes à 2200–2300 rpm.
8. Enlever le surnageant et ajouter de nouveau 4 ml de MEM dans le tube pour remettre le culot en suspension et centrifuger de nouveau 10 minutes à 2200-2300 rpm.
9. Oter le surnageant, ajouter 1 ml de MEM et remettre doucement en suspension les cellules contenues dans le culot à l'aide d'une pipette stérile. On a ainsi obtenu le mélange de PN.

10. Déposer 10 µl de la suspension de PN sur une lame de verre et faire une coloration pour vérifier le nombre de cellules présentes – il faut 6–10 PN/champ observé sous objectif x100 à immersion à huile.

Préparation de la suspension bactérienne :

1. Le jour précédant la préparation des PN, deux tubes de bouillon de Mueller-Hinton sont ensemencés avec une colonie du microorganisme choisis et incubés toute la nuit.
2. Le lendemain, ces tubes sont centrifugés 10 min à 3300 rpm, le surnageant est enlevé et le culot repris dans 6 ml de tampon phosphate (PBS).
3. Si le microorganisme ne nécessite pas de bouillon pour pousser, il peut être cultivé sur une boîte de gélose au sang (la préparation sur gélose au sang ou en bouillon dépendra de la nature du pathogène).
4. Le microorganisme récupéré à partir d'une gélose au sang peut être directement mis en suspension dans 6 ml de PBS, il ne reste plus qu'à lire la densité optique.
5. Il faut obtenir une densité optique de 0,3 à 570 nm de longueur d'onde; faire le blanc avec du PBS.
6. Réaliser un frottis de la suspension pour vérifier la concentration en bactéries.

Méthode de préparation des frottis simulés de LCR :

1. Faire un mélange bactéries/PN dans les proportions 1 :5 (1 volume de suspension bactérienne pour 4 volumes de suspension de PN); bien mélanger à l'aide d'une pipette Gilford.
2. Déposer 10 µl de ce mélange sur une lame de verre propre, la fixer à la chaleur et faire la coloration.
3. Observer la lame sous le microscope pour vérifier le nombre de cellules et de microorganismes par champ sous grossissement x100; il est possible de modifier les dilutions de PN et de bactéries pour obtenir une meilleure image.
4. Utiliser un agitateur magnétique pour sans cesse agiter le mélange pendant la préparation des frottis et obtenir ainsi une distribution identique des cellules et des bactéries sur tous les frottis.
5. Les lames peuvent être conservées 3 mois à 4 °C.

Contrôle qualité :

1. Il faut vérifier la stérilité de tous les milieux et réactifs employés pour la préparation des frottis simulés de LCR.
2. Organisation du CQ des frottis (préparer environ 100 lames : 80 destinées à l'envoi ; 10 lames supplémentaires prévues pour des remplacements et conservées au réfrigérateur ; 10 lames réservées au CQ).
   - 5 lames sont immédiatement utilisées pour le CQ; deux membres du personnel les examinent pour juger de la qualité du frottis et des caractéristiques des PN et des bactéries.
   - Les autres lames sont conservées à température ambiante et examinées régulièrement (une par semaine).

- les lames sont gardées au laboratoire organisateur de l'EEQ jusqu'à ce que le bilan des réponses et les résultats du CQ soient concordants.

3. Echec du CQ :
   - Il faut 100% de conformité : les lames 1 à 10 doivent bien mettre en évidence les caractéristiques requises par l'enquête.
   - Si une seule lame ne donne pas satisfaction, différer l'envoi, étudier le problème.
   - Si on constate un défaut dans la préparation des frottis, décaler l'envoi et recommencer la procédure depuis le départ.

FICHE DE PAILLASSE

CONTROLE QUALITE DES FROTTIS SIMULES DE LCR

Numéro d'enquête : _____
Microorganisme utilisé : _____
Densité optique : _____
Dilution finale utilisée : _____
Date de préparation des lames : _____

Vérification de la stérilité

Milieu/réactif	24 h d'incubation	48 h d'incubation
Milieu minimum essentiel		
Polymorphprep™		
Mueller-Hinton		
PBS		

Evaluation de la coloration de Gram

Il faut évaluer la taille, la forme et les caractéristiques de coloration des bactéries après coloration de Gram pour s'assurer que le frottis correspond bien à ce que l'on pourrait attendre d'un véritable échantillon clinique de LCR.

Numéro de lame	Date	PN/champ	Bactéries/champ	Aspects des PN	Aspect des bactéries
1					
2					
3					
4					
5					

Une fois le CQ ci-dessus terminé :

- Les lames restantes sont examinées pendant 5 semaines (1 par semaine).

Numéro de lame	Date	PN/champ	Bactéries/ champ	Aspect des PN	Aspect des bactéries
6					
7					
8					
9					
10					

Procédure OMS 0008	**TRAITEMENT DES RESULTATS DE L'EEQ OMS/NICD**

Préparée par	**Date d'adoption**	**Signature**
Vivian Fensham/ Anne von Gottberg		

Date de révision	**Signature à la révision**	**Date de relecture**	**Signature à la relecture**

Distribué à	**Nombre de copies**	**Distribué à**	**Nombre de copies**
Lab. de microbiologie organisateur de l'EEQ	1		

Objet :

Examen systématique des réponses des laboratoires participants.

Procédure :

1. Créer un tableau Excel pour chaque enquête (synthèse des réponses)
2. Noter la date d'arrivée des colis dans chaque pays (suivi DHL)
3. Retour des réponses par fax, e-mail et services postaux
4. Noter la date de réception des réponses
5. Envoi d'un accusé de réception des réponses; noter la date et la méthode employée
6. Saisie des réponses dans le tableau Excel sous des catégories pré-déterminées.

Le CTMO se réunit environ deux à trois semaines après la date de retour spécifiée pour :

- discuter de l'éventail des réponses
- discuter des questions/difficultés/problèmes soulevés par les réponses
- discuter des actions appropriées pour l'ensemble des problèmes
- proposer des catégories de notation
- proposer des attributions éventuelles de notes
- identifier les laboratoires qui n'ont pas répondu et établir une méthode de suivi

7. Une deuxième personne vérifie la saisie des réponses sous Excel
8. Tous les spécialistes de laboratoire examinent les originaux des formulaires de réponse afin de repérer tout point qui aurait échappé à la saisie sous Excel
9. Le tableau Excel et les notes attribuées sont mis en forme et distribués afin d'être étudiés.

Le CTMO se réunit de nouveau :

- pour étudier la seconde version du tableau Excel et des notes
- pour discuter de l'attribution des notes à chaque participant et de leur justification
- chaque spécialiste de laboratoire est chargé de rédiger et de soumettre un commentaire concernant le résumé des réponses

10. Le CTMO se réunit pour finaliser les réponses et examiner le commentaire général de l'EEQ (contenant des statistiques anonymes)
11. Les modifications apportées doivent être examinées par tous les membres du comité
12. Toute la documentation finale est préparée de façon à pouvoir être expédiée aux participants lors du prochain envoi
13. Les tableaux Excel (données confidentielles : résultats non-anonymes) sont distribués au CTMO et au Comité Technique Consultatif (CTC)
14. Le commentaire général de l'EEQ est distribué à tous les laboratoires participants
15. Tous les résultats du tableau Excel sont transférés dans une base de données Access
16. Des rapports individuels d'évaluation pour chaque laboratoire (rapports confidentiels OMS/NICD) sont ensuite produits à partir de cette base de données
17. Toute la documentation finale est traduite en français
18. Les versions finales et réactualisées de toute la documentation sont sauvegardées sur disquettes ou CD ; elles sont distribuées par le coordinateur de l'EEQ; des copies sont également imprimées et classées comme il convient.

Procédure OMS 0009	**PESTE : COLORATION BIPOLAIRE DES BACILLES SUR FROTTIS SANGUIN**		
Préparée par	**Date d'adoption**	**Signature**	
Lorraine Arntzen/John Frean			
Date de révision	**Signature à la révision**	**Date de relecture**	**Signature à la relecture**

Distribué à	**Nombre de copies**	**Distribué à**	**Nombre de copies**
Lab. de microbiologie organisateur de l'EEQ	1		

Objet :

Préparer un frottis sanguin montrant des bacilles à coloration bipolaire, compatible avec un diagnostic de peste septicémique.

Choix du pathogène :

1. Isolats de *Yersinia pestis* à partir d'isolats cliniques conservés ou de souches de collection.
2. L'isolat (identifié par un numéro de laboratoire ou de souche de collection, sa date de réception au laboratoire de référence) provient et est traité uniquement par le laboratoire de référence (NHLS Special Bacterial Pathogens Unit).
3. Pour des raisons de sécurité, aucune confirmation extérieure d'identification n'est demandée.

Préparation de l'isolat :

1. Cette tâche est réalisée dans une enceinte de sécurité biologique de classe 2 à l'intérieur d'un laboratoire de sécurité biologique de niveau 3.
2. Repiquer l'isolat à partir du milieu de conservation semi-solide sur une gélose au sang de cheval à 5 % et incuber 48 heures à 37 ºC, en aérobie.
3. Rechercher une culture pure après incubation.
4. Inoculer avec un phage spécifique (CDC) ; incuber à 27 ºC et à 37 ºC.
5. Ensemencer des milieux spécifiques d'assimilation des sucres; incuber à 37ºC.
6. Examiner la sensibilité au phage et les réactions de fermentation pour confirmer l'identification.

Méthode :

1. Prélever 5 ml de sang veineux chez un donneur sain volontaire.
2. Inoculer ce prélèvement sanguin avec une culture bactérienne fraîchement préparée à partir d'un isolat de *Y. pestis*.
3. Incuber 24 heures dans un tube hermétiquement fermé.
4. Mélanger en retournant plusieurs fois le tube.
5. Préparer des frottis sanguins, les laisser sécher, les fixer par immersion dans du méthanol pendant 1 minute.
6. Vérifier au microscope la présence de coccobacilles gram négatifs, à coloration bipolaire, avec les colorations de Gram et Wayson, sous grossissement x1000.
7. Préparer au moins 50 frottis.
8. Conserver les frottis dans un container fermé jusqu'à ce qu'ils soient emballés dans des étuis d'envoi pour lames.

FICHE DE PAILLASSE

CONTROLE QUALITE DES FROTTIS SANGUINS POUR LA RECHERCHE DE BACILLES A COLORATION BIPOLAIRE

Dix lames sont colorées et examinées comme décrit ci-dessus. Elles doivent toutes présenter de petits coccobacilles Gram négatif, dont la majorité à coloration bipolaire.

Numéro de lame	Coccobacilles Gram-négatif		Coloration bipolaire	
	Oui	Non	Oui	Non
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

Procédure OMS 0010	**PESTE : SERUM POSITIF POUR LES ANTICORPS ANTI-F1**

Préparée par	**Date d'adoption**	**Signature**
Lorraine Arntzen/John Frean		

Date de révision	**Signature à la révision**	**Date de relecture**	**Signature à la relecture**

Distribué à	**Nombre de copies**	**Distribué à**	**Nombre de copies**
Lab. de microbiologie organisateur de l'EEQ	1		

Objet :

Préparer pour les analyses sérologiques des échantillons de sérum de lapin contenant des anticorps simulant une exposition naturelle au germe de la peste. La procédure suit les règles du Manuel de Laboratoire pour le diagnostique biologique de la peste, élaboré par le CDC et l'OMS en 2000.

Procédure :

1. Obtenir l'approbation du Comité d'Ethique Animale du NHLS.
2. Tous les travaux sur les animaux sont réalisés par un technicien animalier qualifié et agréé.
3. Prélèvement de sang sur deux lapins blancs adultes de Nouvelle Zélande ; rechercher la présence d'anticorps anti-F1 par ELISA et par PHA/HI (hémagglutination passive/inhibition de l'hémagglutination).
4. Dissoudre 5 mg d'antigène F1 de *Y. pestis* (obtenu auprès du CDC, Fort Collins) dans 1 ml d'adjuvant de Freund incomplet.
5. Inoculer le mélange antigène/adjuvant (0,25 ml) en intramusculaire en quatre endroits différents des pattes arrière de chaque lapin.
6. Prise de sang (5ml) 3 semaines plus tard ; vérifier le titre d'anticorps par ELISA et PHA/HI.
7. Si les titres sont suffisamment élevés (>1 :1024), saigner les lapins et récupérer le sérum.
8. Diluer le sérum jusqu'à obtenir le titre adéquat, répartir en aliquots de 1,5 ml et congeler à -20 °C.
9. Le sérum normal d'un lapin témoin non traité avec le mélange antigène/adjuvant sert d'échantillon négatif.

FICHE DE PAILLASSE

CONTROLE QUALITE DES SERUMS ANTI-F1

Les sérums sont conservés à 37 ºC à température ambiante, pendant deux semaines, puis réanalysés chaque semaine pendant toute la durée de l'envoi. Le titre d'anticorps ne doit pas chuter brutalement.

Numéro de semaine	Titre après	
	conservation à température ambiante	conservation à 37 ºC
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		

Procédure OMS 0011	**FROTTIS SIMULE DE CRACHAT (avec présence ou non de bactéries pathogènes)**

Préparée par	**Date d'adoption**	**Signature**
Kerrigan McCarthy/Vivian Fensham		

Date de révision	**Signature à la révision**	**Date de relecture**	**Signature à la relecture**

Distribué à	**Nombre de copies**	**Distribué à**	**Nombre de copies**
Lab. de microbiologie organisateur de l'EEQ	1		

Objet :

Préparer des frottis simulés de crachat contenant des leucocytes polynucléaires (PN), des cellules épithéliales, la flore normale de la cavité buccale et des fibres muqueuses. Ces frottis peuvent être utilisés soit dans le cadre d'une EEQ de la bactériologie, soit dans le cadre d'une EEQ de la bacilloscopie (dans ce cas, il s'agit de frottis exempts de bacilles acido-alcoolo-résistants, i.e. frottis BAAR négatif).

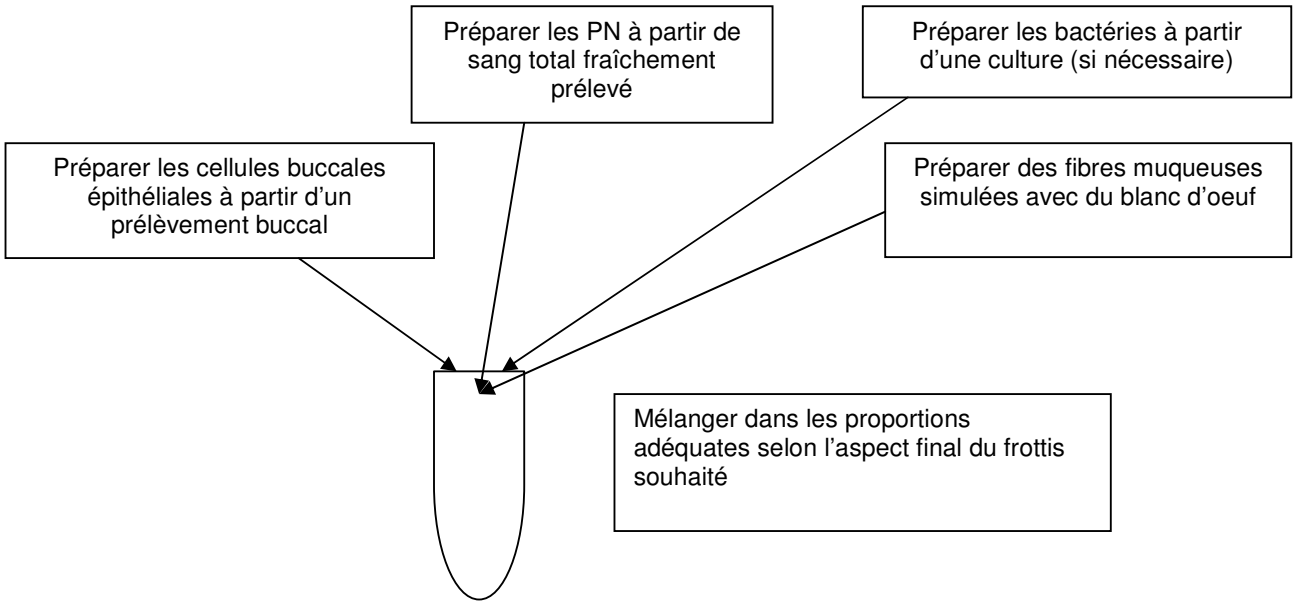
Réactifs et consommables :

Polymorphprep™ (AXIS-SHIELD, PoC AS, Oslo, Norvège)
15 ml de sang humain, fraîchement prélevé dans des tubes contenant de l'EDTA (anticoagulant)
Milieu Minimum Essentiel (MEM)
Glace
Tampon phosphate pH 7,2
Un œuf frais
Suspension bactérienne en bouillon de Mueller-Hinton
Ecouvillons stériles
Seringues de 5 ml
Aiguilles hypodermiques
Lames
Tubes à centrifuger de 15 ml
Tubes à centrifuger de 50 ml

Equipement de laboratoire :

Centrifugeuse
Agitateur magnétique
Agitateur vortex

Vue d'ensemble de la procédure :



Préparation des PN (identique POS OMS 0007) :

1. Mettre 6 ml de Polymorphprep™ dans chaque tube à centrifuger stérile, fermé par un bouchon à vis; préparer trois tubes pour obtenir suffisamment de cellules.
2. Déposer soigneusement 6 ml de sang total EDTA, fraîchement prélevé, à la surface du Polymorphprep™, en prenant soin de ne pas mélanger les deux solutions.
3. Centrifuger le tube 35 minutes à 1600 tours/minute (rpm).
4. Après centrifugation, examiner les couches : on observe une importante couche de sérum, une couche très dense d'aspect pelucheux de lymphocytes, une couche blanchâtre avec un très léger nuage d'un matériel plus dense à l'intérieur (PN), puis la couche de réactif contenant un culot d'hématies.
5. Chaque couche est soigneusement retirée et placée dans un tube séparé.
6. Ajouter dans le tube contenant les PN, 4 ml de milieu essentiel minimum (MEM) préalablement porté à température ambiante.
7. Mélanger doucement, puis centrifuger 10 minutes à 2200–2300 rpm.
8. Enlever le surnageant et ajouter de nouveau 4 ml de MEM dans le tube pour remettre le culot en suspension et centrifuger de nouveau 10 minutes à 2200-2300 rpm.
9. Oter le surnageant, ajouter 1 ml de MEM et remettre doucement en suspension les cellules contenues dans le culot à l'aide d'une pipette stérile. On a ainsi obtenu le mélange de PN.
10. Déposer 10 µl de la suspension de PN sur une lame de verre et faire une coloration pour vérifier le nombre de cellules présentes – il faut 6–10 PN/champ observé sous objectif x100 à immersion à huile.

Préparation des cellules épithéliales :

1. Demander à deux volontaires de se rincer la bouche avec du tampon phosphate stérile (PBS) qu'ils pourront recracher dans l'évier. Simple étape de lavage de la bouche avant le prélèvement.
2. Tremper un écouvillon stérile dans le PBS
3. Racler la cavité buccale de chaque volontaire avec un écouvillon.
4. Leur demander de se rincer la bouche avec 10 ml de PBS et de recracher le contenu dans un tube à centrifuger conique de 50 ml.
5. Faire tourner et presser les écouvillons contre les parois du tube à centrifuger de façon à récupérer toutes les cellules épithéliales buccales dans le PBS.
6. Vortexer vigoureusement le tube (contenant la salive, le PBS et les cellules) pendant 10 sec.
7. Centrifuger 10 min à 2200 rpm.
8. Enlever le surnageant.
9. Remettre le culot en suspension dans 1 ml de PBS.
10. Préparer un frottis, le fixer à la chaleur et faire une coloration de Gram pour confirmer la présence de cellules épithéliales.

Préparation de la suspension de microorganismes :

(N.B. uniquement si l'échantillon doit simuler le crachat d'un patient souffrant d'une infection de l'appareil respiratoire inférieur)

1. Le jour précédent la préparation des PN, deux tubes de bouillon de Mueller-Hinton sont ensemencés avec une colonie du microorganisme choisi et incubés toute la nuit. Si le microorganisme ne nécessite pas de bouillon pour croître, il peut être cultivé sur une boîte de gélose au sang (la préparation en bouillon ou sur gélose au sang dépendra de la nature du pathogène).
2. Le lendemain, les tubes sont centrifugés 10 min à 3300 rpm. Le surnageant est enlevé et le culot remis en suspension dans 6 ml de PBS.
3. Ajuster la densité optique de la suspension à 0,3 (à 570 nm), en se servant de PBS pour faire le blanc.
4. Dans le cas où le microorganisme est cultivé sur gélose au sang, il peut être directement mis en suspension à partir de la boîte dans 6 ml de PBS; il ne reste plus qu'à lire la densité optique.
5. Réaliser un frottis de la suspension ainsi préparée pour vérifier la concentration en bactéries.

Simulation du mucus :

1. Séparer le blanc d'œuf du jaune
2. Diluer le blanc d'œuf dans du PBS (1volume de blanc d'œuf pour 2 volumes de PBS)
3. C'est la solution de base
4. Mélanger 1 ml de fixateur pour BAAR avec 1 ml de blanc d'œuf dilué

Méthode de préparation du frottis :

1. Mélanger la suspension de PN avec les cellules épithéliales et la solution de blanc d'œuf dans les proportions appropriées.
2. Déposer 10µl de ce mélange sur une lame de verre propre. Fixer la lame à la chaleur et appliquer les colorations de Gram et de Ziehl–Neelsen.
3. Compter le nombre de cellules et de microorganismes par champ sous objectif x100. Il est possible de faire varier les dilutions pour obtenir une meilleure image.
4. Dans le cas où l'on rajoute des bactéries, réaliser un mélange PN/bactéries (1 volume de suspension bactérienne pour 4 volumes de PN) et bien mélanger à l'aide d'une pipette Gilford.
5. Faire une lame test pour vérifier si on obtient ainsi l'aspect souhaité.
6. Utiliser un agitateur magnétique pour sans cesse agiter le mélange PN/bactéries pendant la préparation des frottis et obtenir ainsi une distribution identique des cellules et des bactéries sur tous les frottis.

Contrôle qualité :

1. Il faut vérifier la stérilité de tous les milieux et réactifs employés pour la préparation des frottis simulés de crachat.
2. Si les lames sont destinées à une EEQ de la bacilloscopie (frottis BAAR négatifs), parallèlement à la coloration de Gram, il faut faire une coloration de Ziehl-Neelsen pour confirmer l'absence de mycobactéries.
3. Le nombre de lames réservées au CQ dépend de la taille du lot à préparer. Environ 10% des frottis du lot sont réservés au CQ.
4. Dix lames sont immédiatement utilisées pour le CQ : deux membres du personnel doivent les examiner et juger de la qualité du frottis et de l'aspect des neutrophiles et des bactéries (si approprié);
    - si les lames préparées sont destinées à l'EEQ de la bacilloscopie et pas pour simuler un frottis de crachat, alors 30 lames supplémentaires sont envoyées à 3 laboratoires extérieurs spécialisés en bacilloscopie : 10 lames pour chaque laboratoire– il est demandé à chacun d'eux de commenter la qualité des lames en tant que frottis simulés pour la recherche des BAAR, ainsi que l'aspect des neutrophiles et des bactéries;
    - toutes les lames supplémentaires sont conservées à 4 ºC; chaque semaine, l'une d'elle est colorée et examinée;
    - les lames sont conservées par le laboratoire organisateur de l'EEQ jusqu'à ce que le bilan des réponses et les résultats du CQ soient concordants.
5. Echec du CQ :
    - Il faut 100% de conformité : les lames 1 à 13 doivent présenter les caractéristiques requises pour l'enquête;
    - S'il y a un problème avec une seule lame, différer l'envoi et étudier le type de problème;
    - Si on constate un défaut dans la préparation des frottis, décaler l'envoi et recommencer la procédure depuis le départ.

FICHE DE PAILLASSE

CONTROLE QUALITE DES FROTTIS SIMULES DE CRACHAT

Numéro d'enquête : _____
Microorganisme utilisé : _____
Densité optique : _____
Dilution finale utilisée : _____
Date de préparation du frottis : _____

Vérification de la stérilité

Milieu/réactif	24 h d'incubation	48 h d'incubation
Milieu minimum essentiel		
Polymorphprep™		
Mueller-Hinton		
PBS pH 7,2		

Evaluation de la coloration de Gram

Il faut évaluer la taille, la forme et les caractéristiques de coloration des bactéries après coloration de Gram et s'assurer que le frottis correspond bien à ce que l'on pourrait attendre d'un véritable échantillon clinique de crachat.

Numéro de lame	Date	PN/champ	Bactéries/hpf	Cellules épithéliales/ champ*	Aspects des PN	Aspect des bactéries	Aspect du fond
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							

*faible grossissement

Une fois le CQ ci-dessus réalisé et réussi : les frottis sont envoyés à 3 techniciens de microbiologie clinique/microbiologistes indépendants pour confirmation et interprétation clinique; ils remplissent des formulaires séparés de réponse qu'ils renvoient au laboratoire organisateur de l'EEQ où ils seront archivés.

Frottis supplémentaires à examiner chaque semaine

Numéro de lame	Date	PNs/champ	Bactéries/ champ	Cellules épithéliales/ champ*	Aspect des PN	Aspect des bactéries	Aspect du fond
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							

*faible grossissement

Annexe 4B

Procédures opératoires standardisées pour l'EEQ de la bacilloscopie

Numéro de POS	Titre	Page
OMS 0012	Organisation du programme d'EEQ de la bacilloscopie	125
OMS 0013	Préparation de frottis de référence positifs pour le programme OMS/NICD d'EEQ de la bacilloscopie	129

Procédure OMS 0012	**ORGANISATION DU PROGRAMME D'EEQ DE LA BACILLOSCOPIE**		
Préparée par	**Date d'adoption**	**Signature**	
Kerrigan McCarthy			

Date de révision	**Signature à la révision**	**Date de relecture**	**Signature à la relecture**

Distribué à	**Nombre de copies**	**Distribué à**	**Nombre de copies**
Lab. de microbiologie organisateur de l'EEQ	1		

Objet :

Détailler les processus d'organisation requis pour le fonctionnement de l'EEQ de la bacilloscopie (diagnostic de la tuberculose). Cette POS a été élaborée d'après les recommandations de l'OMS, de l'IUATLD (Union internationale contre la tuberculose et les maladies respiratoires) et du CDC, publiées en septembre 2002 par l'Association des Laboratoires de Santé Publique : '*External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy*'.

Théorie :

L'EEQ, désignée ici par l'OMS comme un examen de panel (« panel testing »), est une méthode conseillée pour déterminer si un technicien de laboratoire réalise correctement la bacilloscopie [examen microscopique pour la recherche des BAAR (bacilles acido-alcoolo-résistants)]. D'autres méthodes d'EEQ consistent à relire en aveugle des lames ou à évaluer sur site le laboratoire. Le « panel testing » permet une évaluation rapide des défauts flagrants du processus diagnostique de la tuberculose et facilite également l'identification des facteurs contribuant aux erreurs. Par ailleurs, il permet d'évaluer la formation des microscopistes. Les avantages et les inconvénients du « panel testing » sont indiqués ci-après.

"panel testing" pour la bacilloscopie	
Avantages	**Inconvénients**
• N'a pas d'impact sur la charge de travail d'un laboratoire périphérique • Améliore la crédibilité du laboratoire • Possibilité d'obtenir une évaluation rapide de toute une zone • Utilisation des résultats pour identifier l'origine des problèmes responsables d'une performance médiocre	• N'évalue pas la performance du laboratoire au quotidien • N'encourage pas forcément le personnel à améliorer sa performance au quotidien

Contexte :

Le programme se sert du système de notation de l'IUATLD pour classer les lames comme l'illustre le Tableau 1 ci-dessous. Il utilise uniquement la méthode de coloration de Ziehl-Neelsen. Toutefois, les laboratoires participants sont libres de choisir la technique de coloration de leur choix pour les lames non colorées.

Tableau 1
Système de classification de l'IUATLD des lames de bacilloscopie

Coloration Carbol-fuchsine des lames, immersion à huile (1000x)	Compte rendu
Aucun BAAR	Absence de bacilles acido-alcoolo-résistants
1 à 9 BAAR/100 champs	Noter le nombre exact (très faible)
10 à 99 BAAR/100 champs	1+
1 à 10 BAAR/champ	2+
> 10 BAAR/champ	3+

BAAR, bacilles acido-alcoolo-résistants

Vue d'ensemble du programme d'EEQ :

- Les frottis tests sont préparés par le laboratoire organisateur de l'EEQ conformément à la POS 0013.
- Une partie du lot préparé est destinée au contrôle qualité conformément à la POS 0013.
- Trois enquêtes par an sont envoyées aux laboratoires participants. Chaque enquête comporte huit lames (dont 4 colorées avec la technique de Ziehl-Neelsen), une notice explicative et des formulaires de réponse.
- Les enquêtes sont distribuées par les réseaux de distribution existants.
- Les formulaires de réponse, accompagnés des lames, sont renvoyés au laboratoire organisateur de l'EEQ du NICD pour être évalués.

- Les réponses sont évaluées conformément à cette POS.
- Des comptes rendus détaillant la performance des laboratoires sont distribués aux laboratoires participants et aux autorités compétentes.
- En cas de faible performance, les laboratoires sont sensés prendre des actions correctives.

Procédure :

Préparation et contrôle qualité des frottis

Se reporter à la POS 0013.

Nombre et type de frottis

- Chaque enquête comporte 8 lames, dont 4 colorées par la technique de Ziehl-Neelsen et 4 non colorées.
- Tous les laboratoires reçoivent le même matériel d'enquête.
- L'enquête comporte des frottis à différents degrés de positivité, afin d'évaluer la capacité des techniciens à classer correctement les lames positives.
- La composition des enquêtes varie à chaque fois et le degré de complexité s'intensifie au cours du temps.

Communication avec les laboratoires

En Annexe 5 de ce document, on trouvera respectivement un exemple de notice d'instructions et de formulaire de réponse pour consigner les résultats.

Temps accordé aux laboratoires pour procéder aux tests et rendre leurs résultats

Les laboratoires sont sensés rendre leurs résultats d'analyse avant la date de clôture de l'enquête, généralement fixée à quatre semaines après l'envoi des enquêtes. Les résultats retardataires sont acceptés, mais les laboratoires sont pénalisés.

Evaluation et interprétation des résultats

Les résultats sont saisis dans une base de données Access® pour la bacilloscopie. Les erreurs sont ainsi classifiées automatiquement par le programme de la banque de données selon les critères présentés dans le Tableau 2. Une note est attribuée en respectant le système de notation présenté Tableau 3. Une note est considérée acceptable à partir de 65.

Tableau 2
Classification des erreurs

Résultat du labo participant	Résultat attendu par l'organisateur de l'EEQ				
	Négatif	1-9 BAAR/100 champs	1+	2+	3+
Négatif	Correct	FNF	FNE	FNE	FNE
1-9 BAAR/100 champs	FPF	Correct	Correct	EQ	EQ
1+	FPE	Correct	Correct	Correct	EQ
2+	FPE	EQ	Correct	Correct	Correct
3+	FPE	EQ	EQ	Correct	Correct

Interprétation :

EQ = Erreur de quantification	Erreur minime
FNF = Faux Négatif Faible	Erreur minime
FPF = Faux Positif Faible	Erreur minime

FNE = Faux Négatif Elevé **Erreur importante**
FPE = Faux Positif Elevé **Erreur importante**

Tableau 3
Système de notation

Classification	Interprétation	Note
Réponse correcte	Pas d'erreur	10 points
EQ	Erreur mineure	10 points
FNF, FPF	Erreur mineure	5 points
FNE, FPE	Erreur importante	0 point

Retour d'information
Chaque laboratoire participant reçoit un compte rendu contenant à la fois ses résultats individuels et la performance globale de tous les laboratoires évalués. On trouvera des modèles de compte rendu en annexe 5 de ce document.

Responsabilité :

La responsabilité générale du programme d'EEQ de la tuberculose repose sur le chef du laboratoire organisateur de l'EEQ. Le technicien senior du laboratoire organisateur est responsable de la préparation des frottis, de la finalisation de la documentation les accompagnant, de la saisie des réponses et de la vérification des comptes rendus. Ces derniers sont vérifiés par le chef du laboratoire organisateur avant d'être envoyés. Le responsable du laboratoire organisateur est chargé d'entretenir la base de données. C'est le laboratoire organisateur qui est chargé de l'emballage et de l'envoi des enquêtes. Toute divergence de résultat devra être vérifiée par le technicien senior du laboratoire organisateur et par un microscopiste du Laboratoire Central NHLS pour la Tuberculose.

Procédure OMS 0013	**PREPARATION DE FROTTIS DE REFERENCE POSITIFS POUR LE PROGRAMME NICD D'EEQ DE LA BACILLOSCOPIE**

Préparée par	**Date d'adoption**	**Signature**

Date de révision	**Signature à la révision**	**Date de relecture**	**Signature à la relecture**
		9 septembre 2004	

Distribué à	**Nombre de copies**	**Distribué à**	**Nombre de copies**
Lab. de microbiologie organisateur de l'EEQ	1		

Objet :

Décrire les procédures nécessaires pour préparer et assurer la qualité des frottis de référence destinés au programme NICD d'EEQ de la bacilloscopie.

Théorie :

La POS 0012 décrit le rôle de l'EEQ dans l'assurance qualité de la bacilloscopie. La préparation d'un matériel de référence de qualité constante fait partie intégrante du bon déroulement d'un programme d'EEQ de la bacilloscopie. Cette POS a été adaptée d'après les recommandations de l'OMS, de l'IUATLD (Union internationale contre la tuberculose et les maladies respiratoires) et du CDC, publiées en septembre 2002 par l'Association des Laboratoires de Santé Publique : '*External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy*'.

Procédure :

Matériel requis :

Tubes plastiques à centrifuger de 50 ml
Solution de soude à 4% (NaOH), stérile
Vortex
Bain-marie à 55–60 ^{o}C
Tampon phosphate (PBS) pH 6,8
Centrifugeuse
Lames de microscope
Réactifs pour la coloration des bacilles acido-alcoolo-résistants (carbol-fuchsine, bleu d'éthylène et solution acide-alcool à 3%)
Pipettes plastiques graduées stériles jetables

Micropipettes de 20 µl et 1000 µl, embouts jaunes et bleus
Désinfectant 1% Hycolin

Matériel de référence BAAR positif :
Le NHLS TB Laboratory, Central Gauteng, fournit au laboratoire organisateur de l'EEQ le volume approprié de crachat concentré, stérilisé à la chaleur, qui a été rassemblé à partir de plusieurs échantillons classés 3+ selon la classification de l'IUATLD (International Union against Tuberculosis and Lung Diseases).

Matériel de référence BAAR négatif :
Le NHLS TB Laboratory, Central Gauteng, fournit au laboratoire organisateur de l'EEQ le volume approprié de crachat concentré, stérilisé à la chaleur, qui a été rassemblé à partir de plusieurs échantillons dans lequel aucun BAAR n'a été observé.

Préparation du stock BAAR positif :

- étiqueter les tubes plastiques à centrifuger de 50 ml de 1 à 10 comme '**BAAR Positif'**
- faire décanter dans chacun de ces tubes 1 ml du matériel de référence BAAR positif
- ajouter 1 ml de solution NaOH 4% dans chaque tube (concentration finale NaOH 2%)
- vortexer vigoureusement chaque tube pendant 4–5 min
- ajouter 20 ml de PBS pH 6,8 et bien mélanger
- incuber tous les tubes au bain-marie (de préférence avec agitation) 30 min à 55–60 ^{o}C; si le bain-marie ne dispose pas d'agitateur, mélanger de temps en temps les tubes en les renversant
- dans chaque tube, compléter le volume à 40 ml avec du PBS pH 6,8
- centrifuger 20 min à 3000 tours/mn, à température ambiante
- ôter soigneusement le surnageant ; remettre les culots en suspension dans 0,5–1 ml de PBS pH 6,8; rassembler tous les culots dans un seul tube à centrifuger étiqueté 'stock BAAR positif'; vortexer 30 s pour bien mélanger les culots.

Préparation du stock BAAR négatif :

- étiqueter les tubes plastiques à centrifuger de 50 ml de 1 à 10 comme '**BAAR Négatif'**
- faire décanter dans chacun de ces tubes 1 ml du matériel de référence BAAR négatif
- ajouter 1 ml de solution NaOH 4% dans chaque tube (concentration finale NaOH 2%)
- vortexer vigoureusement chaque tube pendant 4–5 min
- ajouter 20 ml de PBS pH 6,8 et bien mélanger
- incuber tous les tubes au bain-marie (de préférence avec agitation) 30 min à 55–60 ^{o}C; si le bain-marie ne dispose pas d'agitateur, mélanger de temps en temps les tubes en les renversant
- dans chaque tube, compléter le volume à 40 ml avec du PBS pH 6,8
- centrifuger 20 min à 3000 tours/mn, à température ambiante

- ôter soigneusement le surnageant ; remettre les culots en suspension dans 0,5–1 ml de PBS pH 6,8; rassembler tous les culots dans un seul tube à centrifuger étiqueté 'stock BAAR négatif'; vortexer 30 s pour bien mélanger les culots.

Evaluation des stocks de préparations BAAR positive et négative :

- marquer les lames à l'aide d'un crayon à papier 'stock BAAR positif' et 'stock BAAR négatif'
- à l'aide d'une oese standard (0,001 ml), faire 2–3 frottis tests à partir des matériels BAAR positif et négatif;
- sécher et fixer les frottis
- colorer les frottis avec la méthode de Ziehl-Neelsen
- examiner les lames au microscope sous objectif 100x à immersion à l'huile;
- pour une préparation de frottis optimale, on doit obtenir 50–60 BAAR par champ microscopique pour le stock positif et aucun BAAR pour le stock négatif
- noter le nombre exact de BAAR par champ sur le tube de stock BAAR positif.

Préparation du matériel de fond pour les lames de bacilloscopie avant l'ajout du matériel positif (se référer à la POS OMS 0011) :

Pour préparer 2ml de matériel de fond, il faut :
1,0 ml de stock négatif
0,5 ml de fixateur BAAR
0.5 ml d'une dilution au 1 :2 de blanc d'œuf dans du PBS
des cellules épithéliales et des polynucléaires neutrophiles

Méthode de dilution :
Diluer le stock de matériel positif avec le stock de matériel de fond pour réduire le nombre de BAAR par champ microscopique ou pour 100 champs, de façon à rentrer dans la gamme des valeurs de l'IUATLD (Tableau 1).

Tableau 1

Quantification IUATLD et quantité de BAAR attendue dans le matériel de référence

Classification IUATLD	Quantification IUATLD	Quantification du matériel de référence
Négatif	0 BAAR/100 champs	Absence de bacille acido-alcoolo-résistant
Nombre exact	1–9 BAAR/100 champs	5 BAAR/100 champs
1+	10–99 BAAR/100 champs	50 BAAR/100 champs
2+	1–10 BAAR/champ	5 BAAR/champ
3+	> 10 BAAR/champ	20 BAAR/champ

Pour la préparation de matériel 3+ :

- Préparer d'abord une dilution au 1 :2 du matériel de fond et du matériel de référence positif. Préparer quelques lames pour la coloration et compter le nombre de BAAR par champ.
- Calibrer une pipette Pasteur ordinaire pour connaître le nombre de gouttes présentes dans 1 ml de stock (généralement 19–20 gouttes).
- Utiliser la formule suivante pour calculer le nombre de gouttes de matériel positif qu'il faut ajouter.

$$\text{Nombre de gouttes de crachat positif à ajouter (N)} = \left(\frac{\text{Concentration souhaitée de BAAR (CS)}}{\text{Concentration réelle de BAAR (CR)}} \right) * \text{Quantité de gouttes dans le volume de crachat requis (A)}$$

La formule ci-dessus et la méthode de dilution s'appliquent à la préparation des frottis positifs 1+ et 2+.

Exemple 1 :
Préparer 5 ml de suspension pour faire des frottis 2+

Considérant que :

- la concentration en BAAR dans la suspension stock (AC) est de 65 BAAR/champ
- 5 ml de suspension (A) contiennent 75 gouttes (1ml contient 15 gouttes)
- Les suspensions 2+ doivent avoir une concentration en BAAR (CS) de 5 BAAR/100 champs.

Compléter la formule :

$$\text{Nombre de gouttes de crachat positif à ajouter (N)} = \frac{5 \text{ BAAR}}{65 \text{ BAAR}} * 75 \text{ gouttes}$$
$$= 5{,}7 \text{ gouttes}$$
$$= 6 \text{ gouttes}$$

A l'aide d'une pipette Pasteur, prélever 6 gouttes du stock de matériel positif, mélanger avec 69 (75–6) gouttes de préparation de fond et vortexer vigoureusement. Etiqueter le tube 'solution stock 2+' et l'utiliser aussitôt pour préparer les frottis.

Exemple 2 :

Préparer 5 ml de suspension pour faire des lames avec un très petit nombre de BAAR/100 champs (i.e. le plus petit nombre quantifié possible de BAAR)

Considérant que :

- la concentration en BAAR dans la suspension stock (AC) est de 65 BAAR/champ
- 5 ml de suspension (A) contiennent 75 gouttes (1ml contient 15 gouttes)
- la suspension doit avoir une concentration en BAAR (CS) de 5 BAAR/champ.

Compléter la formule :

$$\text{Nombre de gouttes de crachat positif à ajouter (N)} = \frac{\text{5 BAAR/100 champs}}{\text{6500 BAAR/100 champs}} * \text{75 gouttes}$$

$$= \text{0,06 goutte}$$

Si 1ml contient 15 gouttes, alors 1 goutte = 1/15 ml, i.e. 1 goutte = 0,07 ml

0,06 d'une goutte = 0,07 x 0,06 ml
= 0,004 ml
= 4 µl

A l'aide d'une pipette Eppendorf, prélever 4 µl de la préparation stock BAAR positive, ajouter 75 gouttes de la préparation BAAR négative, vortexer pour bien mélanger. Etiqueter le tube 'solution stock faible' et l'utiliser aussitôt pour préparer les frottis.

Préparation des lames

- placer la solution stock sur un agitateur magnétique
- préparer et étiqueter le nombre voulu de lames
- à l'aide d'une micropipette graduée standard et d'un embout Eppendorf, transférer 10 µl de matériel sur la lame de façon à avoir un diamètre de 2 cm.
- Fixer les lames à la chaleur sur un séchoir à lames.

Contrôle de qualité interne pour valider les frottis BAAR :

- choisir au hasard dix lames (entre 5 et 10%) dans le lot;
- numéroter les lames de 1 à 10
- colorer les lames avec la méthode de Ziehl-Neelsen;
- remplir le formulaire en annexe de cette POS (il devra être enregistré dans le tableau de résultats; étiqueter les frottis selon leur date de préparation et le numéro de série du lot (par exemple 280204-1 pour le premier lot); faire la liste du nombre de frottis préparés en précisant pour chacun sa date de préparation
- examiner les lames au microscope sous immersion à huile; noter les résultats dans la feuille réservée à cet effet
- demander à un autre microscopiste, qui ne connaît pas les résultats, d'examiner le même set de frottis
- calculer l'écart type (ET) et la concordance selon la formule suivante :

$$ET = \sqrt{\frac{(x - \overline{x})^2}{(n-1)}}$$ concordance = moyenne – (ET*2)

- calculer le résultat dans la colonne réservée à la concordance à l'aide de la formule suivante
  M – 2ET
  Si M-2ET > 0, alors la concordance est suffisante
  Si M-2SD < 0, alors la concordance est insuffisante.

Contrôle de qualité externe pour la validation des frottis BAAR (vérification au hasard) :

- choisir au hasard dix lames dans deux lots (i.e. 5 lames du lot A et 5 lames du lot C);
- Les lames colorées et non colorées sont toutes numérotées et envoyées à 3 laboratoires de référence avec la documentation appropriée;
- la procédure ci-dessus est réalisée une semaine avant le démarrage du programme d'EEQ de la bacilloscopie;
- les résultats sont ensuite rassemblés dans un "formulaire de résultats de la Bacilloscopie" et évalués; s'ils sont acceptables, le programme s'appuie sur un CQ acceptable. En revanche, si le CQ échoue, le lot est détruit;
- résultats acceptables : calculer l'écart type (ET) et la concordance selon la formule suivante :

  $$ET = \sqrt{\frac{(x - \overline{x})^2}{(n-1)}}$$ concordance = moyenne – (ET*2)

- calculer le résultat dans la colonne réservée à la concordance à l'aide de la formule suivante
  M – 2ET
  Si M-2ET > 0, alors la concordance est suffisante
  Si M-2SD < 0, alors la concordance est insuffisante

Annexe

Feuille de validation des lots de frottis pour la recherche des BAAR

Lot	Préparation de lame			Evaluation des lames													
	Nombre préparées	Date	Rés. Att.[a]	Résultats des analyses (BAAR pour 100 champs)											ET[b]	Conc[c]	Résultat fin
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Moyenne			
*	225	09/09	2+	320	360	410	420	410	460	340	380	330	240	367	63.08	240.84	Acc[d]

* exemple d'utilisation du tableau

[a] résultat attendu

[b] écart type

[c] concordance

[d] acceptable

Annexe 4C

Procédures opératoires standardisées pour l'EEQ de la microscopie du paludisme

Numéro de POS	Titre	Page
OMS 0014	Choix & préparation des frottis sanguins pour l'EEQ	137
OMS 0015	Technique de coloration de Giemsa en masse des lames de sang pour l'EEQ	146
OMS 0016	Quantification de la parasitémie paludique	150
OMS 0017	Détection antigènique de *P. falciparum* avec le test immunochromatographique ICT	154

Procédure OMS 0014	**CHOIX ET PREPARATION DES FROTTIS SANGUINS POUR L'EEQ**		
Préparée par	**Date d'adoption**	**Signature**	
Leigh Dini/ John Frean			

Date de révision	**Signature à la révision**	**Date de relecture**	**Signature à la relecture**

Distribué à	**Nombre de copies**	**Distribué à**	**Nombre de copies**
Lab. de microbiologie organisateur de l'EEQ	1		

Objet

Cette POS décrit les critères de sélection des échantillons de sang positifs pour le paludisme, destinés aux enquêtes d'EEQ de la microscopie du paludisme. Elle décrit également la préparation des frottis sanguins.

Principe

Des échantillons sanguins de bonne qualité, cliniquement pertinents, sont sélectionnés et preparés pour les enquêtes d'EEQ qui vont tester la qualité des participants.

Contexte et introduction

Les échantillons de paludisme sont sélectionnés pour leur inclusion dans des enquêtes d'EEQ sur la base d'un certain nombre de critères. Ceux-ci incluent la qualité du specimen, l'espèce de paludisme et la charge (ou la densité) de parasites présents et le type d'échantillons requis. Après sélection, les échantillons sont préparés de façon appropriée pour la distribution aux participants. Un certain nombre d'étapes de contrôle de qualité sont réalisées pendant la sélection et la préparation du materiel d'EEQ. Une liste du matériel d'EEQ disponible avec les détails des spécimens et de leur origine sont conservés en archive.

Responsabilité

Le technicien ou le scientifique est responsable du choix et de la préparation du matériel d'EEQ.

Collecte et manipulation des échantillons

Le matériel d'EEQ provient d'échantillons cliniques issus de volontaires. Quelle que soit son origine, tout échantillon doit être considéré comme potentiellement infectieux et traité comme tel. Il est préférable que les échantillons de sang sur EDTA aient été prélevés depuis moins de 4 heures. Les échantillons vieux de plus de 8 heures ne conviennent pas. Au moins 2 ml de sang prélevé sur EDTA est requis.

Type de prélèvement

Sang sur EDTA

Equipement et matériel

Alcool à 70%

Vacutainer ou seringue avec aiguille (gauge 21 ou 23)

Tube avec EDTA

Gants

Lames de verre

Pipettes Pasteur

Microscope binoculaire muni d'objectifs x10, x40, x50 et x100

Micropipette 2–20µl (des pipettes différentes sont utilisées pour les échantillons négatifs et positifs afin d'éviter une contamination)

Embouts de pipette

Photocopies des gabarits pour gouttes épaisses et frottis minces

Cuvette

Plaque chauffante 50–60 °C

Liquide vaisselle

Compresse de gaze ou linge qui ne peluche pas

Boîtes à lames

Silica gel (produit dessiccant)

Contrôle qualité

Les étapes de contrôle qualité font partie de la procédure de sélection et de préparation du matériel d'EEQ.

Précautions

La manipulation de sang exige que soient prises des précautions universelles, notamment le port de gants et de lunettes de protection.

Procédure

I. Sélection du matériel d'EEQ

Le choix des échantillons sanguins s'appuie sur les critères suivants :

- Fraîcheur et qualité de l'échantillon : les prélèvements sanguins doivent être vieux de moins de 8 heures (de préférence moins de 4 heures). Utiliser un seul donneur par lot de frottis préparé.
- Charge ou densité en parasites : dans la plupart des cas, la concentration finale de parasites dans l'échantillon test devra être telle qu'un technicien de laboratoire moyennement qualifié et expérimenté puisse déceler leur présence en un temps raisonnable.
- Aspect des parasites : les parasites doivent être aisément reconnaissables avec seulement quelques formes anormales ou dégénératives présentes dans l'échantillon test. Les patients devraient être prélevés avant tout traitement.
- Espèce du parasite : le choix du type de parasite est fonction des analyses que l'on souhaite évaluer et des difficultés rencontrées lors des précédentes enquêtes d'évaluation.
- Opportunité pour l'enquête : les échantillons doivent être adaptés aux objectifs de l'enquête en cours.

II. Consentement des donneurs et prise de sang

Procédure exigée pour les prélèvements de sang exceptionnels destinés au diagnostic du paludisme.

1. Obtenir le consentement éclairé du donneur en utilisant l'annexe A ci-joint.
2. Suivre la procédure standardisée pour la prise de sang dans une veine antécubitale.
3. Nettoyer le site de ponction à l'alcool et laisser sécher à l'air.
4. Utiliser une aiguille jetable stérile. Prélever 2,5–3ml de sang dans un tube-EDTA et mélanger doucement en renversant le tube.
5. Utiliser un seul donneur de sang par lot de frottis. Préparer les frottis aussitôt que possible après le prélèvement (dans les 4 heures qui suivent la prise de sang).

III. Procédure de nettoyage des lames

1. Ouvrir un paquet de lames neuves.
2. Placer les lames dans une cuvette d'eau savonneuse (liquide vaisselle) et laisser tremper 2 heures minimum.
3. Rincer les lames à l'eau du robinet.
4. Les sécher avec une compresse de gaz ou un linge qui ne peluche pas.
5. Laisser sécher complètement sur la plaque chauffante à 50–60°C.
6. Conserver les lames dans une boîte à lames en présence de Silica gel.

IV. Préparation des frottis sanguins

1. Voir le diagramme de cette procédure en annexe B. Remplir une fiche de préparation (annexe C) pour chaque échantillon destiné à l'EEQ. Y attacher une copie du rapport de laboratoire concernant le patient.
2. Faire des photocopies des gabarits pour les gouttes épaisses (annexe D) et les frottis minces (annexe E).
3. Placer les lames de verre sur ces gabarits et marquer un "C" sur la partie en verre dépoli. Préparer ainsi 200 lames pour frottis mince et 200 pour goutte épaisse. Utiliser des gants pour manipuler les lames afin d'éviter de laisser des traces de gras.
4. Evaluer le volume de sang dans le tube EDTA. Il faut environ 2 ml pour réaliser 200 frottis minces et 200 gouttes épaisses, y compris quelques frottis supplémentaires ratés.
5. Mélanger régulièrement le sang pendant toute la durée de préparation des lames pour assurer une dispersion uniforme des parasites. A l'aide d'une micropipette, déposer 2 µl de sang/frottis mince au centre de la ligne du gabarit. Etaler immédiatement avec un étaleur avant que le sang ne sèche. Vérifier la bonne qualité du frottis et éliminer ceux qui ne sont pas corrects (par exemple frottis aux bords irréguliers, bulle d'air, caillots, rayures ou autres défauts).
6. A l'aide d'une micropipette, déposer 6 µl de sang/goutte épaisse. Placer la goutte au centre du cercle du gabarit. Avec un étaleur, étaler le sang sur un cercle régulier de 12 mm de diamètre. S'il y a des bulles, les casser avec l'angle d'une autre lame. Eliminer les gouttes épaisses de mauvaise qualité (par exemple. frottis irréguliers, bulle d'air, caillots, rayures ou autres défauts).
7. Jeter les embouts de pipette et les étaleurs dès que des caillots commencent à se former et que la qualité des frottis commence à se détériorer.
8. Laisser les frottis minces sécher à l'horizontale pendant 30 minutes au moins, puis vérifier la bonne qualité des extrémités du frottis. Les fixer dans du méthanol 100% pendant 5 secondes et laisser sécher à l'air. Laisser sécher les gouttes épaisses à l'horizontale pendant toute une nuit et ne pas les fixer. Ne jamais sécher les frottis à la chaleur. Les protéger de la poussière et des insectes jusqu'à ce qu'ils soient rangés.
9. Colorer les frottis selon la procédure de Giemsa en masse (voir procédure OMS 0015).
10. Ranger les frottis sanguins colorés dans une boîte à lames qui sera étiquetée avec le nom du patient ou le numéro d'hospitalisation.
11. Jeter les gabarits en papier et les étaleurs car ils pourraient contaminer le lot de frottis suivant.

Bibliographie

Hydas Inc/NAMRU-2. 2005. Creation of validated blood smears for the microscopic diagNonsis of malaria. Hydas Inc. Pennsylvania USA and NAMRU-2 Jakarta Indonesia. Supported by NIAID contract NON1-AI-85355 (MR4).

Procédure OMS 0014	**SELECTION ET PREPARATION DES FROTTIS SANGUINS POUR L'EEQ**
Annexe A :	**Consentement éclairé des donneurs**

Information :

Bonjour. Je m'appelle__(nom du phlébotomiste)__et j'aimerai savoir si vous seriez d'accord pour donner 3 ml de sang veineux (moins d'une cuillère à café). Nous voudrions faire des frottis sanguins à des fins d'enseignement. Cette démarche est complètement volontaire. Si vous ne souhaitez pas être volontaire, cela n'affectera en rien votre traitement. N'hésitez pas à poser des questions. Merci de donner un peu de votre temps. Veuillez trouver ci-dessous le formulaire que vous devez signer si vous acceptez de nous donner un échantillon de sang.

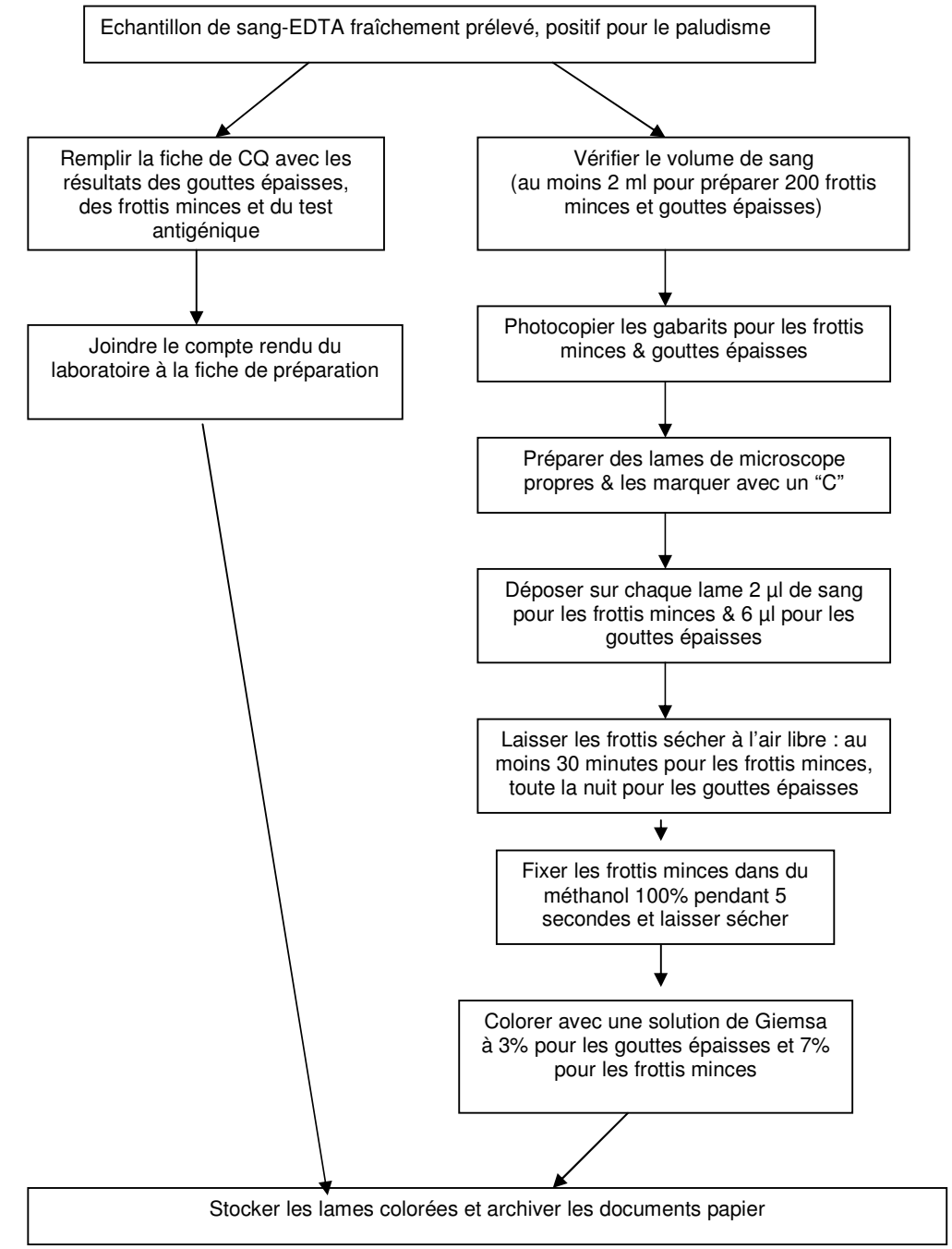
Consentement pour une prise de sang :

Nom du donneur & signature :	Date :
Nom du témoin & signature :	Date :

Nom de la personne procédant à l'entretien & signature :

_____

Procédure OMS 0014	**SELECTION ET PREPARATION DES FROTTIS SANGUINS POUR L'EEQ**
Annexe B :	**Préparation des frottis sanguins pour l'EEQ**



Procédure OMS 0014	**SELECTION ET PREPARATION DES FROTTIS SANGUINS POUR L'EEQ**
Annexe C :	**Fiche de préparation d'échantillon pour le programme d'EEQ**

Joindre une copie du compte rendu de laboratoire.

Parasites sanguins présents (espèces et stades observés) :_____

_____

_____

Parasitémie : _____% ou parasites/µl.

Résultat du test antigénique *P. falciparum* : ☐ positif ☐ négatif

Antécédents du patient :_____

_____

_____

Nombre de gouttes épaisses préparées : 200 Autre : _____

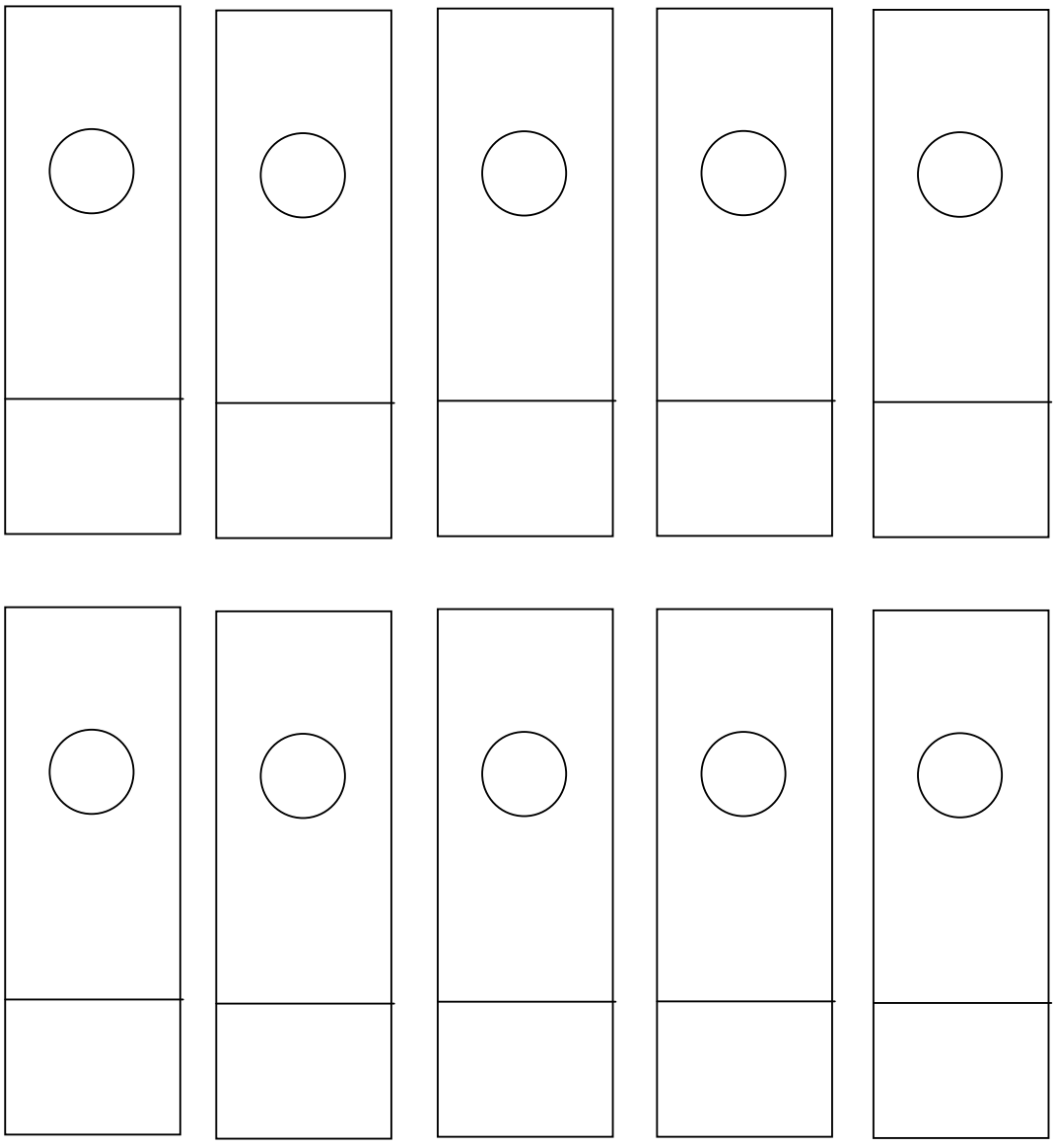
Nombre de frottis minces préparés : 200 Autre : _____

Technicien qui a préparé les lames :_____

Signature :_____ Date :_____

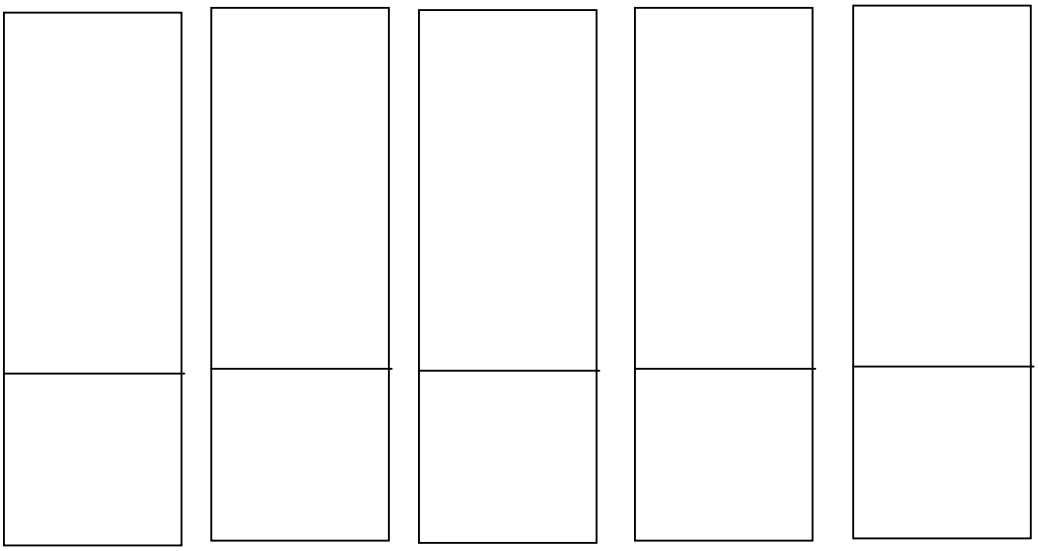
Procédure OMS 0014	**SELECTION ET PREPARATION DES FROTTIS SANGUINS POUR L'EEQ**
Annexe D :	**Gabarit pour goutte épaisse**

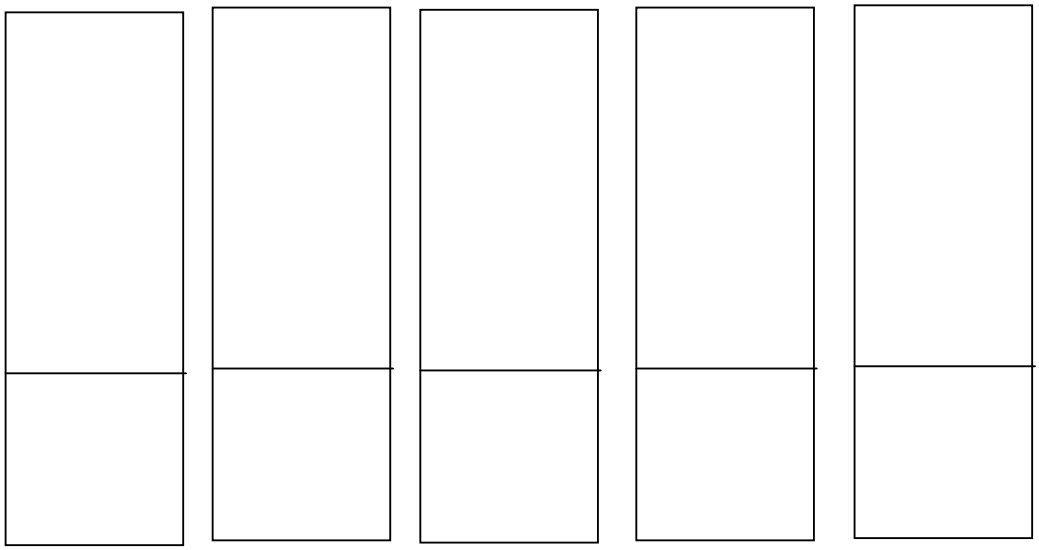
Gabarit pour goutte épaisse; utiliser 6 µl de sang (diamètre du cercle :12 mm)



Procédure OMS 0014	**SELECTION ET PREPARATION DES FROTTIS SANGUINS POUR L'EEQ**
Annexe E :	**Gabarit pour frottis mince**

Gabarit pour frottis sanguin; utiliser 2 µl de sang.





Procédure OMS 0015	**TECHNIQUE DE COLORATION DE GIEMSA EN MASSE DES LAMES DE SANG POUR L'EEQ**	
Préparée par	**Date d'adoption**	**Signature**
Leigh Dini & Rita van Deventer		

Date de révision	**Signature à la révision**	**Date de relecture**	**Signature à la relecture**

Distribué à	**Nombre de copies**	**Distribué à**	**Nombre de copies**
Lab. de microbiologie organisateur de l'EEQ	1		

Objectif

Cette POS décrit la méthode utilisée pour colorer un large nombre d'échantillons de lames de sang en un seul temps avec du Giemsa pour les besoins de l'Evaluation Externe de la Qualité.

Principe

Des lames bien colorées sont nécessaires pour l'EEQ. Il s'agit d'une méthode utilisée pour colorer un large nombre d'échantillons de lames de sang en un seul temps avec du Giemsa.

Responsabilité

Le technicien medical est responsable de la coloration et de l'évaluation de la qualité des lames.

Précautions de sécurité

Des gants doivent être portés tout au long de la procédure. Le methanol et le Giemsa sont hautement inflammables et toxiques si inhalés ou avalés.

Type de specimen, collection et manipulation

Type de specimen : frottis minces et gouttes épaisses sur lames de verre.
Les frottis sanguins devraient être fixés au cours des premiers jours de production.
Toutes les lames devraient être colorées dans les 10 jours de production.

Equipement et matériel

Colorant de Giemsa
Tampon phosphate de Sorensen's pH 7.2
Eau distillée
Bacs de coloration et cuvettes
Papier filtre Whatman no 1
Eprouvette graduée

Erlen
Entonnoir
Tuyaux en caoutchouc
Ventilateur

Procédure

1. Contrôler que toutes les lames ont un "C" marqué en haut à droite. Eliminer les lames de qualité médiocre (par exemple extrémités mal délimitées, lames ou frottis abîmés). Soyez prudent et veillez à ne pas rayer les films pendant la manipulation.
2. Colorer les lames d'un seul patient par lot. Utiliser des bacs à coloration et des cuvettes différents pour les lames négatives.
3. Placer les frottis minces et les gouttes épaisses dans des racks séparés.
4. Fixer les frottis minces dans le methanol frais à 100% pendant 5 secondes et sécher à l'air libre. Ne pas fixer les gouttes épaisses.
5. Calculer le volume de solution de Giemsa nécessaire pour le lot de lames à colorer (se référer à l'annexe).
6. Diluer 1 volume de tampon phosphate de Sorensen (pH 7.2) avec 2 volumes d'eau distillée.
7. Utiliser ce tampon dilué pour préparer une solution de Giemsa à 3% pour les gouttes épaisses et à 7% pour les frottis minces.
8. Filtrer la solution de Giemsa à 7% pour les frottis minces à travers un papier filtre de Whatman n°1 avant utilisation.
9. La solution de Giemsa pour les gouttes épaisses n'a pas besoin d'être filtrée.
10. Placer le rack de coloration avec les lames dans une cuvette de coloration dans l'évier, et recouvrir doucement les lames avec la solution appropriée de Giemsa. Laisser colorer pendant 45 minutes.
11. Insérer un tube de caoutchouc attaché à un robinet d'eau froide au fond de la cuvette et ouvrir doucement le robinet pour laisser s'écouler la pellicule iridescente hors de la surface du colorant. La vitesse de l'eau peut être augmentée graduellement de façon à accélérer le processus de rinçage.
12. Continuer de rincer jusqu'à ce que l'eau de la cuvette soit claire.
13. Sécher les lames à l'air libre devant un ventilateur.
14. Contrôler les frottis minces et les gouttes épaisses de chaque lot de coloration sous le microscope de façon à s'assurer que la qualité de la coloration est acceptable. Les hématies sur les gouttes épaisses doivent être lysées, les nuclei des leucocytes doivent être violet foncé et les hématies doivent apparaître gris clair.
15. Eliminer les lames de mauvaise qualité qui ont été abîmées durant la coloration.
16. Placer les lames dans des boîtes de collection, dater et étiqueter celles-ci, et entrer les détails dans un fichier.
17. Conserver les boîtes de collection dans les armoires appropriées.

Sources potentielles de variabilité

Le stock de Giemsa varie en qualité et en concentration. Chaque nouveau lot devrait être contrôlé pour la qualité de la coloration avant usage.

Contrôle de Qualité Interne

Une goutte épaisse et un frottis mince issus de chaque lot de coloration sont contrôlés au microscope afin de s'assurer que la qualité de la coloration est acceptable.

Bibliographie

World Health Organization. 2000. Bench aids for the diagnosis of malaria infections. 2nd edition. WHO Geneva.
John Storey. 2005. Personal communication.

Procedure OMS 0015	**TECHNIQUE DE COLORATION DE GIEMSA EN MASSE DES LAMES DE SANG POUR L'EEQ**
ANNEXE	**Exemple de calcul pour la coloration de Giemsa**

Le colorant de Giemsa est preparé dans un bidon de 3 litres. Le rack de coloration contient 100 lames.
Tout d'abord, préparer 1500 ml de tampon dilué : 1000 ml d'eau distillée + 500 ml de tampon de Sorensen

Frottis minces :
Préparer une solution de Giemsa à 7% : 105 ml de stock de Giemsa completés jusqu'à 1500 ml avec du tampon dilué.

Gouttes épaisses :
Préparer une solution de Giemsa à 3% : 45 ml de stock de Giemsa completés jusqu'à 1500 ml avec du tampon dilué.

Procédure OMS 0016	**QUANTIFICATION DE LA PARASITEMIE PALUDIQUE**		
Préparée par	**Date d'adoption**	**Signature**	
Leigh Dini & John Frean			

Date de révision	**Signature à la révision**	**Date de relecture**	**Signature à la relecture**

Distribué à	**Nombre de copies**	**Distribué à**	**Nombre de copies**
Lab. de microbiologie organisateur de l'EEQ	1		

Objet

Cette POS décrit la méthode de quantification de la parasitémie de *Plasmodium falciparum* dans le sang d'un patient.

Responsabilité

Le technicien est responsable de la quantification de la parasitémie et du compte rendu des résultats.

Contexte et introduction

La parasitémie donne une indication de la charge en parasites. Elle est globalement corrélée avec la gravité de l'état clinique du patient. Ce comptage des parasites est réalisé une fois confirmée la présence de *P. falciparum*. Deux méthodes sont utilisées :

Méthode 1 : dénombrer uniquement les hématies contenant le parasite au stade de trophozoïtes. On ne compte pas celles qui contiennent le parasite aux stades schizontes ou gamétocytes. On compte les hématies situées dans une région du frottis mince la plus proche du bord, là où elles sont réparties de façon régulière et ne se superposent pas.

Méthode 2 : dénombrer sur une goutte épaisse le nombre de parasites par rapport au nombre de leucocytes (en se basant sur le nombre réel de leucocytes ou sur un nombre standard) et exprimer la densité de parasites par microlitre de sang.

NB : la méthode semi-quantitative des croix ("plus") est appropriée uniquement pour la microscopie de routine lorsqu'il s'agit de prendre une décision par rapport au traitement. Elle n'est pas appropriée pour la microscopie de référence, les essais cliniques, le suivi de traitement ou la détermination de la compétence de haut niveau des microscopistes.

Principe

Deux méthodes sont utilisées pour déterminer la parasitémie :

1. le pourcentage d'hématies parasitées dans une zone représentative d'un frottis mince est déterminé en utilisant un microscope avec objectif à immersion à huile
2. un décompte de parasites par rapport au nombre de leucocytes par microlitre de sang sur goutte épaisse

Fréquence de l'analyse

Cette analyse est réalisée à la demande, comme examen de routine du diagnostic du paludisme.

Type d'échantillon

Frottis minces et gouttes épaisses colorés au Giemsa, positifs pour *Plasmodium falciparum* (parasite du paludisme).

Equipement et matériels

Microscope binoculaire avec un objectif x100 à immersion à huile
Oculaire quadrillé de Miller
Frottis minces colorés au Giemsa
Compteurs

Calibration

Le microscope doit avoir servi au cours des 12 derniers mois.

Procédure

Méthode 1 : compte de parasites sur frottis mince

1. A l'aide d'un oculaire quadrillé, dénombrer les hématies dans le petit carré et multiplier ce nombre par 10 pour obtenir une estimation du nombre total d'hématies dans le grand carré. Ne pas compter les cellules qui touchent deux côtés adjacents du petit carré (comme pour le comptage des cellules urinaires ou du LCR)

2. Compter le nombre d'hématies parasitées dans le grand carré, englobant le petit carré. Ne pas compter les cellules qui touchent deux côtés adjacents du grand carré. Compter les hématies parasitées, pas les parasites

3. Passer au champ suivant et répéter le comptage. Continuer jusqu'à ce que le nombre total d'hématies atteigne au moins 1000.

4. Additionner le nombre d'hématies parasitées et calculer le pourcentage de parasitémie en utilisant la formule suivante :

Nombre total d'hématies parasitées x 100 = pourcentage de parasitémie
Nombre total d'hématies

5. Pour estimer le nombre de parasites par µl à partir d'un frottis mince, utiliser cette formule : (nombre d'hématies parasitées ÷ nombre total d'hématies comptées) x $5X10^6$ (ou par la numération exacte des hématies par µl, si disponible) = nombre de parasites par µl.

6. Si on ne dispose pas d'oculaire quadrillé de Miller, il faut faire une estimation précise du nombre d'hématies par champ. Pour rendre cette tâche plus facile, il faut diviser le champ en quadrants par des lignes imaginaires et estimer le nombre de cellules par quadrant. Il faut ensuite compter le nombre d'hématies parasitées dans tout le champ.

Méthode 2 : compte de parasites sur goutte épaisse

La détermination du nombre de parasites/µl de sang est réalisée par le décompte du nombre de parasites sur goutte épaisse par rapport à la numération leucocytaire exacte du patient par µl de sang. Si la numération leucocytaire du patient n'est pas disponible, alors utiliser la valeur moyenne de 8000 ; cependant ceci est moins précis. Trois compteurs sont requis, un pour les leucocytes, un pour les formes asexuées et un pour les gamétocytes.

1. Avant de commencer le compte, faire un examen complet des gouttes épaisses et des frottis minces pour identifier tous les parasites présents.

2. Sur la goutte épiaisse, trouver un champ avec 12 leucocytes ou plus et commencer le décompte ici.

3. Compter séparément le nombre de parasites sexués et asexués jusqu'à atteindre le champ contenant le 200ème leucocyte (de nombreux experts pensent qu'un minimum de 500 leucocytes devraient être comptés de façon à être plus exact).

4. Dans ce champ, compter le nombre de leucocytes présents. Ainsi, le nombre de leucocytes peut être légèrement supérieur à 200.

5. Si 10 parasites ou plus ont été trouvés, alors calculer les résultats comme suit :
   (Nombre de parasites comptés ÷ nombre de leucocytes comptés) x 8000 (ou numération leucocytaire du patient) = nombre de parasites/µl de sang

6. Si après le décompte du 200ème leucocyte le nombre de parasites est inférieur ou égal à 9, alors continuer jusqu'à ce que vous atteigniez au moins 500 leucocytes et utiliser la formule ci-dessus pour calculer le résultat.

7. Enregistrer le compte des formes asexuées de *P. falciparum* séparément du compte de gamétocytes.

Limites de la méthode

Généralement, seul *Plasmodium falciparum* est quantifié. Aucune autre espèce paludéenne ne l'est, car les espèces autres que *falciparum* atteignent rarement une densité supérieure à 1% et le renseignement est inutile cliniquement parlant.

Bibliographie

1. Gilles HM & Warrell DA. (1993). Bruce-Chwatt's essential malariology, 3rd Ed. Edward Arnold, London.
2. Hydas Inc/NAMRU-2. 2005. Creation of validated blood smears for the microscopic diagnosis of malaria. Hydas Inc. Pennsylvania USA and NAMRU-2 Jakarta Indonesia. Supported by NIAID contract NO1-AI-85355 (MR4).
3. WHO. 1991. Basic malaria microscopy, Part 1 Learner's guide. WHO Geneva.
4. Ken Lilley. 2006. Australian Army Malaria Institute. Personal communication.

Procédure OMS 0017	**DETECTION ANTIGENIQUE DE P. FALCIPARUM AVEC LE TEST IMMUNOCHROMATOGRAPHIQUE ICT**		
Préparée par	**Date d'adoption**	**Signature**	
Leigh Dini & John Frean			

Date de révision	**Signature à la révision**	**Date de relecture**	**Signature à la relecture**

Distribué à	**Nombre de copies**	**Distribué à**	**Nombre de copies**
Lab. de microbiologie organisateur de l'EEQ	1		

Objet

Cette POS décrit la détection antigénique de *Plasmodium falciparum* à l'aide du test immunochromatographique ICT.

Principe

Le test repose sur l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre la protéine II riche en histidine (HRPII) de *P. falciparum*. Cet anticorps est immobilisé sur une bande test de nitrocellulose.

Contexte et introduction

Le test ICT est un test de diagnostic rapide *in vitro* par recherche des antigènes circulants de *P. falciparum*. Le réactif A, qui est ajouté au sang dans les puits de la cassette, lyse le sang total et permet sa migration au-delà de la zone mauve. Cette dernière contient des anticorps conjugués à des particules d'or colloïdal (révélateur) dirigés contre l'antigène HRPII de *P. falciparum*. Dans le cas d'un échantillon positif, les antigènes de *P. falciparum* se lient aux anticorps conjugués. Ces complexes anticorps/antigène continuent de migrer le long de la bande test sur laquelle ils sont capturés par des anticorps immobilisés. Quand il y a capture des complexes anticorps/antigène, un trait rose se forme dans la fenêtre; si l'échantillon est négatif, seul un trait témoin (témoin interne) apparaîtra. Celui-ci témoigne de la bonne réalisation du test. Il doit toujours apparaître si le test a été correctement réalisé.

Responsabilité

Le technicien/scientifique médical est responsable de la réalisation du test et du rendu des résultats.

Précautions

Le réactif A contient de l'azide de sodium utilisé comme conservateur. Toxique, l'azide de sodium doit être manipulé avec précaution. Eviter l'ingestion ou tout contact avec la peau. Laver à grande eau pour se débarrasser du réactif.

Traiter les cassettes utilisées comme des déchets biologiques.

Il faut prendre des précautions universelles quand on manipule tous ces échantillons, à savoir : porter un équipement individuel de protection, couvrir toute coupure ou écorchure avec un pansement adhésif, jeter les aiguilles dans une boîte à aiguilles.

Fréquence du test

Le test est réalisé à la demande.

Type d'échantillon, prélèvement et manipulation

Type d'échantillon : sang-EDTA (non coagulé) ou sang obtenu par piqûre au bout du doigt.

Le sang peut être prélevé dans un tube capillaire-EDTA après piqûre au doigt ou au talon, ou par prise de sang dans un tube-EDTA. Il faut prendre les précautions universelles dès que l'on manipule du sang.

- Pour obtenir du sang par piqûre au doigt ou au talon, nettoyer la peau à l'alcool avec un écouvillon stérile et sécher avec une compresse stérile. Utiliser une lancette pour piquer la peau et prélever le sang directement dans le tube capillaire-EDTA. Procéder immédiatement au test antigénique.
- Récupérer dans un tube-EDTA le sang veineux prélevé par prise de sang normale. Si le test ne peut pas être fait immédiatement, le sang peut être conservé 3 jours maximum à 2–8 °C.

Equipement et matériels

ICT malaria P.f. cassette test kit, Global Diagnostics (conserver à 15–30 °C; ne pas congeler)
Compresse stérile imbibée d'alcool
Lancette
Micropipette de 10 µl et embouts jetables
Chronomètre

Procédure

1. S'assurer que tous les éléments du test et les échantillons sanguins sont bien à température ambiante avant de commencer.

2. Oter la cassette de son emballage.

3. Récupérer le sang prélevé par piqûre au doigt ou au talon dans un tube capillaire et s'assurer qu'il est complètement rempli. Autrement, à l'aide d'une micropipette, prélever 10 µl de sang dans le tube-EDTA.

4. Déposer le sang dans le puits.

5. Ajouter doucement 5 gouttes de réactif A dans le puit et démarrer le chronomètre.

6. Au bout de 15 min, lire les résultats à travers la fenêtre réservée à cet effet. Dans le cas d'un échantillon fortement positif, le résultat peut être visible bien plus tôt.

Interprétation des résultats du test

Les résultats lus au-delà de 15 min risquent d'être imprécis et par conséquent ne peuvent être pris en compte.
Ligne contrôle : un trait témoin (C) se formera dans la fenêtre si le test a été correctement exécuté. Ce trait, bleu avant réalisation du test, devient rose s'il a été correctement exécuté.
Négatif : un test est négatif pour *P. falciparum* si seul le trait témoin apparaît dans la fenêtre.
Positif : un test est positif pour *P. falciparum* si deux traits apparaissent dans la fenêtre. Du moment que le trait témoin apparaît, tout trait de test visible (T) traduit un résultat positif, même s'il est pâle.
Invalide : un test est non valide si le trait témoin (C) n'apparaît pas dans la fenêtre, qu'il y ait présence ou non d'un trait de test (T). Le test doit alors être répété avec une nouvelle cassette.

Limites de la méthodes

Pour établir un diagnostic, il faut utiliser les résultats de ce test conjointement avec les observations cliniques et l'examen microscopique des frottis. Ce test détecte uniquement les antigènes de *P. falciparum.* Un taux résiduel d'antigène HRPII peut être détecté plusieurs jours après l'élimination du parasite de l'organisme. Ce test est valable uniquement sur du sang total non coagulé, pas sur des échantillons de sérum.

Contrôle de qualité interne et procédures d'évaluation externe de la qualité

Le trait témoin de la bande test doit toujours apparaître si le test est correctement exécuté. Ne jamais utiliser les kits ayant dépassé leur date d'expiration. Ne pas mélanger les réactifs de différents kits.

Références

Notice du test ICT Malaria P.f. cassette test, Portland, USA (2003).

ANNEXE 5

Exemples de notice d'instructions et de formulaire de réponse envoyés aux laboratoires participants

5.1 Instructions (exemple Enquête de septembre 2005)

5.2 Questionnaire

5.3 Formulaires de réponse de l'EEQ (bactériologie, microscopie du paludisme et bacilloscopie) (exemple : Enquête de septembre 2005)

5.4 Commentaire global de l'EEQ (bactériologie, microscopie du paludisme et bacilloscopie) (exemple : Enquête de septembre 2005)

5.1 Instructions (exemple Enquête de septembre 2005)

OMS / NICD

PROGRAMME D'EVALUATION EXTERNE DE LA QUALITÉ SEPTEMBRE 2005

PAYS : **PERSONNE A CONTACTER :**

LABORATOIRE :

ADRESSE :

TEL N° : **FAX N° :**

ADRESSE E-MAIL :

DATE DE RECEPTION AU LABORATOIRE :

DATE DE RETOUR AU NICD/NHLS :

ENVOYER LES RÉSULTATS A : Ms Vivian Fensham

ADRESSE :

WHO/ NHLS EQA Programme
NICD/NHLS
North Block NU10
1 Modderfontein Road
Sandringham, Johannesburg
South Africa

ADRESSE POSTALE :

WHO/ NHLS EQA Programme
NICD/NHLS
Private Bag X4
Sandringham
2131
South Africa

TEL : +27 11 555 0344 **FAX : +27 11 555 0430**

E-MAIL : nhlswhoQA@nhls.ac.za

DATE DE RETOUR : 10 JOURS OUVRES APRÈS RÉCEPTION PAR VOTRE LABORATOIRE (DOIT NOUS PARVENIR AVANT LE 21 OCTOBRE 2005)

Si votre laboratoire n'est pas capable de mener à bien les analyses de cet envoi, veuillez nous retourner (par fax) cette première page du formulaire, en indiquant quelle(s) est(sont) la (les) raison(s) qui vous en ont empêché

- ☐ **Réactifs de laboratoire non disponibles**
- ☐ **Equipement de laboratoire en mauvais état de fonctionnement**
- ☐ **Personnel de laboratoire absent**
- ☐ **Contenu de l'envoi reçu dans de mauvaises conditions**
- ☐ **Autre (Préciser SVP)**_____

- SI L'ENVOI CONTIENT DES ÉCHANTILLONS CASSES, AUTOCLAVER LE CONTENU DU COLIS ET LE JETER AVEC LE MINIMUM D'EXPOSITION A L'AIR AMBIANT. SE PRÉMUNIR CONTRE LA PRODUCTION D'AÉROSOL, CAR ILS PEUVENT ÊTRE SOURCE DE CONTAMINATION POUR LE LABORATOIRE ET LE PERSONNEL.
- LES ÉCHANTILLONS DOIVENT ÊTRE TRAITÉS COMME VOUS TRAITEZ HABITUELLEMENT LES ÉCHANTILLONS CLINIQUES.
- IL EST RECOMMANDÉ DE PHOTOCOPIER TOUTES LES PAGES POUR VOS ARCHIVES.
- RENVOYER TOUS LES ORIGINAUX A L'ADRESSE CI DESSUS PAR E-MAIL, FAX, VOIE POSTALE (SI VOUS AVEZ BESOIN D'UTILISER UNE MESSAGERIE EXPRESS CONTACTER V. FENSHAM AU +27 11 489-9338 POUR LES DETAILS DU COMPTE).

Votre laboratoire a été engagé dans les programmes Assurance Qualité suivants									
Pathogènes entériques	√	Pathogènes méningés	√	Peste	√	Bacilloscopie	√	Microscopie du paludisme	√

VEUILLEZ NOUS CONTACTER SI VOUS AVEZ LE MOINDRE PROBLEME OU LA MOINDRE QUESTION :

Coordinateur du programme d'EEQ OMS/NICD :

Mme Vivian Fensham, Ms Helen Haritos,Dr Kerrigan McCarthy
Téléphone : +27 11 555 0344/0342
Fax : +27 11 555 0430
e-mail : vivian.fensham@nhls.ac.za
helen.haritos@nhls.ac.za
kerrigan.mccarthy@nhls.ac.za

Respiratory and Meningeal Pathogens Research Unit, NICD :
Dr Anne von Gottberg et Mme Linda de Gouveia
Téléphone : +27 11 555 0327/0316
Fax : +27 11 555 0437
e-mail anne.vgottberg@nhls.ac.za
linda.dgouveia@nhls.ac.z

Enteric Diseases Reference Unit, NICD :
Dr Karen Keddy
Téléphone : +27 11 386 6269
Fax : +27 11 386 0433
e-mail karen.keddy@nhls.ac.za

Special Bacterial Pathogens Reference Unit, NICD :

Mme Lorraine Arntzen et Dr John Frean
Téléphone : +27 11 555 0331/0308
Fax :
e-mail lorraine.arntzen@nhls.ac.za
john.frean@nhls.ac.za

Parasitology Reference Unit, NICD :
Ms Leigh Dini and Ms Rita van Deventer
Telephone : +27 11 555 0311/0304
e-mail : leigh.dini@nhls.ac.za
rita.vdeventer@nhls.ac.za

Organisation Mondiale de la Santé :

Dr Jean-Bosco Ndihokubwayo
Public Health Laboratory Network
Head of Lab Sub-Unit WHO Africa Region
CSR Unit/ DDC Division
Harare, Zimbabwe
Tel : 263 4 704922
Fax : 263 4 746 867
E-mail : ndihokubwayoj@whoafr.org

Dr Bekithemba Mhlanga
Hib-PBM Surveillance Network

Highlands Office
P.O.Box BE 773
Tel : 263 4 746 011/323
Fax : 263 4 746 867
e-mail : mhlangab@whoafr.org

5.2 Questionnaire

Indiquer le meilleur moyen de communiquer avec vous :	**Téléphone** ☐ **Fax** ☐ **E-mail** ☐
Commentaires généraux, points positifs et négatifs et éventuelles suggestions pour améliorer le programme :	

5.3 Formulaires de réponse (exemple Enquête de septembre 2005)

FORMULAIRE D'IDENTIFICATION

ÉCHANTILLON	ORIGINE	DETAILS CLINIQUES	INSTRUCTIONS
2005 3A Selles en milieu Cary-Blair	**SELLES**	Diarrhée sanguinolente chez un homme de 30 ans	Identifier le(s) pathogène(s) et faire l'antibiogramme

2005 3A	
Principal milieu de culture utilisé pour l'isolement :	
Morphologie des colonies (apparence sur le milieu de culture) :	
Réactifs biochimiques ou tests utilisés pour identifier le(s) microoorganisme(s) : Ex. API, indole etc. Préciser SVP les réactions utilisées pour l'identification.	
Tests supplémentaires réalisés pour cette identification (ex : sérotypage) :	
Identification finale (i.e. compte-rendu remis au médecin) :	

FORMULAIRE DE COMPTE RENDU DE L'ANTIBIOGRAMME

(NB ce modèle a été utilisé pour les enquêtes 2005-3A, 2005-3B, 2005-3C et 2005-3D)

Veuillez SVP ne mentionner que les antibiotiques appropriés pour le pathogène isolé et qui sont utilisés en routine.
Veuillez préciser quels sont les antibiotiques qui seront mentionnés dans le compte rendu final remis au médecin.
Dupliquez le formulaire si vous avez besoin d'un plus grand nombre de copies.

Enquête numéro : 2005 3A
Identification de l'isolat :
Méthode utilisée pour la diffusion en disque (Kirby Bauer, Stokes, etc) :
Méthode utilisée pour la mesure de la CMI (CMI en milieu liquide, gélosé ou E-test) :
Milieu utilisé :
Marque du milieu :
Marque et diamètre des disques (en mm) :
Origine des valeurs critiques utilisées (NCCLS, BSAC‡, CA-SFM* ou autre) : **†Clinical and Laboratory Standards Institute/National Clinical/National Committee for Clinical Laboratory Standards** **‡ British Society for Antimicrobial Chemotherapy** ***Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie**

ANTIBIOTIQUE	Mentionné dans le compte rendu final remis au clinicien (Oui ou Non)	CONCENTRATION du DISQUE (µg)	TAILLE de la ZONE (mm)	CMI	[1]S	[2]I	[3]R

Recherche de β-lactamase :	Méthode utilisée :	Résultats :

[1]S= sensible
[2]I = intermédiaire
[3]R = résistant

FORMULAIRE D'IDENTIFICATION

ECHANTILLON	ORIGINE	DETAILS CLINIQUES	INSTRUCTIONS
2005-3B Selles en milieu Cary-Blair	**SELLES**	Patient dans un camp de réfugiés souffrant de diarrhée et d'une grave déshydratation	Identifier le(s) pathogène(s) et faire l'antibiogramme

2005-3B	
Principal milieu de culture utilisé pour l'isolement :	
Morphologie des colonies (apparence sur le milieu de culture) :	
Réactifs biochimiques ou tests utilisés pour identifier le(s) microoorganisme(s) : Ex. API, indole etc. Préciser SVP les réactions utilisées pour l'identification.	
Tests supplémentaires réalisés pour cette identification (ex : sérotypage) :	
Identification finale (*i.e.* compte-rendu remis au médecin) :	

FORMULAIRE D'IDENTIFICATION

ECHANTILLON	ORIGINE	DETAILS CLINIQUES	INSTRUCTIONS
2005 3C Frottis fixé non coloré. Echantillon en milieu TI /Trans-Isolate. (échantillon supplémentaire lyophilisé).	**LCR**	Fièvre et raideur de la nuque chez un nourrisson de 8 mois	Colorer la lame convenablement et commenter le résultat de vos observations. Mettez en culture le milieu TI de manière appropriée puis commenter le résultat de vos observations. **S'il n'y a pas de pousse dans le milieu TI, le préciser sur ce formulaire, puis essayer de cultiver l'échantillon à partir de l'ampoule de lyophilisat. Voir notice d'instructions jointe.** Faire toutes les analyses réalisées en routine dans votre laboratoire

2005 3C	
Observations microscopiques et rapport préliminaire remis au médecin :	
Détails du traitement de l'échantillon de LCR :	
Compte rendu final remis au médecin :	
Résultats des tests supplémentaires :	

FORMULAIRE D'IDENTIFICATION

ECHANTILLON	ORIGINE	DETAILS CLINIQUES	INSTRUCTIONS
2005-3D Frottis fixé non coloré; inoculation d'un milieu Trans-isolate (TI) avec l'échantillon	**LCR**	Enfant de 9 ans inconscient et fiévreux	Colorer la lame convenablement et commenter vos résultats. Mettre en culture le milieu TI de façon appropriée et commenter le résultat de vos observations. Faire toutes les analyses réalisées en routine dans votre laboratoire

2005-3D	
Observations microscopiques et rapport préliminaire remis au médecin :	
Détails du traitement de l'échantillon de LCR :	
Compte rendu final remis au médecin :	
Résultats des tests supplémentaires :	

FORMULAIRE D'IDENTIFICATION

ECHANTILLON	ORIGINE	DETAILS CLINIQUES	INSTRUCTIONS
2005-3E Pus	**Bubon**	Adulte de sexe masculin présentant de la fièvre et une grosseur inguinale	Tester la présence de l'antigène F1

2005-3E	
Détails du test effectué :	
Résultats du test :	
Compte rendu au médecin :	

ECHANTILLON	ORIGINE	DETAILS CLINIQUES	INSTRUCTIONS
2005-3F Pus	**Bubon**	Voyageur récemment rentré d'Inde, ayant développé un syndrome fébrile	Tester la présence de l'antigène F1

2005-3F	
Détails du test effectué :	
Résultats du test :	
Compte rendu au médecin :	

EEQ de la microscopie du paludisme (septembre 2005)

RENSEIGNEMENTS CLINIQUES ET INSTRUCTIONS CONCERNANT LES ECHANTILLONS

ECHANTILLON	ORIGINE	INSTRUCTIONS
2005-3-M1 Frottis mince et goutte épaisse colorés au Giemsa	**Sang humain**	Identifier tout parasite présent et quantifier la parasitémie en utilisant votre propre procédure
2005-3-M2 Frottis mince et goutte épaisse colorés au Giemsa	**Sang humain**	Identifier tout parasite présent et quantifier la parasitémie en utilisant votre propre procédure
2005-3-M3 Goutte épaisse colorée au Giemsa	**Sang humain**	Identifier tout parasite présent et quantifier la parasitémie en utilisant votre propre procédure
2005-3-M4 Frottis mince et goutte épaisse colorés au Giemsa	**Sang humain**	Identifier tout parasite présent et quantifier la parasitémie en utilisant votre propre procédure
2005-3-M5 Frottis mince et goutte épaisse colorés au Giemsa	**Sang humain**	Identifier tout parasite présent et quantifier la parasitémie en utilisant votre propre procédure
2005-3-M6 Frottis mince et goutte épaisse colorés au Giemsa	**Sang humain**	Identifier tout parasite présent et quantifier la parasitémie en utilisant votre propre procédure

Formulaire de compte rendu pour le paludisme

ECHANTILLON	CODE DE REPONSE (utiliser SVP la liste ci-dessous)	PARASITEMIE
2005-3-M1 Frottis mince et goutte épaisse colorés au Giemsa		
2005-3-M2 Frottis mince et goutte épaisse colorés au Giemsa		
2005-3-M3 Goutte épaisse colorée au Giemsa		
2005-3-M4 Frottis mince et goutte épaisse colorés au Giemsa		
2005-3-M5 Frottis mince et goutte épaisse colorés au Giemsa		
2005-3-M6 Frottis mince et goutte épaisse colorés au Giemsa		

Préciser SVP votre méthode de quantification de la parasitémie :

CODES DE REPONSE

CODE :	REPONSE :	CODE :	REPONSE :
P1	Aucun parasite observé	P5	*Plasmodium vivax*
P2	*Plasmodium falciparum*	P6	Espèces de *Plasmodium*
P3	*Plasmodium malariae*	P7	Espèces de *Plasmodium* non *P. falciparum*
P4	*Plasmodium ovale*	P8	Espèces responsables d'épisodes récurrents (*P. ovale / P. vivax*)

EEQ de la bacilloscopie (septembre 2005)

Instructions aux laboratoires participants

Frottis A- D : Les lames A-D ont été préparées avec des crachats concentrés et colorées par le laboratoire d'EEQ avec la technique de Ziehl-Neelsen. Chercher la présence de bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) et s'il y en a, donner un résultat quantitatif. Remplir la feuille de réponse jointe.

Frottis E-H : Les lames E-H ont été préparées avec des crachats concentrés, puis fixées. Colorer les frottis selon votre méthode de coloration habituelle. Noter la technique utilisée. Rechercher la présence de bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) et s'il y en a, donner un résultat quantitatif. Remplir la feuille de réponse jointe.

Pour tous les frottis : Utiliser le schéma de quantification recommandé par l'Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires (reproduit ci-dessous). Des microscopistes différents devront remplir des feuilles de réponse séparées. Chaque laboratoire peut renvoyer plus d'une réponse.

Une fois terminé : **Veuillez envoyer la réponse par fax/e-mail/poste à l'adresse ci-dessous avant la date de clôture.**

Système de classification de l'IUATLD des lames de bacilloscopie

Coloration Carbol-fuchsine, immersion à huile (1000x)*	Rapport
Pas de BAAR	Absence de bacille acido-alcoolo-résistant
1 à 9 BAAR/100 champs	Noter le nombre exact (très faible)
10 à 99 BAAR/100 champs	1+
1 à 10 BAAR/champ	2+
> 10 AFB/field	3+

*** En cas de coloration au fluorochrome, utiliser les facteurs de conversion appropriés. Voir http ://www.sahealthinfo.org/tb/tbmicroscopy.htm**

Formulaire de compte rendu de la bacilloscopie

LABORATOIRE_____ No de CODE DU LABO :_____

No D'ENQUETE : 2005-lames (T1-T7)

Date de réception dans votre laboratoire :
Date de retour des résultats à l'organisateur de l'EEQ :

Nom du technicien chargé de la lecture des frottis :

Nombre approximatif d'échantillons reçus chaque année par votre laboratoire pour la bacilloscopie?

Proportion aproximative d'échantillons positifs pour la bacilloscopie dans votre laboratoire?

FROTTIS	TYPE de COLORATION	RESULTAT
T1	Ziehl-Neelsen	
T2	Ziehl-Neelsen	
T3	Ziehl-Neelsen	
T4	Ziehl-Neelsen	
T5		
T6		
T7		

5.4 Commentaire global (exemple : Enquête de septembre 2005)

Revue générale des performances des laboratoires pour l'étude 2005-3
Cette étude comprenait 6 spécimens (spécimens A-F) : deux pour chaque discipline entérique, méningite et peste. Pour la première fois, cette étude a inclus 7 lames pour bacilloscopie (tuberculose) (T1-7) et 6 gouttes épaisses et 5 frottis minces pour le diagnostic microscopique du paludisme (M1-6). Les commentaires pour ces dernières études microscopiques figurent sur des pages séparées. Cette étude a été envoyée à un total de 72 laboratoires dont 16 ont reçu des spécimens pour la peste. Un total de 62 réponses a été reçu. Dix laboratoires n'ont pas répondu à cette étude. La moyenne de temps mis par les paquets pour rejoindre les laboratoires a été de 4 jours, et le temps de réponse moyen des laboratoires participants (depuis la réception du paquet jusqu'à réception des résultats par le NICD) a été de 22 jours (intervalle 7-54). Le tableau 1 ci-dessous détaille le nombre de laboratoires et le score obtenu pour chaque spécimen et catégorie soumise à notation de l'étude.

Commentaire sur l'enquête Bactériologie 2005 3

De nombreux laboratoires réalisent les antibiogrammes dans de mauvaises conditions; de façon à faciliter l'amélioration des réponses, la méthode d'évaluation des réponses du laboratoire est expliquée clairement en annexe 1 ci-après. Merci de se référer à cette annexe afin que votre laboratoire retire un bénéfice maximum de cette participation.

Tableau 1. Nombre de laboratoires et score obtenu pour les spécimens A-F, étude 2005 3.

Spécimen	Catégorie soumise à notation	Répondants	Nombre de laboratoires					
		62/72	4	3	1	0	NE	AC
A Selle simulée contenant *Shigella dysenteriae* type 2	Culture et identification	62/72	54	0	0	3	5	0
	Sérotypage		15	18	5	19	5	0
	Sélection des antibiotiques		47	3	0	6	6	0
	Résultats de l'antibiogramme		40	6	2	8	6	0
B Selle simulée contenant *Vibrio cholerae* sérogroupe O1 sérotype Ogawa	Culture et identification	62/72	28	0	0	13	5	16
	Sérotypage		17	5	1	18	5	16
	Sélection des antibiotiques		27	0	0	13	6	16
	Résultats de l'antibiogramme		24	3	0	13	6	16

C Lame de LCR simulée et milieu TI contenant ***Haemophilus influenzae*** sérotype c	Microscopie	62/72	35	0	0	23	4	0
	Culture et identification		35	0	0	12	4	11
	Sérotypage		1	6	0	40	4	11
	Sélection des antibiotiques		27	4	1	15	4	11
	Résultats de l'antibiogramme		3	1	0	43	4	11
D Lame de LCR simulée et milieu TI contenant *Neisseria meningitidis* groupe C	Microscopie	62/72	50	0	0	8	4	0
	Culture et identification		52	0	0	5	4	1
	Sérotypage		33	2	0	22	4	1
	Sélection des antibiotiques		33	15	1	7	5	1
	Résultats de l'antibiogramme		8	0	0	47	6	1
E Pus simulé pour recherche de l'antigène F1	antigène F1	**13/16**	7	0	0	4	2	
F Pus simulé pour recherche de l'antigène F1	antigène F1		6	0	0	5	2	

NE=Non évalué. Trois laboratoires n'ont pas été capables de réaliser l'enquête car leur laboratoire était en cours de déménagement.
AC : Absence de croissance bactérienne

Spécimen A

Ce spécimen était une selle simulée inoculée avec *Shigella dysenteriae* type 2.

Contrôle de qualité du spécimen A

Cet organisme a été retrouvé présent dans un échantillon de selles simulées six semaines après la préparation. Tous les laboratoires de référence (Centers for Disease Control and Prevention, Enteric Reference Laboratory, USA; laboratoires de microbiologie du NHLS : Johannesburg General Hospital et Groote Schuur Hospital, Cape Town, Afrique du Sud, et le Service de Biologie Clinique de l'Hôpital d'Instruction des Armées, Marseille, France) ont isolé une espèce de *Shigella* et ceux ayant une capacité de sérotypage ont typé cet organisme comme un « type 2 ».

Réponse correcte

Culture et identification :	Espèce de *Shigella*
Sérotypage :	*Shigella dysenteriae* type 2
Antibiotiques sélectionnés :	Acide nalidixique, trimethoprime-sulphamethoxazole, ampicilline, ciprofloxacine, chloramphénicol
Antibiogramme :	Sensible à tous les antibiotiques

Points soulevés par cet exercice d'EEQ

Culture et Identification, sélection des antibiotiques, résultats de l'antibiogramme
La culture et l'identification ont été TRES bien réalisées. Seuls 2 des 57 laboratoires ayant fourni des résultats d'identification ont mal identifié cet organisme (*E coli*, *Salmonella* sp.) et un laboratoire n'a pas réussi à faire croître la bactérie. Le choix des antibiotiques et l'antibiogramme ont également été bien accomplis avec plus des 2/3 des laboratoires ayant obtenu des résultats acceptables. Cependant ces catégories ont été notées de façon indulgente sans prise en compte de la méthodologie utilisée ;

à partir de 2006, la méthodologie de l'antibiogramme va être évaluée. Merci de vous référer à l'annexe 1 ci-après pour vous assurer que votre laboratoire remplit correctement le formulaire d'antibiogramme.

Sérotypage :
Shigella dysenteriae type 1 (Sd1) est responsable d'épidémie de dysenterie et de syndrome hémolytique et urémique à cause de la présence d'un gène codant pour la toxine *stx1*. Les autres types de *S. dysenteriae* (types 2-15) ne contiennent pas de gène codant pour cette toxine et provoquent une maladie de moindre intensité; Sd2 est le sérotype le plus commun après Sd1 et peut provoquer des épidémies à petite échelle. Une épidémie importante de dysenterie a été provoquée par Sd1 en provenance d'Afrique de l'Est dans les années 1960 s'est répandue jusqu'en Afrique du Sud dans les années 1980. Il est essentiel que les Laboratoires Nationaux de Santé Publique (LNSPs) soit capable de différencier les souches de type 1 et de type non-1 à cause de l'impact majeur de ce type en terme de santé publique. Il est acceptable que les laboratoires n'ayant pas d'antisérums de typage envoient leurs isolats vers d'autres LNSPs pour typage. Trois laboratoires ont indiqué que le microorganisme était *S. dysenteriae* type 1. Par rapport au sérotypage, les scores ont été calculés comme suit :

Sérotypage	**4**	*Shigella dysenteriae* (type 2) or *Shigella dysenteriae* non type 1
	3	*Shigella dysenteriae* sérotype non déterminé
	3	Envoyé pour typage
	1	*Shigella dysenteriae* type 1
	0	Non typé / sérum de typage non disponible
	0	Identification incorrecte / Pas de microorganisme isolé / Non réalisé
	NG	Absence de croissance

Spécimen B

Ce spécimen était une selle simulée inoculée avec une souche ATCC de *Vibrio cholerae* sérogroupe O1 sérotype Ogawa.

Contrôle de qualité du spécimen B

Au NICD, le contrôle de qualité de 10% des envois a indiqué que les échantillons de selles simulées contenaient un isolat viable de *Vibrio cholerae* sérogroupe O1, sérotype Ogawa, et ce jusqu'à 34 jours après la préparation. Le Laboratoire de Référence des Entériques du Centers for Disease Control, Atlanta, USA, et les laboratoire de microbiologie du NHLS du Johannesburg General Hospital et du Groote Schuur Hospitals, Afrique du sud, ont confirmé la présence et l'identification de cet organisme par l'utilisation de tests biochimiques, sérologiques et moléculaires. Un des laboratoires de référence (le Service de Biologie Clinique de l'Hôpital d'Instruction des Armées, Marseille, France) n'a pas pu faire croître la bactérie présente dans l'échantillon; ainsi, les laboratoires qui n'ont pas pu cultiver le microorganisme n'ont pas été pénalisés mais enregistrés dans la catégorie « Absence de croissance ».

Réponse correcte

Culture et identification :	*Vibrio cholerae*
Sérotypage :	*Vibrio cholerae* sérogroupe O1, sérotype Ogawa
Antibiotiques	Acide nalidixique, trimethoprime-sulphamethoxazole, furazolidone,

sélectionnés :	ciprofloxacine, tétracycline
Antibiogramme :	Sensible à tous les antibiotiques

Points soulevés par cet exercice d'EEQ

Culture et Identification :
Seize des 62 laboratoires (26%) n'ont pas réussi à cultiver le germe. Dans le futur, le NICD fera son maximum pour ne pas reproduire cette situation afin que les laboratoires aient une chance maximale de cultiver la bactérie. Des erreurs d'identification ont été réalisées, avec des résultats tels que *Acinetobacter, Aeromonas, Pasteurella, Plesiomonas* (1 laboratoire chacun), *Shigella* sp. (4 laboratoires) et 4 laboratoires ayant identifié et rapporté des staphylocoques.

Sérotypage :
Seuls les *Vibrio cholerae* de sérogroupe O1 et O139 ont un potentiel épidémique; ainsi tout résultat de *Vibrio* devrait indiquer le sérogroupe de l'isolat. Les laboratoires n'ayant pas mentionné le sérogroupe, mais ayant indiqué correctement le sérotype ont obtenu 3 points. Deux laboratoires (du même pays!) ont indiqué que le spécimen était un sérogroupe non-O1, non-O139. Un laboratoire a identifié un sérotype Inaba. Trois laboratoires devraient vérifier que leurs antisérums sont contrôlés sur des microorganismes de sérogroupe et de sérotype connus. Les laboratoires n'ayant pas d'antisérums ont obtenu la note 0.

Sélection des antibiotiques, résultats de l'antibiogramme :

Le choix des antibiotiques et les résultats de l'antibiogramme ont été correctement accomplis, plus de 90% des laboratoires ayant pu cultiver le microorganisme ayant obtenu des résultats acceptables. Cependant, ces catégories ont été notées de façon indulgente, sans prendre en compte la méthodologie utilisée. À partir de 2006, la méthodologie de l'antibiogramme va être évaluée. Merci de vous référer à l'annexe 1 pour vous assurer que votre laboratoire remplit correctement le formulaire d'antibiogramme.

Spécimen C

Les laboratoires ont reçu un échantillon lyophilisé inoculé avec une souche ATCC de *Haemophilus influenzae* sérotype c et une lame non colorée contenant des coccobacilles Gram-négatif et des polynucléaires neutrophiles.

Contrôle de qualité des spécimens C

Tous les laboratoires de référence ont confirmé la présence de coccobacilles Gram-négatif sur les lames. *Haemophilus influenzae* a été isolé à partir d'un échantillon lyophilisé jusque 83 jours après la préparation du spécimen. Les laboratoires de microbiologie du NHLS du Johannesburg General Hospital et du Groote Schuur Hospital (Cape Town) ont cultivé *Haemophilus influenzae* et ont envoyé l'isolat pour sérotypage. Le laboratoire « Meningitis and Special Pathogens Reference » du CDC a obtenu la croissance de *Haemophilus influenzae* sérotype c et l'Unité du méningocoque du Centre Collaborateur OMS du Service de Santé des Armées, France, a rendu comme résultat : « *Haemophilus influenzae* type non-b ».

Réponse correcte : Spécimen C

Microscopie	Bacilles/coccobacilles Gram-négatif
Culture et identification :	*Haemophilus influenzae*
Sérotypage :	*Haemophilus influenzae* sérotype c

Antibiotiques sélectionnés :	Ampicilline, Amoxicilline-acide clavulanique, ceftriaxone, chloramphénicol
Antibiogramme :	Norme suivie indiquée, méthodologie correcte, résultats corrects (sensible à tous les antibiotiques testés), recherche de β-lactamase négative.

Points soulevés par cet exercice d'EEQ

Microscopie :

Quatorze laboratoires ont rapporté « Aucun organisme n'a été observé » sur la lame de LCR simulé inclus dans l'envoi. Ces laboratoires devraient relire ces lames car les organismes sont bien présents ! Six laboratoires ont vu des cocci Gram-négatif. Cette réponse a été pénalisée car cela peut conduire les cliniciens à conclure par erreur à la présence de *Neisseria meningitidis* comme germe responsable, avec des conséquences thérapeutiques non négligeables. Deux laboratoires ont rapporté la présence de germes Gram-positif. Le contrôle de qualité du colorant de Gram avec des souches connues Gram positif et négatif est essentiel.

Culture et identification :

L'ensemble des 35 laboratoires ayant obtenu des résultats corrects en microscopie ont également correctement cultivé et identifié le germe comme un *Haemophilus influenzae*. Ceci indique que les laboratoires ont bien corrélé leurs résultats d'examen direct et de culture. Félicitations ! Des erreurs d'identification ont été réalisées, avec des résultats tels que *Neisseria meningitidis* (4 laboratoires), *E .coli* (2 laboratoires), *Acinetobacter, Providencia, Staphylococcus and Streptococcus pneumoniae* (1 laboratoire chacun), tous ces résultats ayant été obtenu par des laboratoires ayant également rapporté des résultats faux de microscopie.

Sérotypage :

Cette étape a été très mal accomplie. 14 laboratoires ont rapporté que le germe était du sérotype b. Tous ces laboratoires n'ont pas réalisé le sérotypage avec un antisérum spécifique ; ils ont plutôt utilisé des kits latex de détection antigénique. Lorsqu'ils ont été testés dans notre laboratoire, ni le Slidex ni le Pastorex n'ont donné de résultat positif avec l'antisérum *Haemophilus influenzae* type b. Les laboratoires doivent avoir confiance en leur technique : si le germe est identifié comme *H. influenzae* par les tests biochimiques, mais que l'agglutination latex est négative et que tous les contrôles ont été réalisés, il est logique de rapporter ce germe comme un « type non-b ». Certains pays ayant expérimenté l'intégration du vaccin conjugué anti-*Haemophilus influenzae* type b dans leur Programme Elargi de Vaccination pour les enfants pourraient voir une augmentation des isolats invasifs non-b, et doivent ainsi prendre des mesures afin de mieux identifier ces isolats non-b. L'annexe 2 ci-après fournit un résumé pour l'interprétation des réactions de sérotypage. La notation a été réalisée comme suit :

Sérotypage	**4**	*Haemophilus influenzae* sérotype c
	3	Envoyé pour typage / réactions de typage non spécifiques, typage impossible et envoyé pour typage/ type non-b
	3	*Haemophilus influenzae* sérotype non-b
	1	Non typable ou agglutination avec tous les réactifs de typage monovalent
	0	Sérotype incorrect
	AC	Absence de Croissance

Sélection des antibiotiques :

Les antibiotiques appropriés pour le traitement de la méningite à *Haemophilus influenzae* sont l'ampicilline, la cefotaxime/ceftriaxone et le chloramphénicol. Les carbapénèmes sont aussi appropriés bien que rarement disponibles et très chers. Les laboratoires n'ont pas été pénalisés pour avoir testés des antibiotiques additionnels ou inappropriés, à condition que le choix inclue les β-lactamines. Il n'est pas acceptable d'omettre l'ampicilline et les céphalosporines de troisième génération. Les laboratoires devraient se référer à une norme d'antibiogramme appropriée lorsqu'ils choisissent quel antibiotique tester.

Résultats de l'antibiogramme :
Les instructions figurant en annexe 1 ont été suivies par le NICD pour l'évaluation des réponses des laboratoires pour cette catégorie. Les laboratoires n'ont pas bien réalisé cette étape, car la plupart n'ont pas précisé quelle norme ils ont suivies, et un plus faible nombre encore a suivi une méthodologie correcte. Les méthodologies requises par les différentes normes sont listées dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2. Méthode de diffusion (disques)[#] pour *Haemophilus influenzae* selon le Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), la Societé Française de Microbiologie (SFM) et la British Society for Antimicrobial Agents and Chemotherapy (BSAC)

	CLSI	**SFM**	**BSAC**
Méthode de diffusion :	Kirby-bauer	Kirby-bauer	Kirby-bauer
Milieu	Haemophilus Test Media	Gélose chocolat avec PolyViteX® Ou Milieu HTM (Haemophilus test media)	Gélose IsoSensitest + 5 % sang de cheval défibriné + 20 mg/L NAD
Conditions d'incubation :	35 °C ± 2 degrés, 5% CO2;	35-37° C, atmosphère non spécifiée	35-37°C dans 4-6% CO2
Durée d'incubation	16-18 heures	18-24 heures	18-20 heures
Charge du disque			
Ampicilline	10µg	2µg	2µg
Chloramphénicol	30µg	30µg	10µg
Cefotaxime/ceftriaxone	30µg	*	30µg

[#]Consultez les normes respectives pour l'interprétation des diamètres critiques car les normes diffèrent.
*Diamètres critiques non fournis : ces molécules ne sont pas à tester si l'on suit cette norme.

Spécimen D

Les laboratoires ont reçu une lame non colorée préparée à partir d'un LCR simulé, ainsi qu'un milieu Trans-Isolate inoculé avec une souche ATCC de *Neisseria meningitidis* sérogroupe C. La lame contenait des polynucléaires neutrophiles et des diplocoques Gram-négatif.

Contrôle de qualité du spécimen D

Tous les laboratoires de référence ont observé des diplocoques Gram-négatif sur le frottis envoyé. *Neisseria meningitidis* a été retrouvé dans les milieux Trans-Isolate pendant 41 jours après la préparation du spécimen. Les milieux TI n'ont pas été contaminés. Le laboratoire « Meningitis and Special Pathogens Reference » du Centers for Disease Control et l'Unité du méningocoque du Centre Collaborateur OMS du Service de Santé des Armées de Marseille ont confirmé la présence et l'identification de ce microorganisme par des tests microscopiques, biochimiques et sérologiques. Les laboratoires de microbiologie du NHLS du Johannesburg General Hospital et du Groote Schuur Hospital (Cape Town) ont identifié le germe comme *Neisseria meningitidis* et l'ont envoyé à l'unité RMPRU du NICD pour sérogroupage. Les trois laboratoires de référence ayant réalisé un antibiogramme ont confirmé que l'isolat était sensible à tous les antibiotiques.

Réponse correcte : Spécimen D

Microscopie	Cocci/Diplocoques Gram-négatif et polynucléaires neutrophiles
Culture et identification :	*Neisseria meningitidis*
Sérotypage :	*Neisseria meningitidis* sérogroupe C
Antibiotiques sélectionnés :	Pénicilline/ampicilline, +/-ceftriaxone/cefotaxime, chloramphénicol, rifampicine, ciprofloxacine
Antibiogramme :	Norme suivie indiquée, méthodologie correcte, sensible à tous les antibiotiques testés

Points soulevés par cet exercice d'EEQ

Microscopie :
Au total, 50 laboratoires ont obtenu un résultat de microscopie correct; cependant 6 laboratoires n'ont pas vu de bactéries sur la lame, et deux ont rapporté « présence de cocci Gram-positif ».

Culture et Identification :
Parmi les 52 laboratoires ayant obtenu un résultat correct à la culture, 4 ont déclaré n'avoir pas vu de bactéries au Gram, et un a rapporté « Diplocoques Gram-positif ». Il est important que les laboratoires revoient leur résultat de microscopie et de culture lorsqu'ils sont discordants. Les germes peuvent être observés si l'on réalise une lecture attentive des lames, ou bien il est possible que lame ait été sous ou sur colorée, provoquant une erreur de lecture. Des erreurs d'identification ont été réalisées, avec des résultats tels que *Alkaligenes*, *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus sp.* (un laboratoire chacun). Trois laboratoires n'ont pas pu cultiver le germe.

Sérotypage :
Trente-huit laboratoires ont realisé le sérogroupage, parmi lesquels 33 ont rapporté un sérogroupe C. Deux laboratoires ont indiqué que l'organisme présentait un sérogroupe A-D : cette réponse a été jugée acceptable mais a rapporté 3 points. Trois laboratoires ont rendu des résultats incorrects de sérogroupage (A, W135, Y/W135). Deux de ces pays sont dans la ceinture africaine de la méningite.

Sélection des antibiotiques :
Les antibiotiques appropriés pour le traitement de la méningite à méningocoque incluent la pénicilline (à laquelle tous les méningocoques restent sensibles), les céphalosporines de 3ème génération et le chloramphénicol. Trois laboratoires ont omis de tester la pénicilline ou l'ampicilline mais ont testé une céphalosporine de 3ème génération et ont obtenu 3 points. Une chimioprophylaxie (ceftriaxone, ciprofloxacine ou rifampicine) peut être donnée aux sujets contact afin de supprimer le portage oropharyngé. La sensibilité de ces agents devrait aussi être testée. Douze laboratoires n'ont pas testé

une seule molécule pouvant être utilisée en chimioprophylaxie. La résistance à la rifampicine, bien que rare, peut survenir. Le choix des antibiotiques a été noté comme suit :

Choix des antibiotiques	Note	
	4	Pénicilline/ampicilline, +/-ceftriaxone/cefotaxime, chloramphénicol, rifampicine, ciprofloxacine
	3	Omission d'un antibiotique utilisé en prophylaxie secondaire (rifampicine, ciprofloxacine, ceftriaxone)
	3	Omission de la pénicilline, mais inclusion de ceftriaxone/cefotaxime, chloramphénicol, rifampicine, ciprofloxacine
	1	Omission de toute béta-lactamine appropriée
	0	Aucun antibiotique approprié
	0	Identification incorrecte / non réalisé / Absence de croissance

Résultats de l'antibiogramme :

Comme pour le spécimen C ci-dessus, les instructions figurant en annexe 1 ont été suivies par le NICD pour évaluer les réponses des laboratoires pour cette catégorie. Comme pour le spécimen C ci-dessus, les laboratoires n'ont pas bien réalisé cette étape, car la plupart n'ont pas précisé quelles normes ils ont suivies, et encore moins ont suivi une méthodologie correcte. Les méthodologies requises par les différentes normes sont listées dans le tableau 3 ci-dessous. Des difficultés sont survenues pour les laboratoires suivant les normes du CLSI, car la méthode des disques n'est pas recommandée pour le méningocoque. Différentes options se présentaient à ces laboratoires :

- Suivi de la norme de la SFM ou de la BSAC pour le méningocoque
- Envoi des isolats à un centre qui est capable de mesurer la CMI
- Achat de bandelettes E-tests pénicilline (seule la pénicilline est essentielle; les antibiotiques utilisés en chimioprophylaxie pouvaient ne pas être testés pour des raisons de coût).

Seuls 8 laboratoires ont suivi une norme correctement; ces laboratoires ont utilisé les normes SFM (5 laboratoires) et CLSI (3 laboratoires).

Tableau 3. Méthode de diffusion (disques)[#] pour *Neisseria meningitidis* selon le Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), la Societé Française de Microbiologie (SFM) et la British Society for Antimicrobial Agents and Chemotherapy (BSAC)

	SFM	BSAC	CLSI
Méthode de diffusion :	Kirby-Bauer, recommandé seulement pour oxacilline, chloramphénicol et rifampicine	Kirby-Bauer	La méthode des disques n'est pas recommandée pour le méningocoque
Milieu	Mueller-Hinton agar + 5% sang de mouton	IsoSensitest Agar + 5 % sang de cheval défibriné	
Conditions d'incubation :	35-37°C dans 5% CO2.	35-37°C dans 4-6% CO2	
Durée d'incubation	18-20 heures	18-20 heures	
Charge du disque			
Pénicilline	*	1 unité	
Ampicilline	*	*	
Oxacilline	5µg ou 1µg	*	
Cefotaxime	*	5µg	
Rifampicine	30µg	2µg	
Chloramphénicol	30µg	10µg	
Ciprofloxacine	*	1µg	

[#]Consultez les normes respectives pour l'interprétation des diamètres critiques car les normes diffèrent.

*Diamètres critiques non fournis : ces molécules ne sont pas à tester si l'on suit cette norme.

Spécimen E et F

Les laboratoires ont reçu les spécimens E et F qui étaient tous les deux des pus simulés provenant d'une aspiration de bubon. Des bandelettes de détection de l'antigène F1 étaient inclues dans le colis. Malheureusement, les instructions pour réaliser le test ont été omises notamment pour un laboratoire qui n'avait pas vu ou utilisé le test auparavant. Ce test rapide est fabriqué par l'Institut Pasteur de Madagascar et est présenté comme ayant une spécificité et une sensibilité de 100%.

Contrôle de qualité des spécimens E et F

L'unité « Special Bacterial Pathogens » du NICD et l'Institut Pasteur de Madagascar ont trouvé un résultat négatif par bandelette pour les deux specimens E and F. La « Bacterial Zoonoses Branch » du CDC à Fort Collins, USA a obtenu un résultat positif pour le spécimen E et un résultat négatif pour le spécimen F. Le NICD a répété ces tests et confirmé les résultats négatifs. Après discussion avec le CDC et une observation répétée des tests rapides, il est apparu clair que si les tests sont lus APRES 15 minutes, certains tests donnent une petite bande à peine visible pouvant conduire à un résultat faux-positif. Les laboratoires doivent absolument lire la bandelette dans les 15 minutes.

Réponse correcte : Spécimen E et F

Spécimen E	**Antigène F1**	Négatif
Spécimen F	**Antigène F1**	Négatif

Points soulevés par cet exercice d'EEQ

Le laboratoire qui n'avait pas les instructions de réalisation du test n'a pas été évalué. Des résultats faux-positifs ont été rapportés pour les spécimens E et F par 2 et 4 laboratoires respectivement. Le suivi strict du protocole opératoire et une lecture des résultats dans les 15 minutes sont essentiels pour éviter tout faux positif.

Annexe 1, commentaire Bactériologie : Evaluation des réponses des laboratoires.

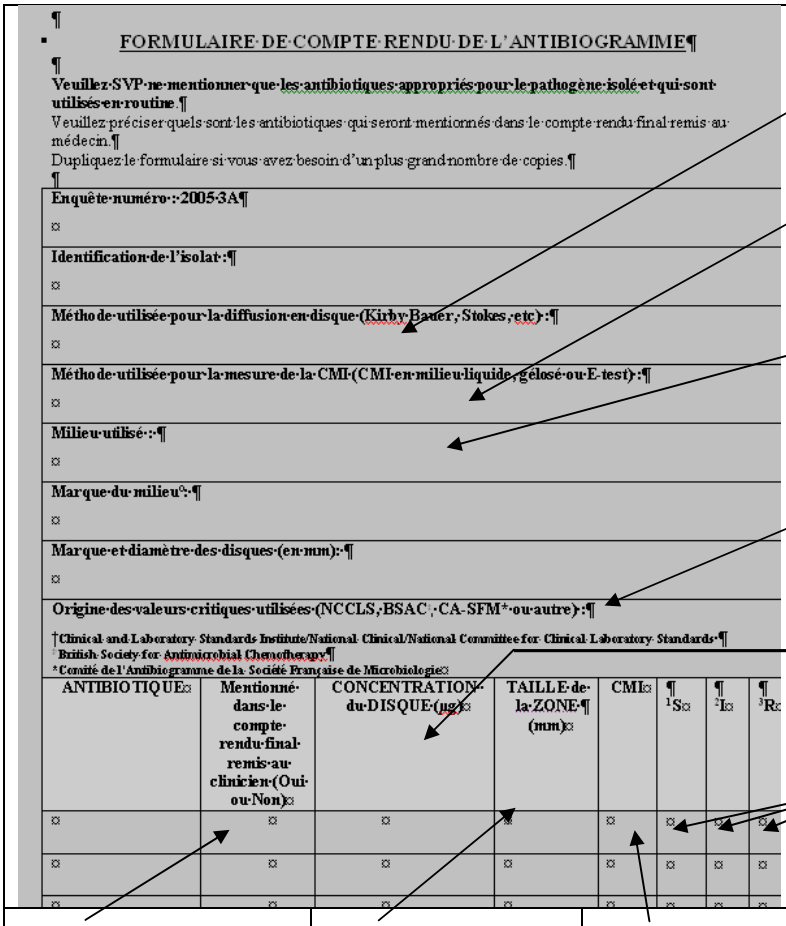
Les réponses des laboratoires sont notées comme « Acceptable », (attribution d'un score de 4 ou 3) ou « Inacceptable » (attribution d'un score de 1 ou 0). Une réponse « Acceptable » est correcte du point de vue microbiologique, et conduira à une réponse correcte en terme de prise en charge clinique et de santé publique. Des erreurs mineures se voient attribuer un score de « 3 ». Une réponse « Inacceptable » est une réponse qui est incorrecte du point de vue microbiologique et qui ne va pas conduire à une réponse correcte en terme de prise en charge clinique et de santé publique. Si des aspects de la réponse sont corrects mais que la réponse globale est fausse, un score de 1 est attribué. Dans chaque catégorie soumise à notation, le Comité Technique de Mise en Oeuvre du NICD décide quelles réponses sont acceptables, ceci de façon la plus objective possible. Ce commentaire donne une explication des différents scores attribués.

Par rapport à la catégorie « Antibiogramme », il est essentiel que les laboratoires remplissent le formulaire de réponse correctement et n'omettent aucune information. Si le formulaire de réponse du NICD n'est pas utilisé, le laboratoire doit être sûr de soumettre par ailleurs au NICD toutes les informations demandées dans le formulaire du NICD. Le NICD évalue les réponses du laboratoire par rapport à la norme utilisée ; les laboratoires doivent donc suivre la méthodologie énoncée dans cette norme (CLSI, SFM ou BSAC). Les erreurs de méthodologie impliquent que les résultats de l'antibiogramme ne peuvent pas être interprétés. En réalité, le fait de ne pas suivre de norme publiée implique que les résultats sont sans valeur ! Le NICD ne peut pas évaluer les résultats de l'antibiogramme avec impartialité et de façon objective si les laboratoires ne précisent pas la norme qu'ils suivent. Merci de se référer à la figure 1 ci-dessous qui souligne les sections importantes du formulaire de réponse devant être complétées. Le tableau 1 montre par exemple quels scores ont été attribués pour le spécimen 3C de l'étude 2005 3.

Tableau 1. Réponses possibles et attribution des scores pour le Spécimen 3C de l'étude 2005 3.

Microscopie	**4**	Bacille/Cocco-bacille Gram-négatif
	0	Aucune bactérie observée ou résultat de Gram incorrect
Culture et Identification	**4**	*Haemophilus influenzae*
	0	Identification incorrecte
	AC	Absence de croissance
	C	Contaminé
Sérotypage	**4**	*Haemophilus influenzae* sérotype c
	3	Envoyé pour typage /réactions non-spécifiques, impossible de typer et envoyé/ type non-b
	1	Non typable ou agglutination avec tous les antisérums monovalents
	0	Sérotypage incorrect
	AC	Absence de croissance
	C	Contaminé
Choix des antibiotiques	**4**	Ampicilline, amoxicilline+ac. clavulanique, ceftriaxone, chloramphénicol
	3	Amoxicilline testée au lieu de l'ampicilline (une céphalosporine de 3ème génération également testée)
	1	Test des béta-lactamines inapproprié
	0	Identification incorrecte ou non réalisée
	AC	Absence de croissance
	C	Contaminé
Résultats de l'antibiogramme	**4**	Norme précisée, méthodologie correcte, résultats corrects
	3	Norme précisée, méthodologie correcte, résultats comportant des erreurs mineures
	0	Norme non précisée ou méthodologie incorrecte (par rapport aux résultats obtenus)
	0	Identification incorrecte ou non réalisée
	AC	Absence de croissance
	C	Contaminé

Figure 1. Instructions de remplissage du formulaire de réponse de l'antibiogramme.



FORMULAIRE DE COMPTE RENDU DE L'ANTIBIOGRAMME

Veuillez SVP ne mentionner que les antibiotiques appropriés pour le pathogène isolé et qui sont utilisés en routine.

Veuillez préciser quels sont les antibiotiques qui seront mentionnés dans le compte rendu final remis au médecin.

Dupliquez le formulaire si vous avez besoin d'un plus grand nombre de copies.

Enquête numéro : 2005-3A

Identification de l'isolat :

Méthode utilisée pour la diffusion en disque (Kirby-Bauer, Stokes, etc) :

Méthode utilisée pour la mesure de la CMI (CMI en milieu liquide, gélosé ou E-test) :

Milieu utilisé :

Marque du milieu :

Marque et diamètre des disques (en mm) :

Origine des valeurs critiques utilisées (NCCLS, BSAC, CA-SFM* ou autre) :

† Clinical and Laboratory Standards Institute/National Clinical/National Committee for Clinical Laboratory Standards
‡ British Society for Antimicrobial Chemotherapy
* Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

ANTIBIOTIQUE	Mentionné dans le compte-rendu final remis au clinicien (Oui ou Non)	CONCENTRATION du DISQUE (µg)	TAILLE de la ZONE (mm)	CMI	[1]S	[2]I	[3]R

Toutes les normes (CLSI, SFM et BSAC) utilise la méthode de Kirby Bauer.

Si la CMI est réalisée, remplissez cette section. Si la CMI n'est pas réalisée, indiquez-le dans cette section en écrivant « non réalisée ».

Cette section réfère au milieu de culture sur lequel l'antibiogramme est réalisé. Il est essentiel que ce milieu soit conforme aux spécifications de la norme utilisée par le laboratoire.

Cette section DOIT être absolument remplie. Indiquez le nom et la version/année de publication de la norme utilisée. Si aucune norme n'est utilisée, indiquez-le en écrivant « Norme non utilisée ».

Cette colonne réfère à la quantité d'antibiotiques contenue dans le disque. Elle doit être conforme aux spécifications de la norme utilisée par le laboratoire.

Ces colonnes font référence à l'interprétation du diamètre de la zone d'inhibition ou à l'interprétation des résultats de CMI rapportés dans les colonnes de gauche. Le laboratoire doit se reporter aux consignes d'interprétation des diamètres d'inhibition ou des concentrations critiques figurant dans la norme utilisée (CLSI/BSAC/SFM) et cocher uniquement la colonne appropriée avec un X (soit 'S' soit 'I' soit 'R').

Cette colonne doit être remplie une fois que les tests ont été réalisés et les résultats interprétés. Le laboratoire doit évaluer si le clinicien doit être informé ou non de la sensibilité de la bactérie à cet antibiotique particulier. Il est pertinent de ne pas rapporter un antibiotique si il n'est pas utilisé *in vivo*; par exemple, l'oxacilline est utilisée pour prédire la susceptibilité du pneumocoque aux pénicillines mais n'est pas utilisée pour traiter les infections dues au pneumocoque.

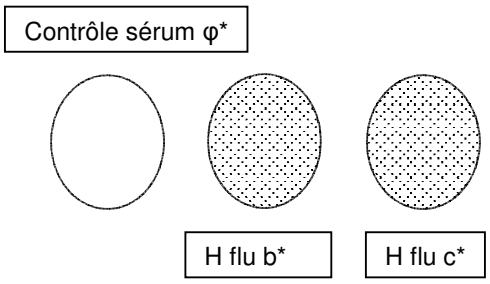
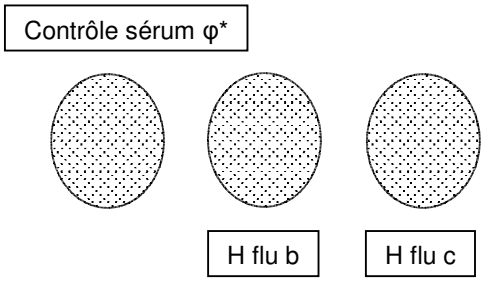
Cette colonne réfère au diamètre de la zone d'inhibition de croissance autour du disque d'antibiotique après une incubation appropriée du milieu. Le diamètre est noté dans cette colonne et doit être interprété selon la norme utilisée au laboratoire.

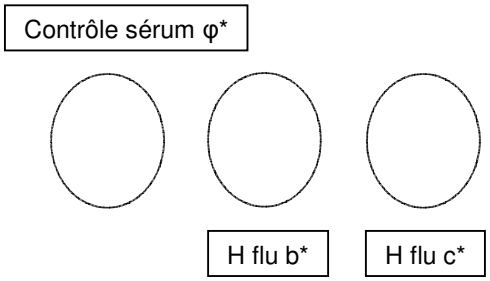
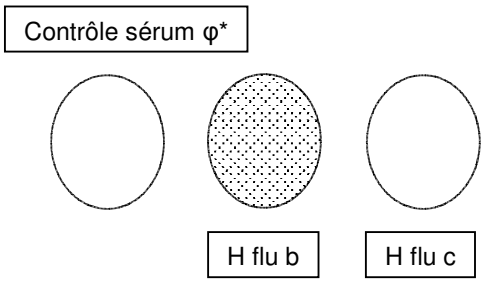
Cette colonne doit être remplie si une mesure de CMI est réalisée pour l'antibiotique de cette ligne. L'unité correcte doit également être notée à côté de la valeur de la CMI.

Annexe 2 : Comment rapporter les résultats de sérotypage/sérogroupages pour les germes méningés

Instructions pour rapporter les résultats de sérotypage/sérogroupage pour les germes méningés

L'identification des bactéries doit être confirmée avant de commencer le sérotypage/sérogroupage. Ces instructions impliquent que la qualité de tous les antisérums et réactifs soit contrôlée, et que des contrôles positifs et négatifs soient corrects.
*Les exemples sont donnés pour un contrôle à base de sérum physiologique et d'antisérums pour *Haemophilus influenzae* sérotype b et c; cependant, ces instructions sont aussi valables pour du sérum physiologique et des antisérums pour *Neisseria meningitidis* sérogroupe A, B, C etc. ou des antisérums pour d'autres sérotypes de *H. influenzae.*

Terme	**Critère de laboratoire**	**Action**	**Rapport au clinicien/ expert de santé publique**	
Agglutination non-spécifique/ réaction croisée	Agglutination avec plus d'un antisérum	-faire une subculture et essayer une nouvelle fois à partir d'une jeune culture d'une nuit -faire une subculture d'une nuit dans un milieu enrichi avec du sérum, centrifuger et utiliser le sédiment pour le typage. Une subculture fraîche du milieu sur une gélose au sang (10%) ou chocolat produit parfois une souche plus muqueuse augmentant la synthèse de la capsule	**Non-typable/Non-groupable** à cause d'une agglutination **non-spécifique**	
Auto-agglutination/ rugueuse	Agglutine avec le sérum physiologique	-faire une subculture et essayer une nouvelle fois à partir d'une jeune culture d'une nuit -faire une subculture d'une nuit dans un milieu enrichi avec du sérum, centrifuger et utiliser le sédiment pour le typage. Une subculture fraîche du milieu sur une gélose au sang (10%) ou chocolat produit parfois une souche plus muqueuse augmentant la synthèse de la capsule	**Non-typable/Non-groupable** à cause d'une **auto-agglutination**	

Souche non-réactive	Pas d'agglutination avec les antisérums spécifiques ni avec le sérum physiologique	Pas d'action si tous les contrôles sont bons.	**Non-typable/non-groupable**; si tous les antisera n'ont pas été testés, alors rapporter seulement ceux qui sont négatifs (ex. *Haemophilus influenzae* sérotype non-b non-c; ou *Neisseria meningitidis* sérogroupe non-A,B,C)	
Agglutination spécifique	Agglutination rapide avec un antisérum spécifique uniquement (les bactéries ont agglutiné et le fond apparaît clair), et absence d'agglutination pour le contrôle salin	Si il s'agit d'un antisérum polyvalent, répéter avec des antisérums monovalents.	*Haemophilus influenzae* sérotype b (par exemple)	

Pour *Haemophilus influenzae* les laboratoires peuvent vouloir tester tous les antisérums pour s'assurer d'une plus grande exactitude(1;2).
Tableau ci-dessus adapté en partie de Perilla M, Ajello G, Bopp C *et al*. Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World, World Health Organization, 2003.

(1) Bokermann S, Zanella RC, Lemos AP, de Andrade AL, Brandileone MC. Evaluation of methodology for serotyping invasive and nasopharyngeal isolates of *Haemophilus influenzae* in the ongoing surveillance in Brazil. J Clin Microbiol 2003 Dec;41(12) :5546-50.

(2) LaClaire LL, Tondella ML, Beall DS, Noble CA, Raghunathan PL, Rosenstein NE, et al. Identification of *Haemophilus influenzae* serotypes by standard slide agglutination serotyping and PCR-based capsule typing. J Clin Microbiol 2003 Jan;41(1) :393-6.

Commentaire sur l'enquête Microscopie du Paludisme 2005-3

Information générale

Merci de rapporter uniquement votre diagnostic final basé sur la lecture de la goutte épaisse et du frottis pour chaque échantillon. Cependant, il est possible que nous ne pouvions pas fournir une goutte épaisse et un frottis pour chaque échantillon. L'explication du système de notation est fournie dans le tableau 1 et le calcul de la notation pour cette étude est détaillé dans le tableau 2. La parasitémie n'a pas été évaluée lors de cette étude, mais le sera au cours des études futures.

Tableau 1 : Explication du système de notation

Score :	Résultat :	Définition :	Evaluation de la performance :
4	Résultat complètement correct	Un résultat accepté comme le résultat le plus correct et le plus pertinent cliniquement.	Acceptable
3	Résultat presque complètement correct	Un résultat pas entièrement correct mais dont l'imprécision n'a pas ou peu d'impact clinique ; un écart par rapport au résultat accepté comme le résultat le plus pertinent cliniquement.	Acceptable
	Séparateur	*Pour séparer les réponses acceptables des inacceptables*	NC
1	Un résultat incorrect de façon significative	Un résultat cliniquement pertinent pouvant conduire à une erreur de diagnostic ou de traitement	Inacceptable
0	Un résultat complètement incorrect	Un résultat cliniquement pertinent pouvant conduire à une erreur **majeure** de diagnostic ou de traitement	Inacceptable
0	Absence de résultat	Aucun résultat soumis par le participant	Inacceptable

Tableau 2 : Notation pour l'étude 2005-3 (Codes P1-P8 expliqués ci-dessous*)

Echantillon n°	Description de l'échantillon	Résultat attendu (code)	Résultat attendu (texte)	4	3	1	0
M1	Goutte épaisse et frottis	Non applicable	Non évalué				
M2	Goutte épaisse et frottis	P1	Aucun parasite(s) n'a été observé(s)	P1	NC	NC	N'importe quelle autre réponse
M3	Goutte épaisse uniquement	P2	*Plasmodium falciparum*	P2	P6	P2 + une autre espèce de paludisme	N'importe quelle autre réponse
M4	Goutte épaisse et frottis	P2	*Plasmodium falciparum*	P2	P6	P2 + une autre espèce de paludisme	N'importe quelle autre réponse
M5	Goutte épaisse et frottis	P2	*Plasmodium falciparum*	P2	P6	P2 + une autre espèce de paludisme	N'importe quelle autre réponse
M6	Goutte épaisse et frottis	P1	Aucun parasite(s) n'a été observé(s)	P1	NC	NC	N'importe quelle autre réponse

*P1 Aucun parasite(s) n'a été observé(s), P2 *Plasmodium falciparum*, P3 *Plasmodium malariae*, P4 *Plasmodium ovale*, P5 *Plasmodium vivax*, P6 *Plasmodium species*, P7 *Plasmodium* species non *P.falciparum*, P8 espèce responsables d'épisodes récurrents (*P.ovale/ P.vivax*).

Résumé de la performance des laboratoires pour l'étude microscopie du paludisme 2005-3

Tableau 3. Résumé des réponses des laboratoires pour les spécimens M1-6, Etude 2005-3

Lame	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Réponse attendue	Non évalué	Aucun parasite(s) n'a été observé(s)	*Plasmodium falciparum*	*Plasmodium falciparum*	*Plasmodium falciparum*	Aucun parasite(s) n'a été observé(s)
Microscopie du paludisme non réalisée dans le laboratoire participant	**2**	**2**	**2**	**2**	**2**	**2**
Laboratoires incapables de remplir le formulaire de réponse	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**
Score 4	**0**	**41**	**33**	**30**	**40**	**41**
Score 3	**0**	**0**	**3**	**0**	**1**	**0**
Score 1	**0**	**0**	**1**	**1**	**1**	**0**
Score 0	**0**	**15**	**19**	**25**	**14**	**15**
Non évalué	**56**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Résultat non retourné	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**
TOTAL	**66**	**66**	**66**	**66**	**66**	**66**

Spécimen M1 : cet échantillon était composé d'une goutte épaisse et d'un frottis sanguin colorés. Il n'y a pas eu de consensus entre les laboratoires de référence et le NICD, ni entre les laboratoires participants. L'échantillon n'a donc pas été noté.

Spécimen M2 : cet échantillon était composé d'une goutte épaisse et d'un frottis sanguin colorés ne contenant pas de parasites. Il y a eu un consensus de 100% entre les laboratoires de référence et 73% des participants ayant répondu ont obtenu un score acceptable (3 or 4).

Spécimen M3 : cet échantillon était composé d'une goutte épaisse colorée contenant uniquement *Plasmodium falciparum*. Il y a eu un consensus de 80% entre les laboratoires de référence et un laboratoire de référence a rapporté « Présence d'espèces de *Plasmodium* ». Il est préférable de rapporter "présence d'espèce de *Plasmodium*" lorsque vous n'êtes pas certain de l'espèce en cause, car cela ne va pas induire le clinicien en erreur. 64% des participants ayant répondu ont obtenu un score acceptable (3 ou 4).

Spécimen M4 : cet échantillon était composé d'une goutte épaisse et d'un frottis sanguin colorés contenant *Plasmodium falciparum*. Il y a eu un consensus de 100% entre les laboratoires de référence et 54% des participants ayant répondu ont obtenu un score acceptable (3 ou 4).

Spécimen M5 : cet échantillon était composé d'une goutte épaisse et d'un frottis sanguin colorés contenant *Plasmodium falciparum*. Il y a eu un consensus de 100% entre les laboratoires de référence et 73% des participants ayant répondu ont obtenu un score acceptable (3 ou 4).

Spécimen M6 : cet échantillon était composé d'une goutte épaisse et d'un frottis sanguin colorés ne contenant aucun parasite. Il y a eu un consensus de 100% entre les laboratoires de référence et 73% des participants ayant répondu ont obtenu un score acceptable (3 ou 4).

Commentaire sur l'enquête Bacilloscopie 2005-3

Contexte de l'enquête microscopie pour la Tuberculose

L'étude microscopique des frottis pour le diagnostic de tuberculose (bacilloscopie) est la pierre angulaire du diagnostic de la tuberculose pulmonaire. Elle a l'avantage d'être un test non coûteux et facilement réalisable. Cependant, afin de maximiser l'impact diagnostique de ce test, il est indispensable que sa qualité soit contrôlée. A cette fin, l'OMS, l'Association des Laboratoires de Santé Publique (APHL) et le CDC (Centers for Disease Control, Atlanta), USA, ont publié un document intitulé « Evaluation Externe de la Qualité de la bacilloscopie » (« External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy ») en 2002. Grâce à un don du gouvernement hollandais au Bureau OMS de Lyon, un programme d'évaluation externe de la qualité (EEQ) pour la bacilloscopie a été ajouté au programme OMS/AFRO existant pour la bactériologie. Ce programme suit les recommandations de l'OMS publiées dans le document mentionné ci-dessus sur l'examen d'aptitude (« proficiency testing ») ou le test de panels (« panel testing ») pour la bacilloscopie. D'après ces recommandations, les erreurs de bacilloscopie peuvent être classées comme « Erreur de quantification, Faux positif Elevé ou Faible, ou Faux négatif Elevé ou Faible » (*voir la procédure opératoire standardisée OMS 0012 de l'annexe 4B de ce document*).

Revue des performances des laboratoires pour l'enquête microscopie pour la tuberculose 2005-3

Cette enquête comprenait 7 lames (Lame T1-7) parmi lesquelles les lames T1-4 étaient colorées et T5-7 non colorées. Elles ont été envoyées à l'ensemble des 72 laboratoires participants au programme EEQ. Un total de 43 laboratoires a été capable de participer et de répondre à l'enquête. Au total 576 lames ont été lues par les laboratoires participants. 7 erreurs majeures et 15 erreurs mineures ont été commises. Le tableau 1 ci dessous détaille le nombre de laboratoires ayant obtenu chaque score possible pour chaque spécimen de l'enquête. La plupart des problèmes ont été rencontrés avec les lames non colorées, pour lesquelles la variabilité dans les réponses a été plus grande que pour les lames déjà colorées.

Tableau 1. Nombre de laboratoires et scores obtenus pour les spécimens A-F, étude 2005 3.

Lame	Réponse attendue	Nombre de répondants	Nombre de laboratoires			
			Correct	Erreur de Quantification	Faux positifs ou négatifs, Elevés	Faux positifs ou négatifs, Faibles
T1	BAAR non observés	**43**	**42**	**-**	**-**	**1**
T2	2+	**43**	**41**	**2**	**-**	**-**
T3	2+	**43**	**37**	**5**	**1**	
T4	BAAR non observés	**43**	**43**	**-**	**-**	**-**
T5	2+	**41**	**31**	**6**	**4**	**-**
T6	BAAR non observés	**42**	**41**	**-**	**-**	**1**
T7	BAAR non observés	**42**	**40**	**-**	**2**	**-**

ANNEXE 6

Etat financier du programme d'EEQ OMS/NICD

8.1 Ressources financières

La participation au programme d'EEQ OMS/NICD est gratuite, le financement du programme étant assuré par l'OMS et des contributions volontaires extérieures (soit sous forme de financement direct, soit sous forme de contributions en nature). Parallèlement aux ressources fournies par l'intermédiaire du bureau OMS Lyon et du bureau régional OMS pour l'Afrique, l'OMS tient à exprimer toute sa reconnaissance pour leur soutien aux organismes suivants :

- Les Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA (contribution en nature)
- GAVI par le biais de WHO Regional Paediatric Bacterial Meningitis Unit (financement direct)
- L'Institut National des Maladies Transmissibles (NICD), Johannesburg, République d'Afrique du Sud (contribution en nature)
- Les laboratoires de référence (contribution en nature)
- Le Gouvernement du Royaume des Pays-Bas (financement direct, volet paludisme et tuberculose)
- L'Agence Américaine pour le Développement International (USAID).

8.2 Catégories budgétaires

Le budget pour la quatrième année (2005–2006) du programme d'EEQ OMS/NICD s'élevait à 93 501 $ US. Le Tableau 1 ci-dessous indique la répartition de cette somme. Par ailleurs, il faut préciser que c'est le NICD qui a payé les salaires du personnel du CTMO (voir Annexe 1), exception faite des salaires mentionnés ci-dessous.

Tableau 1 Catégories budgétaires

Programme d'EEQ de la bactériologie	**$ US**
Coûts en personnel (technicien à mi-temps), fournitures de bureau, compte rendu	26 336
Emballage et envoi	34 444
Traduction	1 493
Réactifs de laboratoire, consommables, matériel	2 948
Réunion du comité consultatif régional en 2006	3 008
Sous-total (bactériologie)	68 229
Programme d'EEQ de la microscopie (paludisme et tuberculose)	
Formation pour l'organisateur	4 000
Technicien médical junior	9 552
Emballage et envoi	8 257
Réactifs de laboratoire, consommables, matériel (paludisme)	2 808
Réactifs de laboratoire, consommables, matériel (tuberculose)	655
Sous-total (paludisme et tuberculose)	25 272
TOTAL	**93 501**