

# PLAN

## LISTE DES ABREVIATIONS

## INTRODUCTION

## ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. Démarche d'accréditation au Laboratoire de Biologie Médicale

#### 1.1. Historique du concept de qualité

- 1.1.1. Naissance de l'assurance qualité
- 1.1.2. Management qualité et « qualité totale »
- 1.1.3. Référentiels et normes ISO

#### 1.2. Qualité dans les Laboratoires de Biologie Médicale

- 1.2.1. Contexte normatif et évolution
  - a) Premières exigences réglementaires : loi n° 75-626 du 11 juillet 1975
  - b) Instauration d'un Contrôle National de Qualité (CNQ)
  - c) Concept des Bonnes Pratiques du Laboratoire (BPL)
  - d) Notions d'accréditation et de certification dans la réforme hospitalière des années 1990
  - e) Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale (GBEA)
  - f) Années 2000 : état des lieux de la qualité dans les Laboratoires de Biologie Médicale et projet de réforme
  - g) Réforme de la biologie médicale de 2010
- 1.2.2. Accréditation des Laboratoires de Biologie Médicale
  - a) Définition de l'accréditation
  - b) Organisme accréditeur
  - c) Portée d'accréditation
  - d) Processus d'accréditation des Laboratoires de Biologie Médicale
  - e) Déroulement de l'audit

#### 1.3. Norme NF EN ISO 15189 et application en sérologie infectieuse

- 1.3.1. Norme NF EN ISO 15189
- 1.3.2. Application en sérologie infectieuse

### 2. La toxoplasmose

#### 2.1. Le parasite

- 2.1.1. Structure du parasite
  - a) Tachyzoïte
  - b) Bradyzoïte
  - c) Oocyste
- 2.1.2. Cycle parasitaire
  - a) Cycle sexué chez l'hôte définitif
  - b) Cycle asexué chez les hôtes intermédiaires

#### 2.2. Épidémiologie

- 2.2.1. Mode de contamination
  - a) Transmission par l'ingestion d'oocystes
  - b) Transmission par l'ingestion de kystes
  - c) Transmission par le biais des tachyzoïtes
- 2.2.2. Fréquence
  - a) Séroprévalence de la toxoplasmose
  - b) Fréquence de la toxoplasmose congénitale
- 2.2.3. Prévention primaire – Règles hygiéno-diététiques
- 2.2.4. Génotypes

#### 2.3. Aspects cliniques

- 2.3.1. Toxoplasmose chez le patient immunocompétent
- 2.3.2. Toxoplasmose congénitale
- 2.3.3. Toxoplasmose chez le patient immunodéprimé

## **2.4. Diagnostic biologique de la toxoplasmose**

- 2.4.1. Diagnostic sérologique
  - a) Cinétique des anticorps antitoxoplasmiques
  - b) Techniques sérologiques de première intention
  - c) Techniques de seconde intention
- 2.4.2. Diagnostic direct
- 2.4.3. Stratégie diagnostique
  - a) Rôle du CNR dans l'évolution des pratiques de diagnostic de la toxoplasmose
  - b) Recommandations et stratégie diagnostique selon le contexte clinique

## **2.5. Prise en charge thérapeutique**

- 2.5.1. Traitement chez un patient immunocompétent
- 2.5.2. Traitement chez la femme enceinte
- 2.5.3. Traitement chez l'enfant
- 2.5.4. Traitement chez un patient immunodéprimé
- 2.5.5. Traitement de la toxoplasmose oculaire

## **ÉTUDE PERSONNELLE**

### **1. Matériel et méthodes**

#### **1.1. Outils et moyens utilisés**

- 1.1.1. Documents du COFRAC
  - a) Documents de RÉFérence (REF)
  - b) Guides Techniques d'Accréditation (GTA)
  - c) Documents d'INFormation (INF)
  - d) FORMulaires (FORM)
- 1.1.2. Outils de la qualité
  - a) Cycle PDCA (roue de Deming)
  - b) Diagramme de Gantt
  - c) Tableau de bord et gestion documentaire
  - d) Analyse des Modes de Défaillance de leurs Effets et de leur Criticité (AMDEC)
  - e) Méthode Qui ? Quoi ? Où ? Quand ? Comment ? Combien ? Pourquoi ? (QQOQCCP)
  - f) Réunions

#### **1.2. Démarche mise en œuvre dans le diagnostic de la toxoplasmose au sein de l'UF de Parasitologie - Mycologie**

- 1.2.1. Positionnement de l'UF au sein du Plateau de Biologie Hospitalière et état des lieux de l'accréditation des examens
  - a) Présentation de l'UF de Parasitologie - Mycologie
  - b) Démarche d'accréditation
- 1.2.2. Circuit de prise en charge d'une analyse de toxoplasmose
  - a) Phase préanalytique
  - b) Phase analytique
  - c) Gestion des calibrations, des maintenances et des contrôles
  - d) Phase postanalytique
- 1.2.3. Stratégie d'utilisation des techniques sérologiques au sein de l'UF

#### **1.3. Dossiers de vérification de méthodes**

- 1.3.1. Dossiers de vérification de méthodes d'une technique quantitative
  - a) Tests faisant l'objet d'un essai sur site
  - b) Tests faisant l'objet d'une étude bibliographique
- 1.3.2. Dossiers de vérification de méthodes d'une technique qualitative
  - a) Tests faisant l'objet d'un essai sur site
  - b) Tests faisant l'objet d'une étude bibliographique

#### **1.4. Audit croisé**

- 1.4.1. Préparation à l'audit croisé
- 1.4.2. Déroulement de l'audit croisé
  - a) Réunion d'ouverture
  - b) Évaluation sur site
  - c) Synthèse des auditeurs et réunion de clôture

## **2. Résultats**

### **2.1. Phase préanalytique**

### **2.2. Phase analytique**

2.2.1. Dossiers de vérification de méthodes des tests quantitatifs (SH FORM 43)

- a) Tests qui ont fait l'objet d'un essai sur site
- b) Tests qui ont fait l'objet d'une étude bibliographique

2.2.2. Dossiers de vérification des tests qualitatifs (SH FORM 43)

- a) Tests qui ont fait l'objet d'un essai sur site
- b) Tests qui ont fait l'objet d'une étude bibliographique

2.2.3. Procédures dégradées

2.2.4. Habilitation technique pour la sérologie automatisée de la toxoplasmose sur l'Architect i2000

### **2.3. Gestion des contrôles et des maintenances**

2.3.1. Gestion quotidienne des CIQ sur l'Architect i2000

2.3.2. Suivi à moyen et long terme des CIQ sur l'Architect i2000

- a) Suivi à moyen terme
- b) Suivi à long terme

2.3.3. Gestion de la période probatoire sur l'Architect i2000

2.3.4. Gestion des EEQ et CIL en sérologie de la toxoplasmose

2.3.5. Maintenance journalière de l'EUROBlot Master

### **2.4. Phase postanalytique**

2.4.1. Validation biologique des examens du sérodiagnostic de la toxoplasmose

2.4.2. Habilitation à la validation des examens du sérodiagnostic de la toxoplasmose

2.4.3. Gestion de la sérothèque

### **2.5. Audit croisé**

2.5.1. Les points forts relatifs aux exigences techniques (chapitre 5 de la norme NF EN ISO 15189)

2.5.2. Les points forts relatifs au management (chapitre 4 de la norme NF EN ISO 15189)

## **3. Discussion**

## **4. Conclusion**

## **BIBLIOGRAPHIE**

## **TABLE DES ILLUSTRATIONS**

## **TABLE DES TABLEAUX**

## **TABLE DES MATIERES**

## **ANNEXES**

## Liste des abréviations

<b>ADHS</b>	Agglutination Directe de Haute Sensibilité
<b>AES</b>	Accident d'Exposition au Sang
<b>AFNOR</b>	Association Française de NORmalisation
<b>AFSSAPS</b>	Agence Française de Sécurité SANitaire des Produits de Santé
<b>AMDEC</b>	Analyse des Modes de Défaillance de leurs Effets et de leur Criticité
<b>ANAES</b>	Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé
<b>ANSES</b>	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
<b>ANSM</b>	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
<b>AQL</b>	Acceptance Quality Level
<b>ARS</b>	Agence Régionale de Santé
<b>ATNC</b>	Agents Transmissibles Non Conventionnels
<b>BPL</b>	Bonnes Pratiques de Laboratoire
<b>CEN</b>	Comité Européen de Normalisation
<b>CGW</b>	Coefficient de Goldmann-Witmer
<b>CH</b>	Centre Hospitalier
<b>CHU</b>	Centre Hospitalier Universitaire
<b>CIL</b>	Contrôle Inter Laboratoires
<b>CMIA</b>	Chemiluminescence Microparticle Immuno Assay
<b>CNQ</b>	Contrôle National de Qualité
<b>CNR</b>	Centre National de Référence
<b>COFRAC</b>	COmité FRançais d'ACcréditation
<b>CPCS</b>	Centre de Prélèvements et de Consultations Spécialisées
<b>CPDPN</b>	Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Pré Natal
<b>CQE</b>	Contrôle de Qualité Externe
<b>CQI (CIQ)</b>	Contrôle de Qualité Interne (Contrôle Interne de Qualité)
<b>CSH</b>	Cellules Souches Hématopoïétiques
<b>CSP</b>	Code de la Santé Publique
<b>CTA</b>	Commission Technique d'Accréditation
<b>CTCB</b>	Centre Toulousain pour le Contrôle de la qualité en Biologie
<b>CV</b>	Coefficient de Variation
<b>DM-DIV</b>	Dispositif Médical de Diagnostic <i>In Vitro</i>
<b>DO</b>	Document Opérationnel
<b>DPC</b>	Développement Professionnel Continu
<b>DPN</b>	Diagnostic Pré Natal
<b>DRASS</b>	Directions Régionales des Affaires Sanitaires et Sociales
<b>DRJSCS</b>	Directions Régionales de la Jeunesse, des Sports et de la Cohésion Sociale
<b>DT</b>	Dye Test
<b>EBMD</b>	Examens de Biologie Médicale Délocalisée
<b>EEQ</b>	Évaluation Externe de la Qualité
<b>ELIFA</b>	Enzyme Linked Immuno Filtration Assay
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<b>EPP</b>	Évaluation des Pratiques Professionnelles
<b>EQ</b>	Évaluateur Qualiticien

<b>ET</b>	Évaluateur Technique
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FO</b>	FOrmulaire d'enregistrement
<b>GBEA</b>	Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale
<b>GIPC</b>	Groupe Interministériel des Produits Chimiques
<b>GLIMS</b>	General Laboratory Information Management System
<b>GLP</b>	Good Laboratory Practice
<b>GT</b>	Groupe de Travail
<b>HA</b>	Humeur Aqueuse
<b>HAS</b>	Haute Autorité de Santé
<b>IFI</b>	Immuno Fluorescence Indirecte
<b>IGAS</b>	Inspection Générale des Affaires Sociales
<b>ILAC</b>	International Laboratory Accreditation Cooperation
<b>IM</b>	Incertitude de Mesure
<b>ISAGA</b>	Immuno Sorbent AGglutination Assay
<b>LA</b>	Liquide Amniotique
<b>LBA</b>	Lavage Broncho-Alvéolaire
<b>LBM</b>	Laboratoire de Biologie Médicale
<b>LCS</b>	Liquide Cérébro-Spinal
<b>LNS</b>	Laboratoire National de la Santé
<b>MGG</b>	May Grünwald Giemsa
<b>MJ</b>	Maintenance Journalière
<b>NABM</b>	Nomenclature des Actes de Biologie Médicale
<b>OCDE</b>	Organisation de Coopération et de Développement Économiques
<b>PBH</b>	Plateau de Biologie Hospitalière
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PDCA</b>	Plan Do Check Act
<b>PHRC</b>	Projet Hospitalier de Recherche Clinique
<b>PLEVER</b>	Performance LEVER
<b>PMO</b>	Prélèvement Multi Organes
<b>PSA</b>	Pyriméthamine Sulfadiazine Acide folinique
<b>PTA</b>	Plateau Technique Automatisé
<b>QUAMIC</b>	QUAlité en MICRobiologie
<b>RCEB</b>	Réception Centralisée des Échantillons Biologiques
<b>RÉMIC</b>	RÉférentiel en MICRobiologie médicale
<b>SA</b>	Semaine d'Aménorrhée
<b>SH</b>	Santé Humaine
<b>SIDA</b>	Syndrome d'Immuno Déficience Acquis
<b>SMQ</b>	Système de Management de la Qualité
<b>SPC</b>	Statistical Process Control
<b>SQC</b>	Statistical Quality Control
<b>TC</b>	Toxoplasmose Congénitale
<b>TO</b>	Toxoplasmose Oculaire
<b>TQC</b>	Total Quality Control
<b>TQM</b>	Total Quality Management
<b>UF</b>	Unité Fonctionnelle

<b>UI</b>	Unité Internationale
<b>URT</b>	Unity Real Time
<b>VIH</b>	Virus de l'Immunodéficience Humaine
<b>WB</b>	Western-Blot

## Introduction

Une réforme de la biologie médicale a été engagée à partir de 2010 en France (ordonnance d'application n° 2010-49). Cette réforme repose sur une accréditation des Laboratoires de Biologie Médicale (LBM) qui vise à garantir la qualité et la fiabilité des résultats des analyses biologiques effectuées pour les patients. La loi n° 2013-442 du 30 mai 2013, portant réforme de la biologie médicale, apporte des précisions à l'ordonnance de 2010, notamment sur le calendrier de l'accréditation et le pourcentage d'examens devant être accrédités à chaque étape, l'objectif étant d'accréditer la totalité des examens fin 2020. Le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) est aujourd'hui l'unique organisme reconnu pour l'accréditation des LBM en France. La norme de référence désignée est la norme européenne NF EN ISO 15189.

Depuis 2013, le Plateau de Biologie Hospitalière (PBH) du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) d'Angers s'est engagé dans cette démarche d'accréditation. L'échéancier imposé par la loi a jusqu'alors été respecté et chaque année, le PBH poursuit cette démarche en demandant des extensions d'accréditation pour les examens non accrédités auprès du COFRAC, permettant d'ouvrir de nouvelles lignes de portée d'accréditation. Ainsi, en 2019, au sein du Département de Biologie des Agents Infectieux, les Unités Fonctionnelles (UF) de Parasitologie - Mycologie et de Virologie ont fait une demande d'extension en portée A des examens de sérologies infectieuses présents au sein de la ligne de portée BM MG01.

Notre travail qui s'inscrit dans cette démarche a été principalement axé sur la démarche d'accréditation des examens sérologiques de la toxoplasmose. Dans ce domaine, l'UF qui est intégrée au Centre National de Référence (CNR) de la toxoplasmose, exerce un rôle d'expert dans le diagnostic biologique de la toxoplasmose. Il dispose pour cela d'un ensemble de techniques sérologiques et de biologie moléculaire. Dans ce contexte notre travail a porté sur l'accréditation des techniques sérologiques, utilisées au sein de l'UF de Parasitologie - Mycologie, à la fois des tests immunoenzymatiques automatisés sur l'Architect i2000 utilisés en dépistage, ainsi qu'aux méthodes complémentaires d'expertises par technique Western-Blot (WB) (IgG et IgG - IgM mère/enfant), par technique d'agglutination au latex, et par technique d'immunocapture - agglutination (IgM et IgA). Ce projet initié au sein de l'UF de Parasitologie - Mycologie a aussi nécessité d'homogénéiser certaines pratiques communes avec l'UF de Virologie et nous avons pu bénéficier de la coopération étroite des techniciens et des biologistes de cette UF afin de répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189.

# **Étude bibliographique**

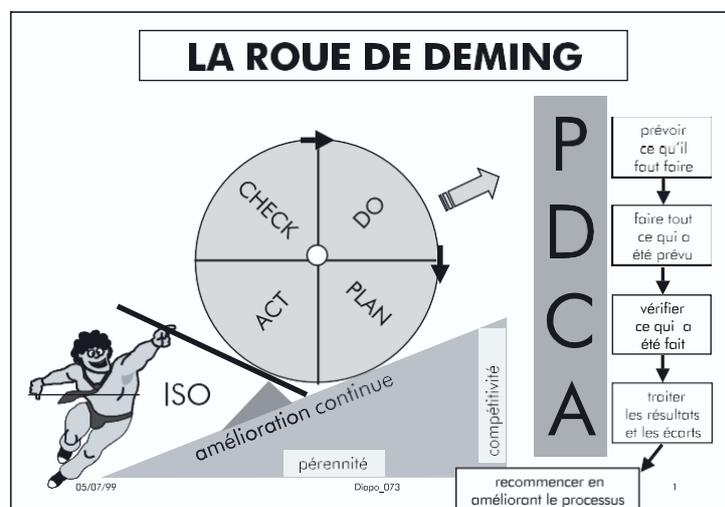
# 1. Démarche d'accréditation au Laboratoire de Biologie Médicale

## 1.1. Historique du concept de qualité

### 1.1.1. Naissance de l'assurance qualité

Avant d'être appliquées au domaine de la santé, et notamment à la biologie médicale, les notions d'assurance qualité se sont surtout développées au XX<sup>ème</sup> siècle dans le domaine militaire et industriel (1).

Ainsi, à la fin de la Seconde Guerre mondiale, Deming, mathématicien et physicien américain, développe la notion du cycle Plan Do Check Act (PDCA) appliquée initialement à la statistique pour le processus de fabrication industrielle (2). Le cycle PDCA, aujourd'hui connu sous le nom de « roue de Deming » (**Figure 1**) est un cycle dynamique reposant sur l'amélioration continue et la maîtrise des processus contribuant à un système efficace du processus de management, qui selon Deming contribue à 94 % à la qualité finale du produit (3). Sa philosophie sur les bonnes pratiques de management de la qualité est construite autour de 14 points basés à la fois sur la compréhension et la connaissance (2). Selon lui, la qualité requiert l'implication de tous les acteurs de l'entreprise. La roue de Deming est composée de 4 étapes : planifier, préparer, définir (Plan) / faire, mettre en œuvre (Do) / vérifier, analyser, contrôler, évaluer (Check) / agir, améliorer, décider (Act) (2).



**Figure 1** Roue de Deming (cycle PDCA) et amélioration continue (2)

Les premières normes d'assurance qualité sont mises en place dans l'armée des États-Unis. En 1942 d'abord, naît Acceptance Quality Level (AQL) qui définit des procédures pour l'acceptation des lots, puis s'en suit le Statistical Quality Control (SQC) qui introduit la notion d'un contrôle final des produits par des inspecteurs. Ce système qui se limite à des contrôles sur le produit fini reste cependant imparfait et évolue ensuite vers un autre système d'assurance qualité appelé Statistical Process Control (SPC) qui utilise une approche préventive basée sur la maîtrise du processus par l'utilisation de cartes de contrôle.

Le contrôle se fait en cours de production du produit et non plus uniquement sur le produit final, permettant de diminuer le nombre de produits non conformes, et d'identifier les causes de non-conformités afin d'entreprendre des actions correctives et préventives (1).

En France, l'assurance qualité n'est apparue qu'à la fin des années 1950 lors des premiers échanges technologiques avec les américains qui utilisaient encore le SQC à cette époque. C'est la commission de l'énergie atomique et la compagnie de l'électricité de France qui ont commencé à employer la notion de l'assurance qualité plus connue sous le nom de « sûreté de fonctionnement » (1).

### 1.1.2. Management qualité et « qualité totale »

Juran, considéré comme le principal fondateur des démarches qualité, publie en 1951 une monographie intitulée Juran's Quality Control Handbook (4) qui est encore aujourd'hui considérée comme une référence. Il a développé le principe de Pareto selon lequel 80 % des problèmes viennent de 20 % des causes, autrement dit il convient de chercher les causes les plus fréquentes pour les résoudre en premier. Il insiste sur la dimension humaine de la gestion de la qualité et souligne le rôle primordial de la direction de l'entreprise dans le déploiement de la qualité par la suppression de la résistance au changement, l'instauration de la communication et de la formation pour l'ensemble des acteurs de l'entreprise. Comme pour Deming, le principe de l'amélioration continue est au cœur de la qualité dès la conception du produit (4,5).

Le concept de qualité totale (Total Quality Control ou TQC) est inventé par Feigenbaum (6). Il évoluera ensuite vers le concept du Total Quality Management (TQM) qui considère l'entreprise comme un système, un processus prenant en compte un ensemble d'activités corrélées, interactives dans leur globalité (5).

En 1962, Ishikawa publie un manuel sur la maîtrise de la qualité proposant des outils qui permettraient de résoudre 95 % des problèmes (7). L'outil le plus connu est le diagramme causes - effet encore appelé « arête de poisson » (**Figure 2**) : toutes les causes aboutissent à un seul effet. Cet outil permet d'identifier toutes les causes possibles à un problème et de mettre en place en amont des actions préventives (7). Ce concept est à la base du principe des « 5 M » pour Matières/Main d'œuvre/Matériel/Méthodes/Milieu, utilisé pour élaborer la maîtrise des risques d'un processus (8).

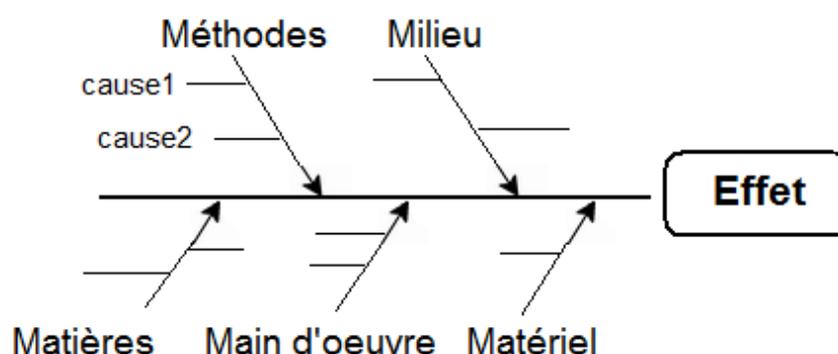


Figure 2 Diagramme causes - effet (Ishikawa) (8)

### 1.1.3. Référentiels et normes ISO

Conjointement aux évolutions des concepts de l'assurance qualité, une structuration et une standardisation des documents se mettent en place avec l'apparition de référentiels, et notamment des normes ISO 9000. Ces normes sont rédigées par un organisme international de normalisation créé en 1947, dont le siège est à Genève et qui est composé de 164 pays (9). Le terme ISO vient du nom dérivé grec *isos* signifiant « égal », ainsi quel que soit le pays, la langue, la forme abrégée du nom de l'organisation est toujours ISO. La création de ces normes a pour but d'harmoniser les nombreuses normes développées à travers le monde dans différents secteurs, et dont la multiplication avait causé une confusion dans les milieux industriels (1,9). Les entreprises peuvent prouver le bon fonctionnement de leur Système de Management de la Qualité (SMQ) à travers ces normes ISO, en obtenant une certification par un organisme extérieur. La certification est définie comme une assurance écrite sous la forme d'un certificat, donnée par une tierce partie, qu'un produit, service ou système est conforme à des exigences spécifiques (9).

Cet organisme collabore avec le Comité Européen de Normalisation (CEN) créé en 1961, qui est composé de 34 pays européens, et dont le siège est à Bruxelles. Il a pour rôle d'élaborer et de définir des normes au niveau européen couvrant plusieurs secteurs (10). Au niveau national c'est l'Association Française de NORmalisation (AFNOR), créée en 1926 et faisant partie des membres de l'ISO et du CEN (**Figure 3**), qui a pour rôle de normaliser les normes françaises. Elle est en charge de recenser les besoins en normes nouvelles, coordonner les programmes de normalisation, promouvoir la normalisation, produire des normes françaises, participer à la rédaction de normes européennes et internationales, représenter les intérêts français dans les instances internationales, et de diffuser les normes (11).



**Figure 3** La normalisation en France (11)

En 1987, l'organisme ISO publie sa première norme relative au SMQ appelée ISO 9000:1987. La famille des normes ISO, fait l'objet de plusieurs textes qui incluent des révisions successives. Nous retrouvons ainsi actuellement, en 2019, l'ISO 9000:2015 relative aux principes essentiels et vocabulaire liés au SMQ (12). Persistent également à ce jour la norme ISO 9001:2015 relative aux exigences du SMQ, et constituant le seul référentiel pouvant faire l'objet d'une certification (13), ainsi que la norme ISO 9004:2018 relative à la qualité d'un organisme (14). Cette dernière reprend les 7 principes fondamentaux de management : orientation « client », leadership, implication du personnel, approche processus, amélioration continue, prise de décision fondée sur des preuves, et enfin le management des relations avec les parties intéressées.

L'ISO 9001 a inspiré de nombreux documents et autres normes pour des applications sectorielles dont le secteur médical avec la norme NF EN ISO 15189 (9).

## **1.2. Qualité dans les Laboratoires de Biologie Médicale**

### **1.2.1. Contexte normatif et évolution**

#### **a) Premières exigences réglementaires : loi n° 75-626 du 11 juillet 1975**

Cette loi qui définit les conditions d'exercices de la biologie médicale énonce également les premières exigences réglementaires en matière de qualité. Elle impose ainsi un délai de 8 ans pour se conformer aux dispositions de l'article L. 761 du Code de la Santé Publique (CSP) définissant les conditions de fonctionnement des LBM, qui incluent notamment des mesures sur le contrôle de qualité des examens, mentionnées dans l'article L. 761-14 du CSP (15). Cette loi restera en vigueur jusqu'en 2010.

#### **b) Instauration d'un Contrôle National de Qualité (CNQ)**

Le CNQ a été rendu obligatoire par la loi du 11 juillet 1975 donnant jour au décret d'application n° 78-1148 du 7 décembre 1978, remplacé ensuite par le décret n° 94-1049 du 2 décembre 1994 (16). Ce dernier explique les différentes dispositions du CNQ appliquées au LBM. L'article 9, de ce présent décret, met en avant la conformité du résultat attendu et les mesures à prendre en cas de contrôle non conforme pouvant avoir un impact pour le patient (notion d'amélioration continue).

Le CNQ initialement organisé par le Laboratoire National de la Santé (LNS) repris en 1993 par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) appelée aujourd'hui l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), est une Évaluation Externe de la Qualité (EEQ) consistant en une analyse biologique réalisée par tous les laboratoires en France à partir d'un même échantillon et une comparaison des résultats obtenus. Il permet de vérifier la performance d'un laboratoire dans la réalisation des examens, et d'entretenir une confiance avec le patient en lui donnant une preuve sur la fiabilité de ses résultats (17).

### **c) Concept des Bonnes Pratiques du Laboratoire (BPL)**

Les BPL sont définies comme étant un système de garantie de qualité portant sur le mode d'organisation des études de sécurité non cliniques ayant trait à la santé et à l'environnement et sur les conditions dans lesquelles ces études sont planifiées, réalisées, contrôlées, enregistrées, archivées et diffusées (18). Inspirées des BPL publiées en 1976 par la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis, connues sous le nom de GLP pour Good Laboratory Practice, elles ont été créées par l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) en 1981.

Initialement cantonnées au contrôle des produits chimiques, ces BPL se sont étendues à plusieurs domaines d'activités (produits pharmaceutiques, pesticides, produits alimentaires, cosmétiques, médicaments vétérinaires) donnant lieu à une première révision en 1997 et permettant de garantir la qualité, la reproductibilité et l'intégrité des données afin qu'elles puissent être reconnues au niveau international sans qu'il soit nécessaire de reproduire les études (19,20). Les BPL exigent ainsi la mise en place d'un système interne au laboratoire devant vérifier que l'étude est conduite en conformité avec le protocole et les procédures opératoires, et que les faits rapportés sont exacts. Nous retrouvons le cycle PDCA ou roue de Deming au sein de ces BPL : Prévoir/Exécuter/Contrôler - Tracer/Améliorer. Elles sont contrôlées par 3 autorités en France, l'ANSM, l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), et le Groupe Interministériel des Produits Chimiques (GIPC).

Une section « Laboratoire » a été créée au sein du COFRAC dans le but d'apporter un soutien au GIPC en adoptant un rôle d'expert dans la reconnaissance de la conformité aux principes des BPL. Le COFRAC organise les inspections de surveillance, assure le recrutement et la formation des inspecteurs et des experts techniques. Un référentiel (LAB BPL REF 05) est relatif au règlement pour l'évaluation de la conformité aux principes de BPL (21).

En 1989, des normes européennes EN 45000 ont été rédigées par le CEN réglementant la biologie médicale. Ces normes inspirées des normes ISO 9000 sont centrées sur le domaine des essais et de la certification mais ne traitent pas de l'inspection. Elles vont évoluer et la majorité d'entre elles seront transformées en « Guide ISO/CEI » ou donneront naissance aux normes de la série NF EN ISO 17000 dont la NF EN ISO 17025 créée en 1999 pour les laboratoires d'étalonnages et d'essais (22).

### **d) Notions d'accréditation et de certification dans la réforme hospitalière des années 1990**

La loi n° 91-748 du 31 juillet 1991 portant réforme hospitalière, impose aux établissements de santé l'obligation d'établir un projet (23). Les principes de cette loi sont repris et complétés par l'ordonnance n° 96-346 du 24 avril 1996 (24) qui stipule l'obligation pour tous les établissements de santé, publics et privés, d'être engagés dans une procédure d'accréditation.

Pour cela, ces établissements doivent prendre en compte les exigences du manuel d'accréditation rédigé par l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé (ANAES). Ce manuel décrit les objectifs et les principes de l'accréditation ainsi que les différents référentiels disponibles pour accompagner et guider les établissements de santé au sein de cette démarche (25). Plusieurs versions se sont succédées, et ont permis d'une part de simplifier ce manuel et d'autre part de laisser paraître progressivement les notions d'Évaluation des Pratiques Professionnelles (EPP) et du Développement Professionnel Continu (DPC). Ce manuel intègre actuellement, avec sa dernière version de 2014, la loi du 4 mars 2002 relative aux droits des malades et laissant transparaître 3 axes phares : la maîtrise des risques, le management, et le patient (26).

Cette démarche qui reste à l'initiative du directeur de l'établissement, comporte le développement de la formation du personnel, mais aussi la mise en place d'un système de management au sein de l'hôpital dans le but d'assurer l'amélioration continue de la qualité et la sécurité des soins délivrés au patient.

Les missions de l'ANAES ont été reprises par la Haute Autorité de Santé (HAS) suite à sa création en 2004. A partir de là, le terme « accréditation » est remplacé par « certification ». La certification fournit la preuve de l'existence d'un système qualité, contrairement à l'accréditation qui est une procédure qui reconnaît les compétences techniques d'un organisme. Cette certification des établissements passe par une autoévaluation basée sur les référentiels de la HAS, suivie d'une visite par les professionnels de la HAS évaluant l'ensemble du fonctionnement et des pratiques allant du début de la prise en charge du patient jusqu'à sa sortie de l'établissement ainsi que les pratiques médico-techniques. Suite à cette visite, un rapport est fourni à l'organisme évalué (27).

#### **e) Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale (GBEA)**

C'est le 4 décembre 1994 qu'apparaît au Journal officiel de la République française le premier référentiel opposable pour tous les LBM. Ce référentiel connu sous son acronyme « GBEA » (28), a pour objectif d'instaurer et de formaliser l'assurance qualité au sein des LBM.

Ce guide décrit les conditions d'exécution des analyses et propose, sans en imposer, des moyens pour aboutir à un système de qualité satisfaisant et garantir un résultat fiable au patient. Il couvre toutes les étapes de l'analyse d'un échantillon, de son prélèvement à la remise du résultat. L'application de ce référentiel va permettre de mettre en place un système documentaire avec la rédaction de procédures, et de modes opératoires. Toutefois ce guide adopte une démarche statique avec une absence de vision dans le temps et est très axé analytique. Le système d'assurance qualité se résume à la rédaction de procédures sans prendre en compte la partie management essentielle au bon fonctionnement d'un système de qualité, et qui sera introduite dans la norme NF EN ISO 15189. Toutefois, un laboratoire a la possibilité de mettre en place ce dernier point, par une démarche volontaire d'accréditation par le COFRAC.

Les arrêtés du 26 novembre 1999 (29) et du 26 avril 2002 (30) viennent apporter quelques modifications à la version de 1994. Ces modifications portent principalement sur la métrologie, l'informatique, le transport des échantillons, la biologie moléculaire et l'immunohématologie. Le GBEA est composé de 6 chapitres abordant les règles de fonctionnement du laboratoire dont le système d'assurance qualité, les obligations de la direction, la sécurité du personnel, les installations, les équipements, l'entretien des locaux, le matériel et réactifs, l'informatique, mais aussi les règles générales d'exécution des analyses au travers de la rédaction de procédures concernant le prélèvement, la validation, la transmission et l'archivage des résultats, la conservation des échantillons après analyse (31).

Le GBEA centré sur l'acte de biologie médicale, oblige le biologiste à se concentrer davantage sur les phases préanalytique et postanalytique renforçant ainsi sa responsabilité sur l'ensemble de la réalisation d'un examen de biologie médicale. Il fait l'objet d'inspections menées par les Directions Régionales des Affaires Sanitaires et Sociales (DRASS) regroupées depuis 2010 au sein des Directions Régionales de la Jeunesse, des Sports et de la Cohésion Sociale (DRJSCS).

#### **f) Années 2000 : état des lieux de la qualité dans les Laboratoires de Biologie Médicale et projet de réforme**

L'Inspection Générale des Affaires Sociales (IGAS) publie en avril 2006 son rapport sur l'état des lieux de la biologie médicale 30 ans après la première loi du 11 juillet 1975 réformant cette discipline. Le constat général de l'IGAS est le suivant « il y a nécessité de réformer la biologie médicale en constatant que, malgré un niveau global satisfaisant de qualité des examens, il reste des insuffisances non compatibles avec les besoins en matière de santé publique ».

A cette époque, les LBM privés sont 3900 environ. La majorité des LBM sont des structures de petite taille et polyvalentes collaborant avec les 1300 laboratoires hospitaliers dont seulement 2 % d'entre eux sont alors accrédités selon la norme NF EN ISO 17025 ou NF EN ISO 15189.

L'IGAS met en avant les lacunes en matière de qualité au sein des LBM. En effet le processus d'un examen de biologie médicale est composé de 3 phases sous le contrôle et la responsabilité du biologiste : préanalytique, analytique et postanalytique. Certains aspects dans le processus présentent des défauts, que ce soit dans la phase préanalytique, notamment lors du prélèvement et du transport de l'échantillon qui concentrent d'ailleurs la majorité des erreurs, mais aussi lors des phases analytique et postanalytique avec un manque d'harmonisation des pratiques entre LBM, voire même au sein d'un même LBM. D'autre part, il y a un défaut de formation continue bien qu'elle soit rendue obligatoire depuis 2002 pour les biologistes, pharmaciens ou médecins. La participation aux CNQ n'est pas effectuée par tous les laboratoires malgré son caractère obligatoire depuis 1975, et pour ceux qui y participent, il y a un manque de rigueur quant aux conditions de réalisation des analyses sur les échantillons de CNQ, et quant aux actions entreprises en cas de non-conformité du résultat obtenu.

Enfin, un autre point qui émane du rapport de l'IGAS, est l'inégalité du service rendu à la personne. Cela concerne notamment le délai de rendu des résultats qui diffère d'un LBM à l'autre pour une même analyse. En outre, la présence systématique d'un biologiste sur site n'est pas respectée dans tous les LBM aux heures ouvrables (ou lors de la permanence des soins). Enfin, il existe des disparités importantes dans la répartition des LBM sur le territoire en lien avec l'absence de contrainte géographique dans la création d'un LBM pour les biologistes.

En résumé, sur les 3900 LBM qui existent alors en France, environ 2000 ont une réelle implication en matière de qualité, mais 200 à 500 laboratoires ont un fonctionnement à risque. Toutefois, ces structures continuent à exercer leur activité sans sanction et/ou exigence d'amélioration, tout particulièrement du fait du nombre d'inspections très faible dans les LBM. Les autres LBM sont de petites structures fonctionnant avec un seul biologiste, qui ne sont pas en mesure de remplir les conditions exigées en termes de qualité (32).

Devant ces constats, l'IGAS conclut que la loi du 11 juillet 1975 n'est désormais plus adaptée à la situation actuelle du fait de l'augmentation des connaissances médicales, des progrès considérables des techniques biologiques, de l'évolution des principes d'assurance qualité et de l'instauration d'une législation à l'échelle européenne.

Lors d'un état des lieux de la biologie médicale qui s'en suit, le ministère de la Santé confie à Michel Ballereau, conseiller général des établissements de santé, la mission de rédiger un rapport permettant de proposer un cadre général à l'exercice de la biologie médicale en France afin que chacun puisse disposer d'une biologie médicale de qualité, et de lever les disparités territoriales (33). Ainsi, le rapport proposé par M. Ballereau reprend les conclusions déjà énoncées par l'IGAS en matière de qualité, et met également en avant la taille trop réduite des locaux dans certains laboratoires, et leur faible activité, inadaptées aux évolutions scientifiques et technologiques. Ce rapport insiste par ailleurs sur la notion de prestation de conseils exercée par le biologiste auprès des cliniciens, ce qui le positionne ainsi comme un acteur de santé majeur, impliqué dans la prise en charge des patients.

Dans ce rapport, il est également constaté que la répartition des effectifs de biologistes et des LBM sur le territoire français n'est pas homogène. Afin d'y remédier et assurer une proximité géographique suffisante pour les patients résidant dans les régions désertées, il prévoit d'imposer aux laboratoires de respecter certaines limites géographiques.

Au total, le rapport Ballereau propose une évolution fondamentale pour les LBM qui auront désormais le devoir de résultats envers le patient et non plus seulement une obligation de moyens comme c'était le cas jusqu'alors, ce qui impliquera pour chaque LBM d'obtenir impérativement l'accréditation.

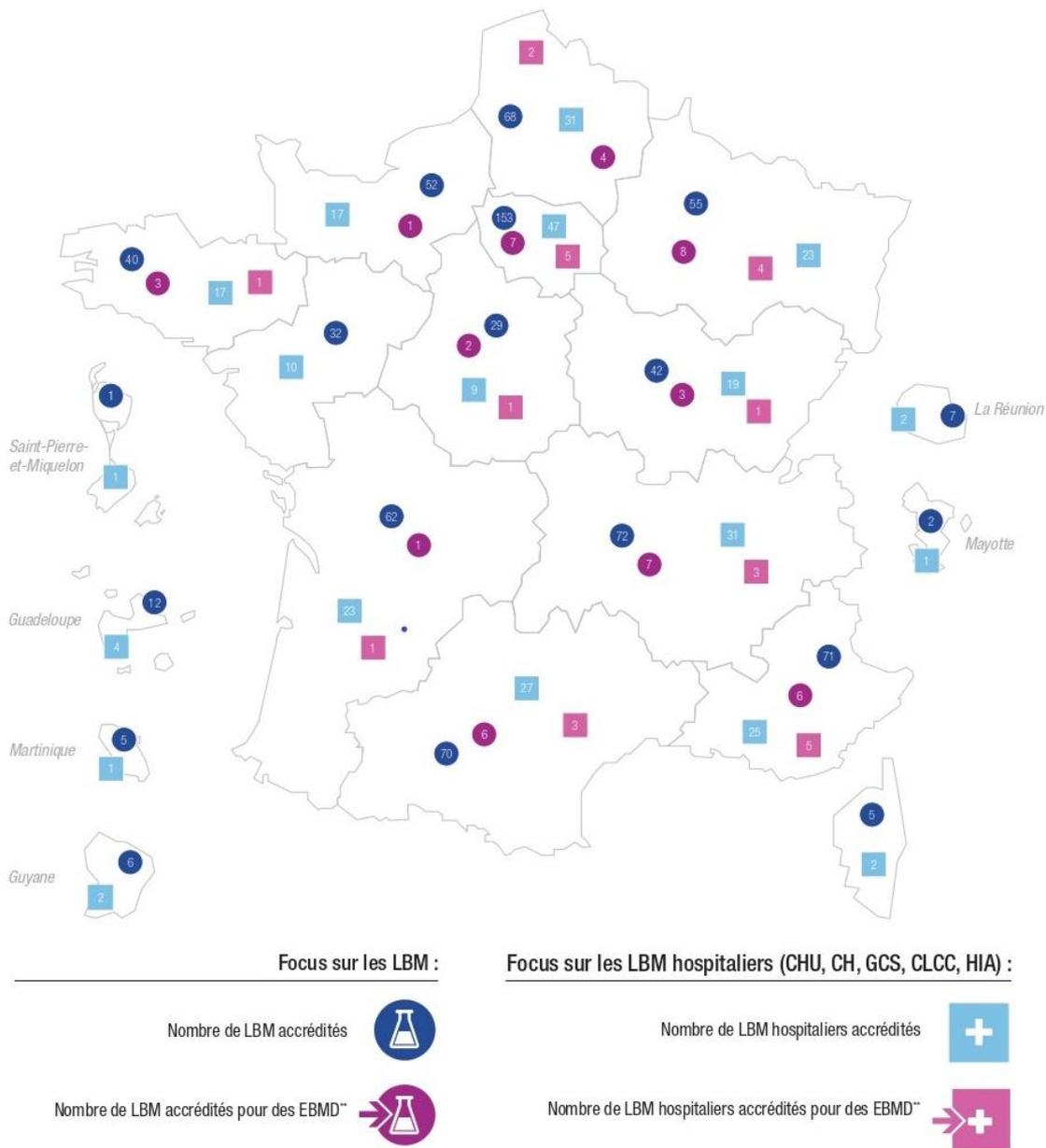
#### g) Réforme de la biologie médicale de 2010

L'ordonnance d'application n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale (34) qui suit les préconisations du rapport Ballereau a pour objectif de mettre en place une biologie pleinement médicale qui s'attache à la pertinence des examens biologiques pratiqués, à la fiabilité de l'ensemble des phases de ces examens (préanalytique, analytique, et postanalytique) et à l'efficacité de la discipline (35). Les points clés de cette ordonnance sont :

- **Le renforcement de la médicalisation de la discipline** par 1) une redéfinition des missions du biologiste médical en mettant l'accent sur son rôle dans la prestation de conseils, plaçant ainsi cette discipline en tant que profession de santé médicale à part entière, et 2) une révision de la définition de l'examen médical composé de 3 phases : préanalytique, analytique et postanalytique.
- **La qualité prouvée par l'accréditation et le contrôle qualité** qui deviennent obligatoire pour les LBM sur l'ensemble de l'activité qu'ils réalisent avec comme référentiel, la norme en vigueur NF EN ISO 15189 ou la norme dérivée pour les Examens de Biologie Médicale Délocalisée (EBMD) NF EN ISO 22870.
- **La pluralité de l'offre de la biologie médicale** qui conduit au regroupement des LBM et à la création de laboratoires multisites. Pour assurer la continuité des soins, cette ordonnance rend obligatoire la présence d'au moins un biologiste par site aux heures ouvrables du laboratoire.

Cette ordonnance d'application de 2010 est ratifiée en mai 2013 par une loi qui apporte en outre des précisions sur le calendrier de la démarche d'accréditation. Ainsi, l'accréditation devra porter sur 50 % des examens pratiqués dans un LBM au 1<sup>er</sup> novembre 2016, puis 70 % et enfin 100 % au 1<sup>er</sup> novembre 2018 et au 1<sup>er</sup> novembre 2020, respectivement (36).

Au 1<sup>er</sup> juin 2019, 784 laboratoires étaient engagés dans le processus d'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 et/ou NF EN ISO 22870, parmi lesquels 292 LBM hospitaliers (37) (**Figure 4**).



**Figure 4** Répartition régionale des LBM engagés dans le processus d'accréditation au 1<sup>er</sup> juin 2019 (37)

## 1.2.2. Accréditation des Laboratoires de Biologie Médicale

### a) Définition de l'accréditation

L'accréditation est définie comme une reconnaissance, par un organisme indépendant faisant autorité, de la compétence d'un organisme à réaliser des activités spécifiées d'évaluation de la conformité (38).

Un organisme est accrédité par rapport à un référentiel où les laboratoires pourront trouver les conditions à remplir en fonction de leurs domaines de compétences : NF EN ISO 15189 pour les LBM et les laboratoires d'anatomopathologie, NF EN ISO/CEI 17025 pour les laboratoires d'essai et d'échantillonnage, et NF EN ISO 22870 pour les EBMD. Un organisme est également accrédité par une instance qui procède à un audit, et pour une activité définie constituant le domaine de compétence. Un examen est accrédité si les 3 phases qui le constituent le sont : phase préanalytique, analytique et postanalytique. Le SMQ, et les processus supports devront également faire l'objet d'une accréditation (39,40). Le but étant de garantir au patient et aux prescripteurs la fiabilité des résultats rendus.

### b) Organisme accréditeur

En France, le seul organisme pouvant délivrer une accréditation au LBM est le COFRAC. Le COFRAC est une association à but non lucratif créée en 1994, qui assure la représentation des intérêts français dans les instances et organismes européens et internationaux traitant de l'accréditation. Son rôle au niveau de la biologie médicale est d'attester la compétence des laboratoires avec une reconnaissance internationale. L'équipe est composée de plus de 300 Évaluateurs Qualiticiens (EQ) et 1300 Évaluateurs Techniques (ET).

Le COFRAC chargé d'évaluer les compétences techniques et organisationnelles (41) comporte 4 sections : Laboratoires ; Certifications ; Inspection ; et Santé Humaine (SH). Cette dernière a été créée le 1<sup>er</sup> octobre 2009, afin d'être en mesure d'accompagner la réforme de la biologie médicale rendant obligatoire l'accréditation (41,42).

Le COFRAC, met à disposition sur son site internet (43), les documents de RÉFérence (REF), d'INFormation (INF), des Guides Techniques d'Accréditation (GTA), ainsi que des FORMulaires (FORM) nécessaires à l'accréditation des laboratoires, mais aussi la liste des laboratoires accrédités, les bulletins d'actualités nationaux et internationaux en rapport avec l'accréditation, les communiqués de presse.

### c) Portée d'accréditation

Le référentiel opposable faisant référence à la portée d'accréditation est le SH REF 08 « Expression et évaluation des portées d'accréditation » (44), accompagné de son document informatif, le SH INF 50 « Portées-types d'accréditation » (40), résumant l'ensemble des portées-types dont le laboratoire doit prendre connaissance pour définir son type de portée lors de sa demande d'accréditation d'un examen.

Une portée est définie comme étant l'énoncé formel et précis des activités pour lesquelles le laboratoire est accrédité. Elle est constituée d'une liste de portées-types et de la liste d'examens en vigueur tenue à jour par le laboratoire qui reprend à minima les éléments définissant les lignes de portées d'accréditation selon le SH FORM 06. Les lignes de portées-types sont organisées en domaine/sous-domaine/famille/sous-famille, comme décrit dans le SH INF 50.

Une portée-type est définie comme étant un tout indissociable correspondant à un examen ou à un ensemble d'examens réalisé selon une compétence bien définie et individualisée s'appuyant notamment sur un principe technique général (44) (**Tableau 1**).

Lors de sa demande d'accréditation, le laboratoire doit définir si l'examen fait l'office d'une demande d'extension d'accréditation ou bien d'une flexibilité de portée appelée aussi « ajout ». La demande d'extension est faite lorsque le laboratoire souhaite accréditer un nouveau site, ouvrir une nouvelle ligne de portée ou famille au sein de la portée, même si elle est déjà accréditée sur un autre site, ou bien lors d'un changement de flexibilité (passage d'une portée A vers une portée B par exemple). La demande devra se faire auprès du COFRAC 6 mois avant l'évaluation suivante. A l'inverse, dans le second cas, la flexibilité est utilisée lors de modifications au sein d'une ligne de portée déjà évaluée ou d'ajout d'examens dès lors que cela n'implique pas de nouvelles compétences.

Il existe 2 types de portée flexible : le type A et le type B. Lorsque le laboratoire choisit la portée flexible de « type A » cela signifie qu'il souhaite avoir la possibilité, entre 2 visites d'évaluation du COFRAC, d'adopter sous accréditation des méthodes reconnues ainsi que leurs révisions successives en se reposant sur des compétences techniques qu'il a précédemment démontrées. Et lorsqu'il choisit une flexibilité de « type B » cela signifie qu'il souhaite avoir la possibilité, entre 2 visites d'évaluation du COFRAC, de mettre en œuvre sous accréditation, des méthodes qu'il a adaptées ou développées (44).

La limite de flexibilité d'une portée s'appuie sur la liste détaillée des examens propre à chaque laboratoire.

**DOMAINE BIOLOGIE MEDICALE – SOUS-DOMAINE : MICROBIOLOGIE – SOUS-FAMILLE : MICROBIOLOGIE GENERALE (MICROBIOBM)**

Pour l'ensemble des examens relevant des lignes identifiées par un #, l'accréditation est rendue obligatoire dans le cadre réglementaire français par l'article L.6221-1 du Code de la Santé Publique.

Code	Nature de l'échantillon biologique	Nature de l'examen/analyse	Principe de la méthode	Référence de la méthode	Remarques (Limitations, paramètres critiques, ...)
BM MG01	Liquides biologiques d'origine humaine	Recherche, identification et/ou détermination de la concentration d'anticorps et/ou d'antigènes spécifiques vis-à-vis d'agents infectieux  Avidité des anticorps  Type d'agents : bactéries, virus, parasites, champignons filamenteux, levures	- Immuno-enzymatique (ELISA et dérivées), - Immunoblotting, - Immunofluorescence, - Immunoprécipitation, - Néphélométrie - Agglutination - Fixation du complément -Immuno-Electrophorèse - Immunochromatographie	Méthodes reconnues (A) Méthodes reconnues, adaptées ou développées (B) (**)	#

Le code BM MG01 est utilisé pour désigner la ligne de portée-type numéro 1 de la sous-famille de la Microbiologie Générale (MG) intégrée au domaine de la Biologie Médicale (BM).

**Tableau 1** Exemple de la ligne de portée-type BM MG01 issu du SH INF 50 (40)

#### **d) Processus d'accréditation des Laboratoires de Biologie Médicale**

L'entrée dans le processus d'accréditation d'un laboratoire commence par la prise de connaissance de la norme (NF EN ISO 15189), de ses référentiels opposables, et des exigences du COFRAC relatives à la portée d'accréditation choisie et à ses activités.

Le laboratoire doit ensuite écrire une lettre d'intention au COFRAC, formaliser sa demande d'accréditation en utilisant les formulaires du COFRAC et en fournissant les différentes pièces requises. Il doit également préparer les dossiers techniques : les listes des portées et des analyses demandées à l'accréditation, les dossiers de validation/vérification de méthodes (SH FORM 43).

Le COFRAC procède à une étude de recevabilité de la demande et en cas d'avis favorable mandate une équipe d'évaluation composée d'un EQ chargé d'examiner les dispositions organisationnelles, et d'ET qui sont des biologistes en exercice formés, et évalués par le COFRAC. L'équipe mandatée élabore et transmet un plan prévisionnel d'évaluation aux audités et au COFRAC (38).

#### **e) Déroulement de l'audit**

L'évaluation commence toujours par une réunion d'ouverture où sont présents l'ensemble des auditeurs et audités. Elle permet de faire un rappel de l'objectif de l'évaluation, de définir le champ d'audit (portée et liste des examens soumis à l'accréditation).

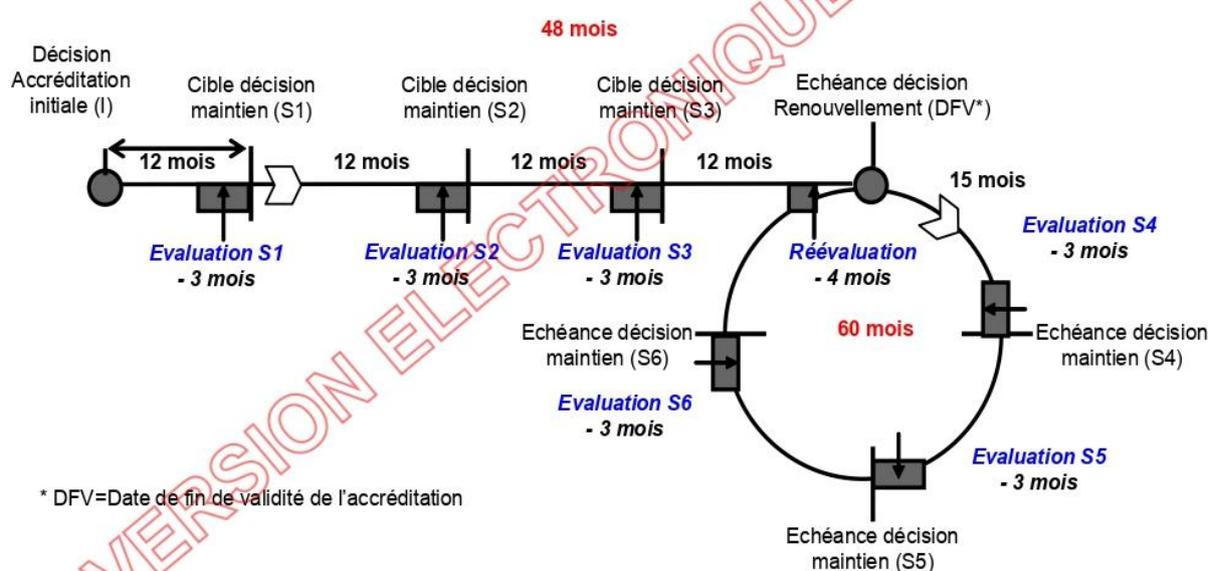
Lors de l'audit, les EQ et ET s'assurent que le laboratoire répond aux exigences de la norme NF EN ISO 15189, à ses référentiels opposables et aux dispositions du laboratoire.

Au terme de l'audit, lors d'une réunion de clôture, les évaluateurs présentent une synthèse des points faibles et des points forts, proposent des axes d'amélioration, et exposent les éventuels écarts. Un écart est défini comme étant la non satisfaction aux exigences de la norme, à ses référentiels, et aux dispositions du laboratoire. Il peut être qualifié de « non critique » (écart dont le résultat n'affecte pas ou n'est pas susceptible d'affecter directement et immédiatement la qualité des prestations d'évaluation de la conformité) ou de « critique » (écart dont le résultat met en cause la fiabilité des résultats ou l'aptitude du SMQ à maintenir le niveau de qualité des prestations d'évaluation de la conformité).

Dans le mois qui suit l'audit, le responsable de l'équipe d'évaluation transmet un rapport écrit à la Commission Technique d'Accréditation (CTA) du COFRAC qui, dans un délai de 3 mois, rend un avis au directeur général du COFRAC à qui revient la décision finale d'accréditer ou non le laboratoire dans le périmètre faisant l'objet de la demande.

Lorsque la décision est sous réserve, elle peut être levée par la production de preuves tangibles de résolution des écarts ou par la réalisation d'une évaluation complémentaire sur site. Le laboratoire a 15 jours pour établir un plan d'action, apprécié ensuite par les évaluateurs. Il dispose ensuite de 6 mois pour résoudre les écarts non critiques et de 3 mois pour les écarts critiques (38).

La durée de validité de l'accréditation obtenue est de 4 ans pendant le premier cycle d'évaluation avec une évaluation de surveillance tous les 12 mois, puis il y a un renouvellement de la validité pour 5 ans, avec une surveillance tous les 15 mois (**Figure 5**). Le laboratoire est soumis à l'obligation de signaler au COFRAC tout changement d'organisation ou de technique analytique entre 2 évaluations. Le COFRAC informe la HAS, l'ANSM et l'Agence Régionale de Santé (ARS) des décisions d'accréditation (obtention, retrait ou suspension) conformément à l'article L. 6222-6 du CSP.



**Figure 5** Cycle de vie d'une accréditation (38)

### 1.3. Norme NF EN ISO 15189 et application en sérologie infectieuse

#### 1.3.1. Norme NF EN ISO 15189

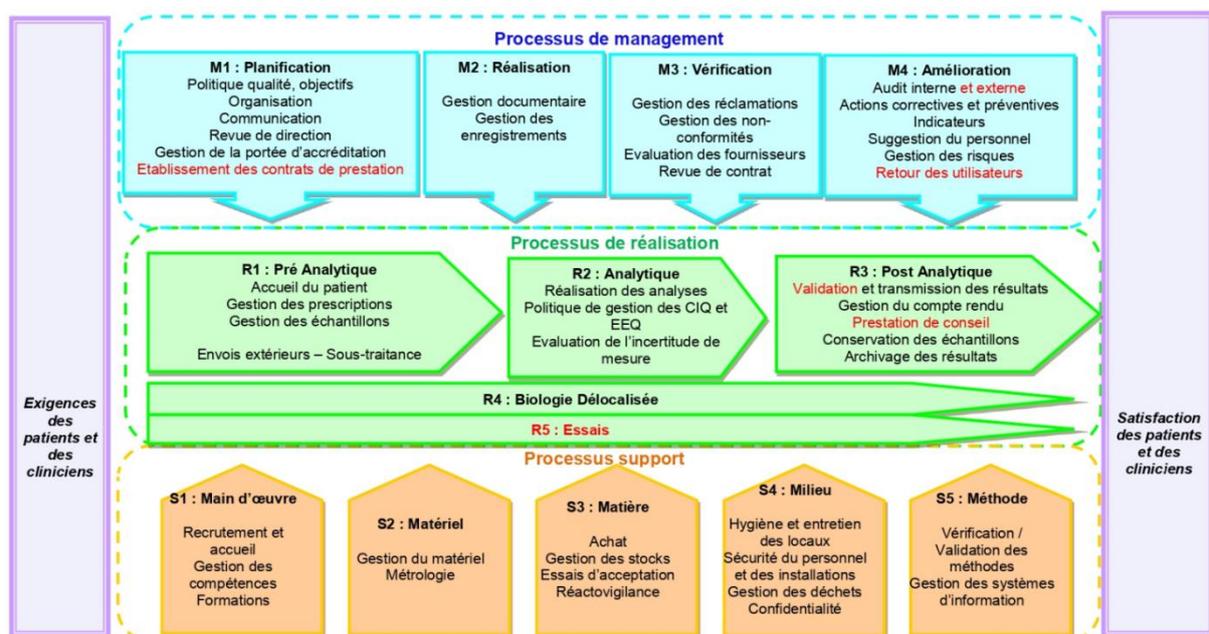
Une première version de la norme a été publiée en français en octobre 2003, puis a fait l'objet de 2 révisions dont la dernière en vigueur est celle de décembre 2012. Inspirée du GBEA et des normes ISO, elle a été adaptée aux LBM en particulier sur l'évaluation des exigences techniques qui était absente des normes ISO. En 2006, l'International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) a reconnu cette norme comme le « standard de référence », et depuis, elle est adoptée dans le monde entier comme seul référentiel pour l'accréditation des LBM (31,39).

La norme NF EN ISO 15189 comprend 2 axes majeurs : le management de la qualité et les exigences techniques.

La partie qui concerne le management insiste sur le rôle majeur de la direction du laboratoire afin d'assurer un SMQ efficace, dynamique et en constante amélioration. Elle implique d'établir une politique en matière de qualité, la rédaction d'un manuel qualité, la définition et la hiérarchisation des responsabilités, les moyens nécessaires, la traçabilité des enregistrements (39).

Le volet concernant les exigences techniques couvre la totalité du domaine de réalisation d'un examen : préanalytique, analytique et postanalytique. Il comprend notamment l'évaluation des compétences du personnel (habilitations, maintiens de compétences, plans de formations), mais aussi les exigences relatives aux Contrôles de Qualité Internes (CQI ou CIQ) et Externes (CQE), des points relatifs aux processus supports (locaux, environnement, matériels, réactifs, système informatique du laboratoire), et à la diffusion des résultats (39).

De manière plus générale, cette norme permet d'acquérir une vision globale du système et de ses interfaces avec la mise en place d'une approche processus définie comme étant un ensemble d'activités corrélées ou interactives qui transforment des éléments d'entrée en éléments de sortie. Le laboratoire doit donc posséder une cartographie des processus où y figure l'ensemble des processus supports, métiers (ou de réalisation), et de management (**Figure 6**). Ces processus doivent faire l'objet d'évaluations dans le temps, par le biais d'indicateurs qualité qui sont des outils utilisés pour mesurer l'aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques à satisfaire des exigences (31,39).



**Figure 6** Exemple de la cartographie des processus du PBH du CHU d'Angers

### 1.3.2. Application en sérologie infectieuse

En octobre 2017, un Groupe de Travail (GT) dédié à la microbiologie a été mis en place au sein du COFRAC. Ses missions principales sont de proposer des outils d'harmonisation des pratiques d'évaluation, des stratégies d'analyse des contrôles de qualité, tout en tenant compte de l'évolution des pratiques (45). Début 2019, ce GT propose donc une nouvelle version du SH INF 50 donnant lieu à la révision 06 applicable au 1<sup>er</sup> février 2019 (40).

Cette révision vise à simplifier les demandes d'accréditation, et à valoriser les compétences. Concrètement, la sous-famille de la Sérologie infectieuse a été regroupée au sein de la sous-famille de la Microbiologie générale afin de refléter plus fidèlement l'activité entreprise au sein d'un laboratoire de microbiologie (46). Ainsi, la famille Microbiologie est composée de 5 sous-familles dont 4 spécialisées : Bactériologie spécialisée, Parasitologie - Mycologie spécialisée, Virologie spécialisée, Agents Transmissibles Non Conventionnels (ATNC).

Le GT prévoit de proposer prochainement des outils pour l'aide à l'utilisation et l'interprétation de l'Incertitude de Mesure (IM) des résultats de sérologie, ainsi que des stratégies de passage des contrôles de qualité dans un processus complexe d'identification (46).

Les sérologies infectieuses peuvent être de nature qualitative ou quantitative, et l'identification de ce caractère est primordiale dans la démarche d'accréditation car elle conditionne les paramètres qui devront être évalués dans les dossiers de vérification/validation de méthodes soumis au COFRAC (**Tableau 2**). Les méthodes qualitatives fournissent des résultats issus de données non numériques. Les méthodes quantitatives fournissent des résultats issus de données numériques (47).

Les techniques sérologiques peuvent être manuelles, automatisées, ou semi-automatisées. Selon cette classification, les paramètres évalués dans le cadre de l'accréditation seront différents. Par exemple, pour une technique manuelle, il est important d'évaluer la variabilité interopérateurs.

La méthode peut être qualifiée de reconnue ou de non reconnue. Les méthodes considérées comme reconnues peuvent être des Dispositifs Médicaux de Diagnostic *In Vitro* (DM-DIV) marqués CE c'est-à-dire qui ont fait l'objet d'une certification par un organisme notifié après une évaluation du respect des exigences et des directives contenues dans un dossier technique de marquage CE établi par le fabricant, et permettant sa libre circulation dans l'Union européenne (48). Ce sont aussi des méthodes qui ont été publiées dans des documents de référence approuvés scientifiquement (articles, ouvrages, instructions d'organismes officiels tels que des CNR ou des sociétés savantes). Pour ce qui concerne les sérologies infectieuses et notamment pour la sérologie de la toxoplasmose, le RÉférentiel en MICrobiologie médicale (RÉMIC) (49,50), et le Guide des analyses et pratiques diagnostiques en Parasitologie et Mycologie médicales (51) constituent des documents de référence qui apportent des informations et des préconisations utiles à la constitution d'un dossier de vérification de méthode (52). Ainsi, en respectant strictement le domaine d'application de la méthode et en n'y apportant aucune modification, le laboratoire pourra présenter un dossier de vérification de méthode en portée A dans le cas d'une méthode reconnue. Par contre, si la méthode a été développée par le laboratoire, et n'est pas considérée comme reconnue, le laboratoire devra alors rédiger un dossier de validation de méthode en portée B (47).

CRITERES A EVALUER	Vérification (portée A)		Validation (portée B)	
	Méthode quantitative	Méthode qualitative	Méthode quantitative	Méthode qualitative
<b>Fidélité</b> (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Essai	Essai	Essai	Essai
<b>Justesse/exactitude</b> (approche)	Essai	Essai	Essai	Essai
<b>Incertitudes/facteurs de variabilité</b> et évaluation	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité
<b>Comparaison</b> avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire (appareil en miroir <sup>9</sup> , EBMD) et analyse des discordances <sup>10</sup>	Essai	Essai	Essai	Essai
Intervalle de mesure ( <b>Limite de quantification et limites de linéarité</b> )	Bibliographie	/	Essai	/
<b>Interférences</b> (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments, ...)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Contamination</b> entre échantillons (s'il y a lieu)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Robustesse</b>	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Stabilité réactifs</b> (après ouverture, embarqués)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Intervalle de référence</b> (valeurs usuelles)	Bibliographie (fournisseur ou autre, s'assurer de la cohérence avec l'état de l'art)	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Limite de détection</b>	/	Bibliographie	/	Essai
<b>Spécificité/sensibilité analytique</b>	/	Bibliographie	/	Essai
<b>Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude<sup>11</sup> de la méthode ou du système analytique.</b>				

<sup>9</sup> Appareils en miroir : privilégier les appareils utilisant des techniques de principes analytiques identiques sinon il est possible d'utiliser des codes examens différents pour le même paramètre ou d'utiliser un facteur de corrections (pour les techniques linéaires) **de manière transitoire**. Le laboratoire doit avoir une stratégie d'uniformisation des techniques pour un même paramètre.

<sup>10</sup> Pour les examens fournissant un résultat de type qualitatif, extrapolé à partir de la mesure d'une donnée quantifiable (absorbance par exemple), avec un effet de seuil (étude des faux positifs et des faux négatifs par exemple).

<sup>11</sup> En cas de dépassement des spécifications choisies *a priori* par le laboratoire, celui-ci justifie l'acceptation des écarts pour pouvoir conclure à l'aptitude de la méthode et l'enregistre.

**Tableau 2** Résumé des performances à évaluer lors d'une vérification/validation d'une méthode quantitative ou qualitative (47)

## 2. La toxoplasmose

### 2.1. Le parasite

*Toxoplasma gondii*, agent pathogène responsable de la toxoplasmose, est décrit pour la première fois en 1908 par Charles Nicolle et Louis Herbert Manceaux en Afrique du Nord chez un rongeur sauvage le *Ctenodactylus gondii*. Puis c'est en 1939 que Sabin définit l'espèce *T. gondii* (53), protozoaire intracellulaire obligatoire infectant les mammifères homéothermes et appartenant au *phylum* des *Apicomplexa*, au sous-groupe *Coccidia* et au genre *Toxoplasma* (54,55).

Le cycle parasitaire de ce parasite a été complètement élucidé à la fin des années 1960 avec la découverte du rôle central du chat en tant qu'hôte définitif hébergeant les formes sexuées du parasite et qui propage ensuite la forme infestante dans l'environnement *via* ses fèces (54). Les principales étapes historiques dans la connaissance de *T. gondii* ont été résumées dans le **tableau 3** (53,56).

<b>1908</b>	Première description du parasite chez <i>Ctenodactylus gondii</i> par Nicolle et Manceaux.
<b>1923</b>	Premier cas de Toxoplasmose Congénitale (TC) chez un nourrisson de 11 mois (hydrocéphalie, microphthalmie).
<b>1928</b>	Première description de la forme kystique chez l'hôte intermédiaire.
<b>1937</b>	Premier cas de toxoplasmose disséminée mortelle chez un adulte de 22 ans.
<b>1939</b>	Parasite reconnu comme responsable d'encéphalomyélite chez le nouveau-né. Description de la triade classique des symptômes lors de TC (rétinochoroïdite, hydrocéphalie, calcifications encéphaliques). Regroupement des différentes dénominations du parasite existant jusqu'alors en fonction de l'hôte sous une espèce commune nommée <i>T. gondii</i> par Sabin.
<b>1942</b>	Mise en évidence de la transmission materno-fœtale du parasite.
<b>1948</b>	Mise au point du Dye Test (DT) par Sabin et Feldman (technique de référence) dans le diagnostic sérologique de la maladie.
<b>1965</b>	Mise en évidence du mode de contamination par ingestion de kystes présents dans la viande insuffisamment cuite.
<b>1969-1970</b>	Mise en évidence des oocystes dans les fèces du chat et description du cycle sexué dans le tube digestif du chat.
<b>1969-1972</b>	Reconnaissance du rôle des félinés dans la propagation du parasite dans différentes zones géographiques.
<b>1981-1982</b>	Premier cas de toxoplasmose cérébrale chez un patient au stade du Syndrome d'Immuno Déficience Acquisée (SIDA).

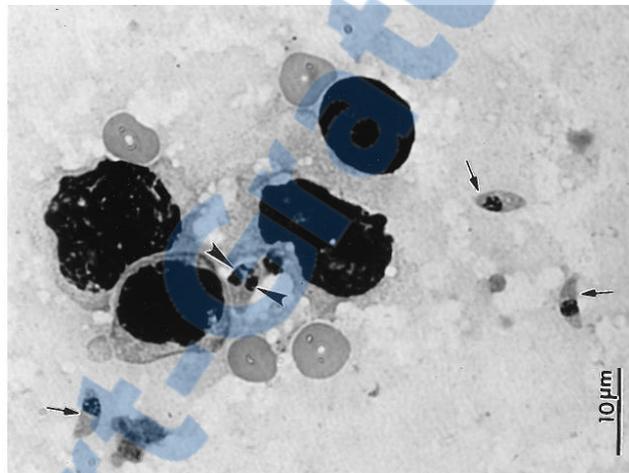
**Tableau 3** Historique des connaissances de *T. gondii* (53,56)

### 2.1.1. Structure du parasite

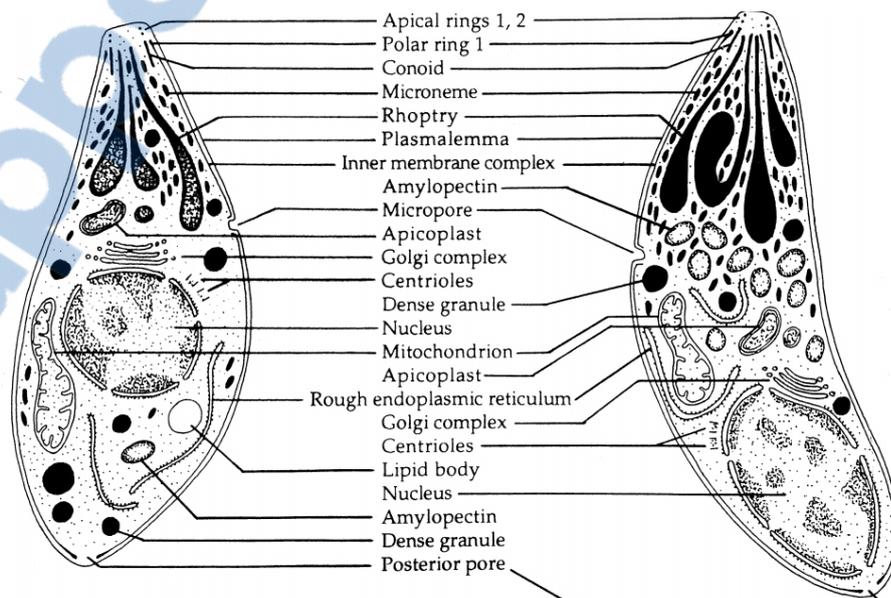
Au cours de son cycle, *T. gondii* se présente sous 3 stades : le tachyzoïte, le bradyzoïte, et l’oocyste (57).

#### a) Tachyzoïte

Le tachyzoïte est la forme de dissémination circulant dans le flux sanguin. C’est une forme à multiplication rapide (tachy du grec *takhos* signifiant rapide) capable d’envahir tous les types de cellules où il se multiplie au sein d’une vacuole parasitophore. A ce stade, il se présente sous forme de croissant d’environ 6 µm de long et 2 µm de large avec une extrémité apicale effilée et une extrémité postérieure arrondie (**Figure 7**). Le tachyzoïte est délimité par une membrane complexe étroitement liée à un cytosquelette impliqué dans l’intégrité structurelle et la motilité du parasite (54,57) (**Figure 8**).



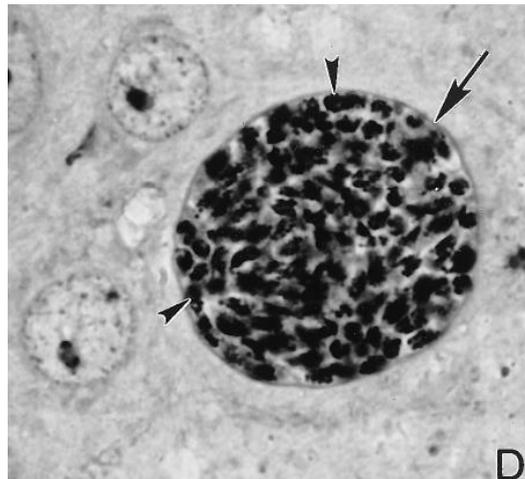
**Figure 7** Tachyzoïtes de *T. gondii* (flèches) (57)



**Figure 8** Structure interne d'un tachyzoïte (à gauche) et d'un bradyzoïte (à droite) de *T. gondii* (57)

## b) Bradyzoïte

Le bradyzoïte résulte de la transformation du tachyzoïte suite à la réponse immunitaire spécifique de l'hôte. C'est une forme à multiplication lente (brady du grec *bradýs* signifiant lent). L'accolement de plusieurs bradyzoïtes forme une structure intracellulaire appelé kyste tissulaire (**Figure 9**) plus ou moins sphérique dans les cellules du cerveau et allongé dans les cellules musculaires. Leur taille varie de 5 - 10  $\mu\text{m}$  à 100  $\mu\text{m}$  pour les kystes les plus âgés contenant alors plusieurs centaines de bradyzoïtes très compacts. La paroi du kyste se compose d'une membrane présentant de nombreuses invaginations. Le bradyzoïte (**Figure 8**) présente un métabolisme ralenti lui autorisant une survie à long terme dans les tissus de l'hôte.

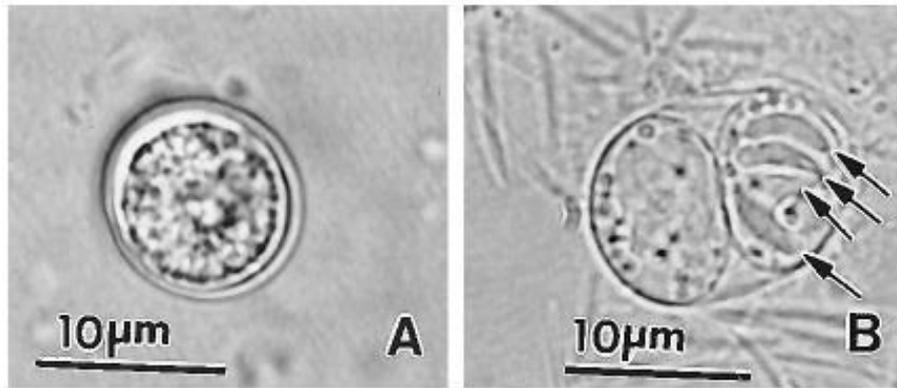


**Figure 9** Kyste intracellulaire de *T. gondii* composé de plusieurs bradyzoïtes (flèches)

(57)

## c) Oocyste

L'oocyste est une structure ovoïde issue d'une multiplication sexuée dans les cellules épithéliales intestinales du chat ou d'autres félidés. C'est une forme de résistance dans l'environnement et de contamination. Les oocystes sont émis non sporulés dans les fèces du chat et deviennent infestants en 1 à 5 jours après sporulation dans le milieu extérieur (53). A maturité, l'oocyste mesure entre 10 à 12  $\mu\text{m}$  de diamètre, et contient 2 sporocystes ellipsoïdaux de 6 à 8  $\mu\text{m}$ , contenant chacun 4 sporozoïtes. La paroi de l'oocyste se présente sous forme de multicouches extrêmement robustes protégeant le parasite des agressions mécaniques et chimiques, lui permettant ainsi une survie pendant plusieurs années dans un environnement humide (54,57) (**Figure 10**).



**Figure 10** Oocyste non sporulé (A) et oocyste sporulé (B) composé de 2 sporocystes contenant 4 sporozoïtes (flèches) de *T. gondii* (57)

### 2.1.2. Cycle parasitaire

Le cycle parasitaire de *T. gondii* est composé d'une phase sexuée chez les félinés dont le chat, et d'une phase asexuée chez des animaux homéothermes mammifères (dont l'homme), et les oiseaux (53) (**Figure 11**).

#### a) Cycle sexué chez l'hôte définitif

L'hôte définitif se contamine en chassant les hôtes intermédiaires (oiseaux, rongeurs) hébergeant des kystes tissulaires, ou par l'ingestion d'oocystes sporulés présents dans l'environnement retrouvés sur les végétaux, dans l'eau, ou la terre. Les kystes (ou les oocystes) libèrent des bradyzoïtes (ou des sporozoïtes) sous l'effet de l'acidité gastrique puis vont aller envahir les entérocytes de l'intestin de l'hôte définitif afin d'entamer leur multiplication asexuée appelée schizogonie. Ce cycle permet la formation de gamétocytes (forme sexuée) mâle et femelle qui après une phase de fécondation aboutit à la formation d'un oocyste non sporulé qui deviendra infectant au bout d'1 à 5 jours dans le milieu extérieur (53,54).

#### b) Cycle asexué chez les hôtes intermédiaires

Les hôtes intermédiaires se contaminent en consommant de la viande peu cuite contaminée par les kystes tissulaires de *T. gondii*, ou par l'ingestion d'oocystes présents dans l'eau ou sur les végétaux souillés par les fèces de l'hôte définitif. Sous l'effet de l'acidité gastrique, la paroi du kyste ou de l'oocyste se rompt, libérant des bradyzoïtes ou des sporozoïtes. Ces éléments parasites pénètrent dans les cellules épithéliales de l'intestin où ils se transforment en tachyzoïtes qui vont ensuite passer dans le sang pour rapidement disséminer dans tous les organes (53). Après cette phase parasitémique brève, les tachyzoïtes qui ont échappé aux défenses immunitaires de l'hôte, vont aller s'enkyster dans les tissus à l'abri du système immunitaire, principalement au niveau du cerveau et des muscles (54). Dans ces tissus, le parasite pénètre dans la cellule de l'hôte et s'entoure d'une vacuole parasitophore lui permettant d'entreprendre sa phase de multiplication asexuée par endodyogonie. Cette phase aboutit à la lyse de la cellule hôte (54,57).

Les kystes ainsi formés peuvent rester quiescents tout au long de la vie de l'hôte intermédiaire, toutefois ils peuvent se réactiver en cas de diminution des défenses immunitaires de l'hôte.

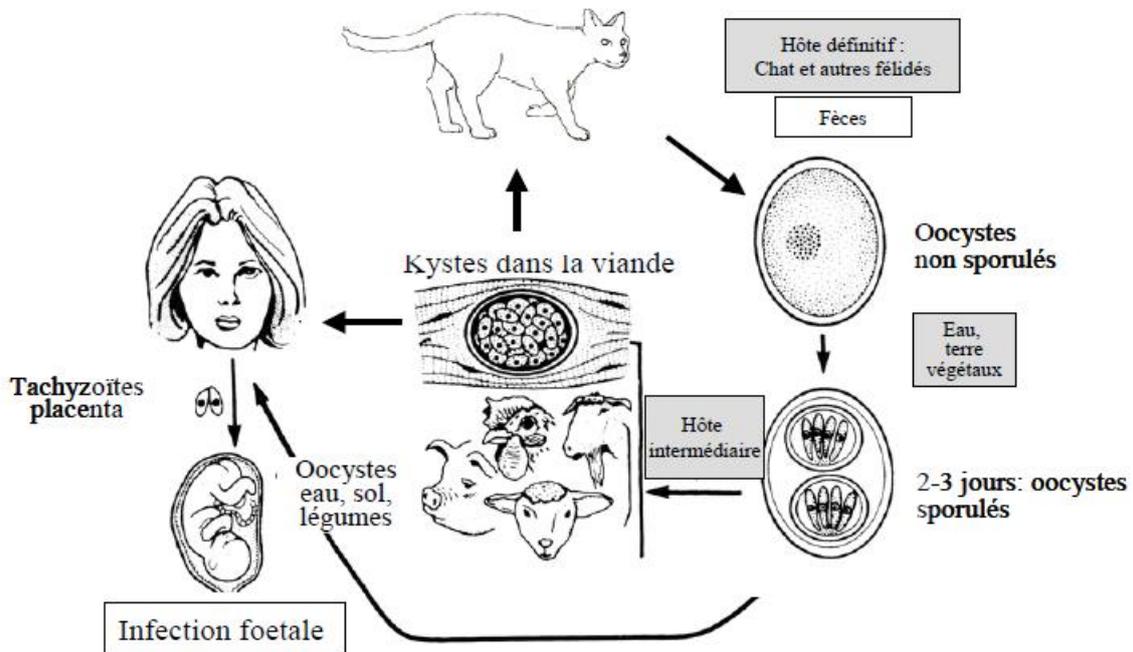
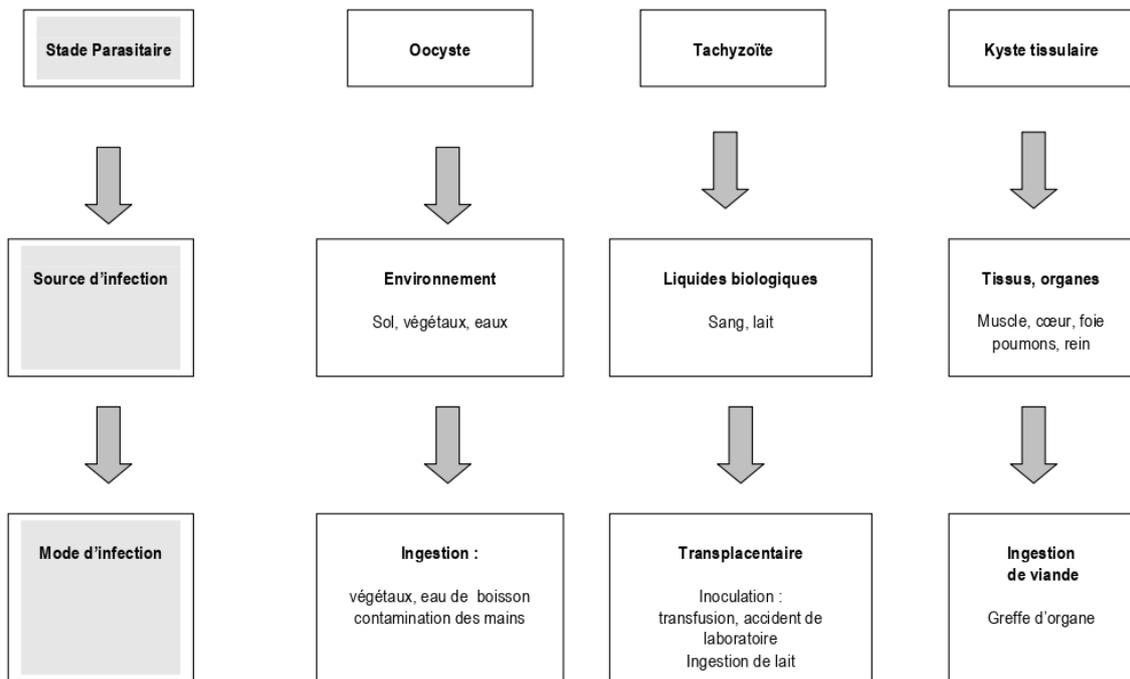


Figure 11 Cycle parasitaire de *T. gondii* (59)

## 2.2. Épidémiologie

### 2.2.1. Mode de contamination

La contamination de l'homme peut s'effectuer avec les 3 stades parasitaires de *T. gondii* : l'oocyste, le kyste, et le tachyzoïte (58). Ces différents modes de contamination sont résumés dans la **figure 12** (59).



**Figure 12** Sources et modes de contamination à *T. gondii* (59)

### a) Transmission par l'ingestion d'oocystes

La persistance de l'oocyste dans l'environnement nécessite des conditions de température et d'hygrométrie adaptées. L'oocyste persistera dans un environnement chaud et humide, et sera donc le mode principal de contamination dans les pays tropicaux comme l'Amérique du Sud et l'Afrique (54).

Les oocystes sont détruits après une congélation à  $-21\text{ °C}$  pendant 28 jours et sont résistants pour des températures comprises entre  $4$  et  $37\text{ °C}$ . Ils peuvent survivre jusqu'à 2 ans dans le sol (60).

La contamination par les oocystes, par consommation de végétaux crus et mal lavés ou par ingestion d'eau de boisson contaminée, est le plus souvent observée au cours de repas hors du domicile (53). Le lavage de la litière du chat ou le jardinage sont aussi des facteurs de risques en cas de mauvaise hygiène des mains (61).

### b) Transmission par l'ingestion de kystes

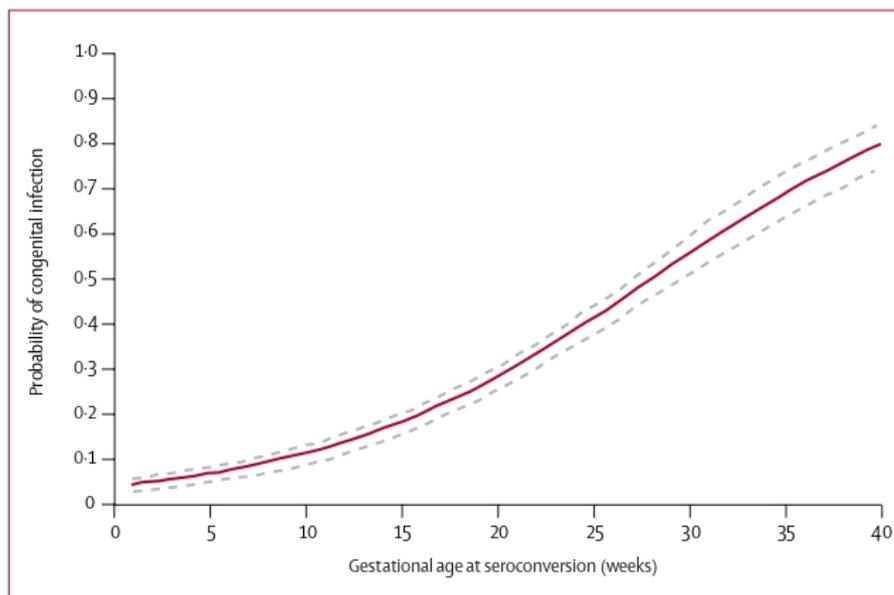
La contamination par les kystes se fait par la consommation de viande fumée, saumurée ou insuffisamment cuite contenant des kystes (53,54). Les viandes les plus à risque sont les viandes crues ou insuffisamment cuites de bœuf et de mouton, du fait de la forte prévalence de *T. gondii* chez ces espèces (61,62).

Les kystes sont détruits pour des températures supérieures à  $65-67\text{ °C}$ , et par une congélation à  $-20\text{ °C}$ . Ils restent infestants lorsque l'aliment est conservé à  $4\text{ °C}$  (53,54), et la cuisson au four micro-ondes est insuffisante pour les détruire du fait d'une répartition inégale de la cuisson au sein de la viande (63,64).

Les kystes peuvent également être transmis par le biais d'une transplantation d'organe solide, notamment lorsqu'un receveur non immunisé (R-) vis-à-vis de *T. gondii* reçoit un organe d'un donneur immunisé (D+). Lors de la phase d'immunosuppression engendrée par la chimiothérapie antirejet, les kystes peuvent se rompre et libérer les bradyzoïtes qui, transformés en tachyzoïtes, entraînent une dissémination du parasite et une infection évolutive. Les risques varient selon le type de greffon, et les transplantations cardiaque et cœur/poumon sont les plus à risque (65-67).

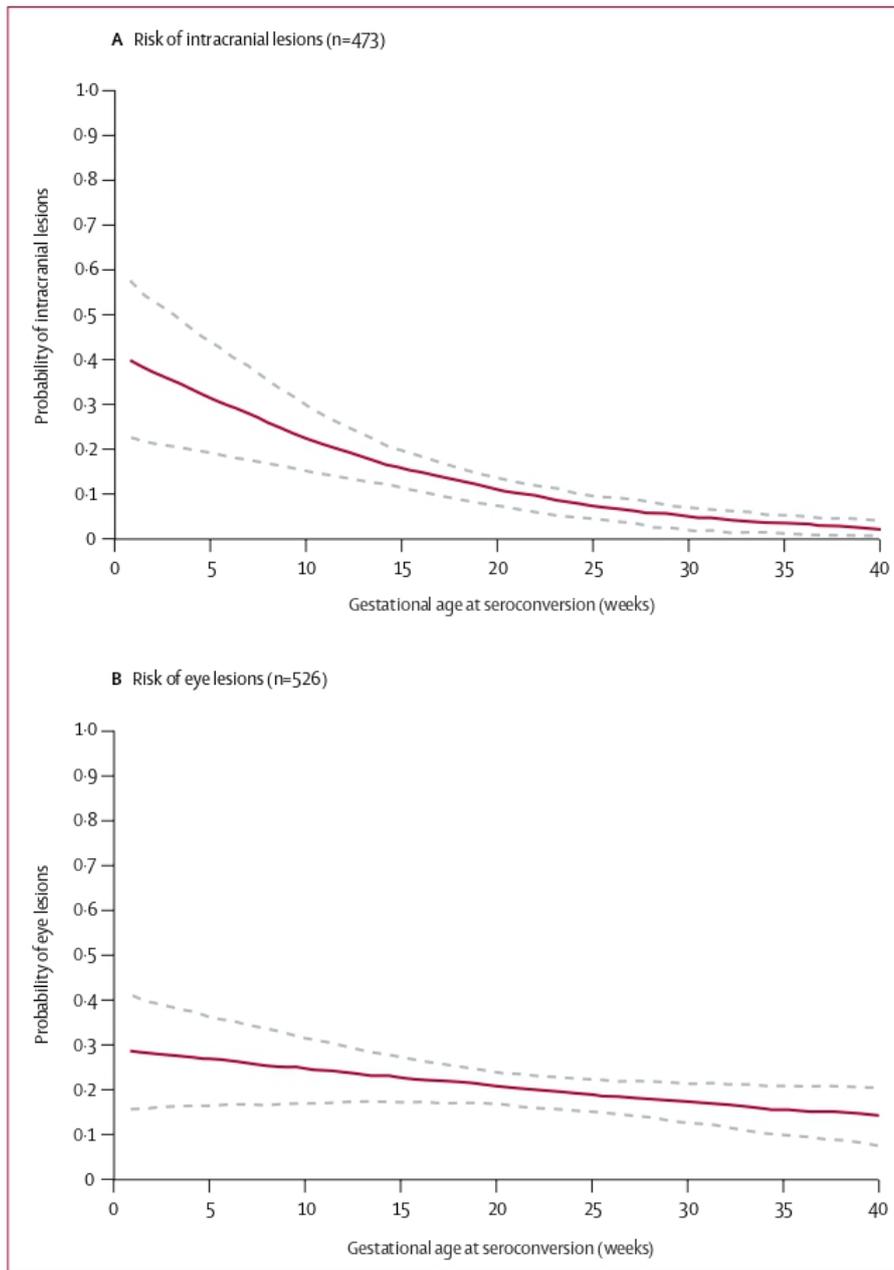
### c) Transmission par le biais des tachyzoïtes

Le tachyzoïte est la forme responsable de la toxoplasmose congénitale (TC) chez le nouveau-né après un passage transplacentaire. Lors de la phase parasitémique qui accompagne la primo-infection toxoplasmique chez la mère, les tachyzoïtes peuvent infecter le tissu placentaire puis infecter ensuite le fœtus (68). Le risque de transmission verticale au cours de la grossesse est de l'ordre de 29 %, mais s'avère variable selon l'âge gestationnel au moment de la contamination de la mère. En effet, ce risque croît régulièrement avec l'âge gestationnel, estimé selon les études entre 6 % (69) et 15 % (70) au cours du premier trimestre, puis en moyenne sur l'ensemble du trimestre concerné, à 40 % au second trimestre, pour atteindre 70 % au troisième trimestre (69,70). Toutefois le risque de survenue de séquelles graves pour le fœtus est inversement proportionnel à l'âge gestationnel (69,70) (**Figure 13 et 14**).



En ordonnées figure la probabilité d'infection congénitale. En abscisses figure l'âge gestationnel exprimé en semaine. Les traits discontinus représentent l'intervalle de confiance à 95 % pour  $n = 1721$  mères infectées.

**Figure 13** Risque de transmission materno-fœtale de *T. gondii* en fonction de l'âge gestationnel lors de la séroconversion maternelle (70)



En ordonnées figure la probabilité de survenue de lésions intracrâniennes (A) et oculaires (B). En abscisses figure l'âge gestationnel exprimé en semaine. Les traits discontinus représentent l'intervalle de confiance à 95 % pour  $n = 473$  enfants (A) et  $n = 526$  enfants (B).

**Figure 14** Risque de survenue des manifestations cliniques chez un enfant infecté par *T. gondii* en fonction de l'âge gestationnel lors de la séroconversion maternelle (70)

Enfin, de façon exceptionnelle, les tachyzoïtes peuvent être transmis à un individu non immunisé lors d'un don de sang ou de tissus provenant d'un donneur en phase de parasitémie, ayant débuté une infection toxoplasmique quelques jours avant la collecte du sang et/ou des tissus (66).

## 2.2.2. Fréquence

### a) Séroprévalence de la toxoplasmose

La toxoplasmose est une parasitose cosmopolite présente dans le monde entier avec une séroprévalence pouvant varier de 7 à 80 % entre les pays. Une prévalence inférieure à 30 % s'observe principalement en Amérique du Nord, en Grande Bretagne, en Scandinavie ou encore en Asie du Sud-Est. Par ailleurs, une prévalence supérieure à 60 % est observée en Afrique tropicale et en Amérique latine (54,59).

En France, la séroprévalence varie en fonction des régions en lien avec des différences climatiques, d'habitudes alimentaires, ou de mode de vie. Les plus fortes prévalences sont observées dans le quart nord-ouest et le sud de la France (71,72). Depuis une cinquantaine d'années, la séroprévalence tend à diminuer dans la population française. Elle était ainsi estimée à 80 % en 1960 et n'était plus qu'à 31,3 % en 2016 (**Tableau 4**).

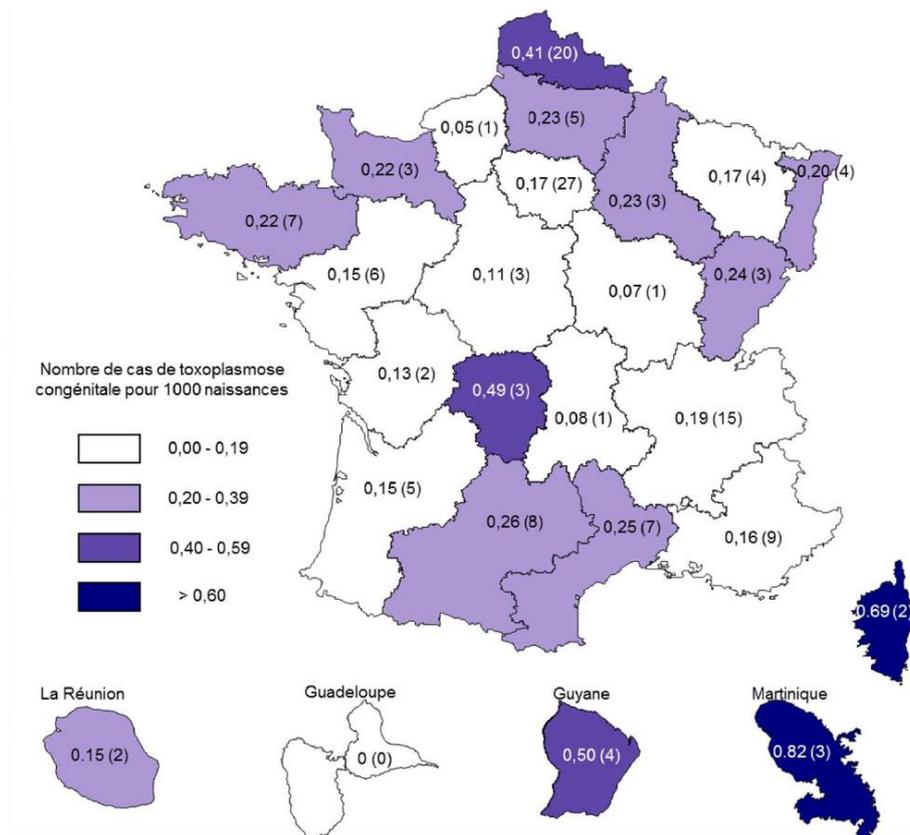
Années	Séroprévalences
1960	80 %
1980	63,3 %
1995	54,3 %
2003	43,8 %
2010	36,7 %
2016	31,3 %

**Tableau 4** Évolution de la séroprévalence toxoplasmique en France de 1960 à 2016 (73,74)

### b) Fréquence de la toxoplasmose congénitale

En 2007, sous l'égide du CNR de la toxoplasmose, nouvellement créé, un dispositif de surveillance nationale de la TC dénommé TOXOSURV a été mis en place. Depuis cette date, les cas de TC sont notifiés sur internet à l'aide de fiches anténatales et/ou postnatales par un réseau de laboratoires participant à ce dispositif. Ce dispositif a permis de mieux évaluer l'incidence de la TC en France (**Figure 15**), et de déterminer la sévérité de la maladie (75).

Ainsi, depuis 2007, les données épidémiologiques recensées par TOXOSURV montrent une prévalence de la TC qui varie selon les années de 0,20 à 0,31 cas pour 1000 naissances. Les derniers chiffres publiés pour l'année 2017, rapportent une prévalence de 0,20 cas pour 1000 naissances (76). Ces cas surviennent plus fréquemment chez les mères de moins de 20 ans, et font suite à des infections maternelles survenues le plus souvent en fin de grossesse (76).



**Figure 15** Distribution régionale en France du nombre de TC pour 1000 naissances en 2017 (76)

### 2.2.3. Prévention primaire – Règles hygiéno-diététiques

La prévention primaire vise à diminuer le risque d'infection par *T. gondii* par des mesures hygiéno-diététiques et comportementales (59).

Les premières recommandations publiées en 1996 (77) ont été reprises et complétées récemment par la HAS (78,79). Elles précisent les mesures préventives afin d'éviter la contamination par les kystes et par les oocystes :

#### **Pour éviter l'infection par les kystes (78)**

- ne pas consommer de viande mal cuite, en particulier du porc, du mouton et de l'agneau ;
- la viande doit être cuite au cœur du morceau à 67 °C ou avoir été congelée trois jours à -12 °C ;
- la salaison et le fumage ne détruisent pas les parasites ;
- se laver les mains après avoir manipulé de la viande crue ;
- nettoyer les surfaces et les ustensiles ayant été en contact avec de la viande crue (prévention des contaminations croisées).

### **Pour éviter l'infection par les oocystes (78)**

- une femme enceinte non immunisée peut garder son chat, dans la mesure où ce dernier ne rentre pas dans la cuisine, et où sa litière est changée par une autre personne, ou par elle-même, à condition de porter des gants et de se laver les mains ensuite. En outre, il est préconisé de réduire le risque d'exposition des chats domestiques en les gardant à l'intérieur, et en ne leur donnant que des aliments cuits, en conserve ou secs ;
- porter des gants au moment de manipuler des substances (sable, terre, éléments de jardinage) pouvant avoir été contaminées par des selles de chat et bien se laver les mains et les ongles par la suite ;
- bien se laver les mains et bien laver les ustensiles à la suite de la manipulation d'aliments souillés par de la terre ;
- bien peler ou laver les fruits et légumes consommés crus ;
- ne pas consommer d'œufs crus ou de lait cru ;
- consommer de l'eau commercialisée ;
- éviter les fruits de mer.

#### **2.2.4. Génotypes**

La création du CNR de la toxoplasmose en 2007 avec la mise en place d'un pôle Souches a permis de faire progresser les connaissances sur ce thème (80).

Par des techniques de biologie moléculaire comme la Polymerase Chain Reaction (PCR) multiplex, différents génotypes ont été identifiés chez *T. gondii* dont 3 génotypes principaux (80). En Europe, le génotype II est le plus fréquemment isolé, et représente le génotype le moins virulent. Il est isolé dans plus de 90 % des cas de toxoplasmose en France (54). A l'inverse, le génotype I est le plus virulent mais exceptionnellement isolé en Europe, tout comme le génotype III dont la virulence est intermédiaire entre le génotype II et I.

Dans les autres pays comme l'Amérique du Sud, ou bien l'Afrique, les génotypes observés sont beaucoup plus diversifiés. Les génotypes majoritairement isolés en Europe sont rarement retrouvés sur ces continents et laissent place à des génotypes atypiques. Ces génotypes atypiques sont souvent plus virulents, responsables de rétinochoroïdites sévères chez l'immunocompétent, ou de cas de TC graves (81,82).

### **2.3. Aspects cliniques**

La toxoplasmose est une infection habituellement bénigne chez l'immunocompétent mais qui peut être grave chez le fœtus, en cas de transmission materno-fœtale du parasite, ou chez le patient immunodéprimé (83).

### 2.3.1. Toxoplasmose chez le patient immunocompétent

L'expression de la toxoplasmose chez un patient immunocompétent est dans 80 % des cas asymptomatique (83). Les formes symptomatiques associent la triade : fièvre, adénopathies et asthénie (53). Les adénopathies préférentiellement localisées au niveau cervical et occipital, sont indolores et souples. Elles peuvent s'accompagner d'une fièvre et d'une asthénie avec la présence d'un syndrome mononucléosique. Ces formes régressent spontanément en quelques semaines en l'absence de traitement (84).

Les atteintes oculaires sous forme de chorioretinite sont plus rares, de l'ordre de 2 % chez l'immunocompétent (59). Elles peuvent survenir au décours d'une infection aiguë ou lors d'une réactivation toxoplasmique (85). La lésion débute généralement par une rétinite nécrosante en foyer qui peut ensuite atteindre toutes les couches de la rétine, puis l'épithélium pigmentaire et la choroïde. L'infiltration lymphocytaire, la réponse immunitaire et l'effet cytotoxique du parasite conduisent à une destruction du segment externe de la rétine par nécrose (86).

De façon beaucoup plus rare chez un patient immunocompétent, peuvent survenir des complications telles qu'une myocardite, une polymyosite, une pneumopathie, une hépatite ou encore une encéphalite. Ces formes sont observées lorsque l'infection est due à des souches virulentes, notamment en Amérique du Sud, et en Guyane avec un pronostic généralement grave en l'absence de traitement (85).

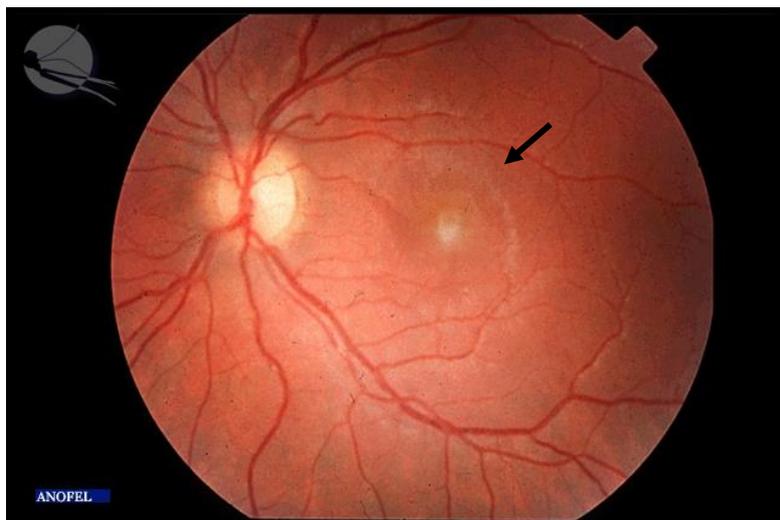
### 2.3.2. Toxoplasmose congénitale

La TC fait suite au passage transplacentaire du parasite suite à une primo-infection survenue au cours de la grossesse chez la mère. Selon la gravité de l'atteinte fœtale, il est possible de distinguer 3 formes cliniques : sévères, modérées et infracliniques (53).

**Les formes sévères de TC** sont devenues très rares aujourd'hui en France, bénéficiant de la politique de prévention de cette maladie menée depuis 40 ans dans notre pays. Elles ne sont ainsi observées que pour 0,005 ‰ naissances (80). Ces formes graves résultent en général d'une contamination survenue en début de grossesse et se traduisent par une encéphalo-méningo-myélite associant une atteinte cérébrale avec hydrocéphalie, une macrocéphalie, et des calcifications encéphaliques. L'atteinte oculaire est habituellement présente à type de chorioretinite. Le retentissement clinique pour l'enfant est majeur avec une déficience intellectuelle et des troubles neurologiques à type de paralysies, hypotonie, nystagmus. Une forme disséminée plus rare peut également être observée, se traduisant par une atteinte multiviscérale, avec une hépatomégalie et un ictère néonatal, une splénomégalie, une myocardite, et parfois des lésions cutanées.

**Les formes modérées de TC** se traduisent par une atteinte oculaire périphérique (**Figure 16**) avec une acuité visuelle conservée, parfois associée à des calcifications intracrâniennes habituellement sans retentissement clinique. Elles se manifestent dans les 3 premiers mois de vie (87,88).

**La TC infraclinique** résulte habituellement d'une contamination de fin de grossesse. C'est aujourd'hui la forme la plus fréquente en France (80). Son diagnostic strictement biologique est posé le plus souvent à la période néonatale, plus rarement lors du suivi sérologique lors de la première année de l'enfant. Toutefois, si l'enfant est asymptomatique à la naissance, une atteinte oculaire secondaire sous forme de chorioretinite peut survenir de manière retardée pendant l'enfance ou l'adolescence, voire même à l'âge adulte, ce qui implique une surveillance pédiatrique et ophtalmologique sur le long terme chez ces patients. Ainsi, dans une étude réalisée sur une cohorte d'enfants atteints de TC et ayant présenté une atteinte oculaire, 39 % seulement avaient présenté un épisode de chorioretinite dès la naissance, mais 85 % après l'âge de 5 ans, et 96 % après 10 ans (89).



*Plaque œdémateuse à bord flou. Les foyers toxoplasmiques actifs sont blancs, cotonneux, peu hémorragiques (flèche).*

**Figure 16** Toxoplasmose - Chorioretinite active (88)

### 2.3.3. Toxoplasmose chez le patient immunodéprimé

La toxoplasmose constitue une infection opportuniste survenant le plus souvent au cours d'une phase de réactivation de la maladie chez un patient anciennement immunisé, et plus rarement lors d'une primo-infection (90).

Les formes sévères secondaires à une réactivation des kystes de *T. gondii*, sont le plus souvent observées en cas de déficit profond de l'immunité cellulaire T, en particulier chez les patients infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) avec un taux de CD4+ inférieur à 100 / mm<sup>3</sup> ou chez des patients greffés sous immunosuppresseurs et sans traitement prophylactique antitoxoplasmique associé (90).

Les atteintes cliniques peuvent être localisées ou disséminées. Parmi les atteintes localisées, la localisation cérébrale est la plus fréquente, sous forme d'abcès se traduisant par une encéphalite associant des céphalées intenses et persistantes, de la fièvre et un déficit focalisé en lien avec la localisation des lésions dans le cerveau (91). La deuxième forme localisée la plus fréquente est l'atteinte oculaire et comme dans la TC, il s'agit essentiellement d'une chorioretinite. Les localisations oculaires et cérébrales sont parfois associées, notamment au cours du SIDA. Plus rarement, des formes disséminées peuvent être observées, accompagnées de fièvre persistante et de localisations viscérales multiples (90).

La primo-infection chez un patient immunodéprimé fait souvent suite à une transplantation d'organe, dans la situation où le donneur est immunisé contre le parasite contrairement au receveur (67). L'infection est alors transmise par le greffon du donneur contenant les kystes de *T. gondii*. L'organe le plus souvent en cause est le myocarde et les symptômes surviennent le plus souvent 3 à 6 mois après la greffe ou transplantation. Là encore, l'encéphalite associée à des abcès cérébraux constitue la traduction clinique la plus fréquente (65,67) (**Figure 17**).



*Imagerie par résonance magnétique de 2 lésions de nécrose en cocarde (flèches) observées après injection de produit de contraste de phase.*

**Figure 17** Toxoplasmose cérébrale (88)

## 2.4. Diagnostic biologique de la toxoplasmose

Le diagnostic de la toxoplasmose repose aujourd'hui sur le sérodiagnostic et sur des techniques de biologie moléculaire. Les différentes techniques disponibles actuellement en France ont fait l'objet d'évaluations, en particulier depuis 2007 dans le cadre du CNR de la toxoplasmose. Ces évaluations ont permis d'élaborer des recommandations concernant les indications et la stratégie d'utilisation de ces techniques en fonction du contexte clinique qui ont été diffusées ces dernières années, notamment par l'intermédiaire de la HAS (92,93).

### 2.4.1. Diagnostic sérologique

Le sérodiagnostic constitue le volet majeur du diagnostic biologique de la toxoplasmose, en particulier chez la femme enceinte afin de dépister une primo-infection souvent asymptomatique (94,95).

Dans ce chapitre, nous décrivons d'abord la cinétique des marqueurs sérologiques utilisés pour le diagnostic de la toxoplasmose. Puis nous passerons en revue les différentes techniques de sérodiagnostic disponibles en France, avant de présenter les stratégies recommandées actuellement pour leur utilisation optimale en fonction du contexte clinique des patients.

#### a) Cinétique des anticorps antitoxoplasmiques

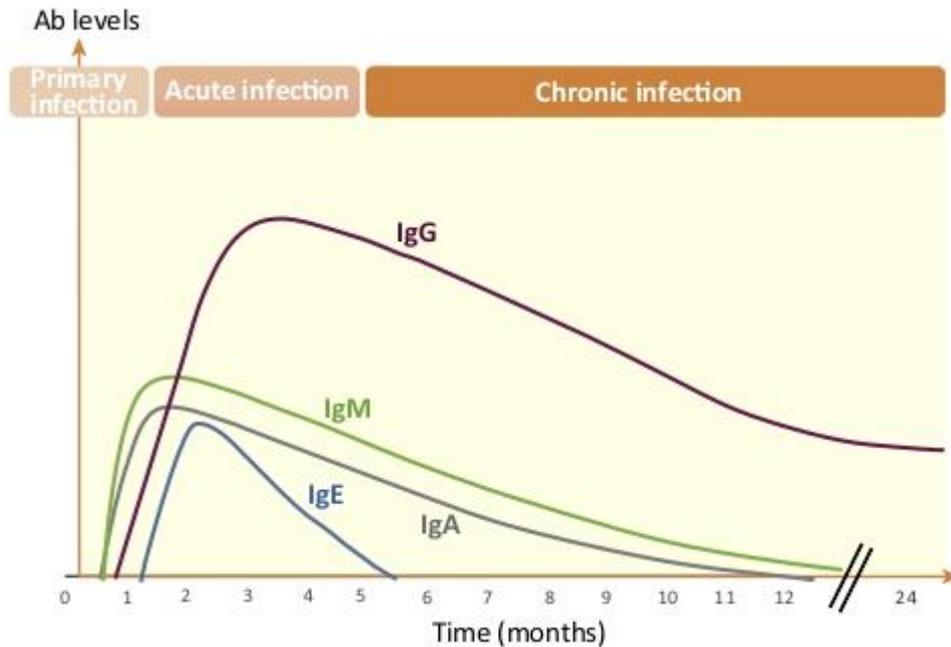
Lors d'une primo-infection, la phase aiguë de la maladie s'exprime par une réponse immunitaire à médiation humorale et cellulaire en réponse à la dissémination des tachyzoïtes de *T. gondii*. La réponse humorale va produire des anticorps d'isotypes différents et qui vont lyser les toxoplasmes extracellulaires. Les kystes qui vont se former ensuite dans les tissus vont entretenir une immunité protectrice. L'équilibre hôte-parasite qui se met alors en place va persister tant que le patient reste immunocompétent. Sur le plan sérologique, l'introduction du parasite dans l'organisme se traduit d'abord par une séroconversion suivie d'une évolution des marqueurs sérologiques dont les caractéristiques doivent être bien comprises du biologiste pour qu'il puisse interpréter précisément les différents profils observés chez les patients (83,96) (**Figure 18**).

Les IgM apparaissent en premier, environ 8 à 10 jours après le contact avec *T. gondii*. Nous observons un pic 1 à 3 mois après l'infection suivi d'une diminution progressive. Une négativation de ce marqueur intervient en moins de 7 mois chez seulement 25 % des sujets (83,94). Ainsi, pour la plupart des patients, des IgM restent souvent détectables pendant la première année qui suit le début de l'infection, voire même plusieurs années dans quelques cas, ce qui peut générer des difficultés d'interprétation des résultats sérologiques en cas de positivité des IgM (83).

Les IgA constituent également un marqueur précoce lors d'une primo-infection toxoplasmique, apparaissant le plus souvent avec un décalage de quelques jours par rapport aux IgM. Par contre ce marqueur n'est pas aussi constant que les IgM, pouvant être absent dans environ 5 % des primo-infections (97). Lorsque les IgA sont présentes, elles sont retrouvées habituellement dans les 6 à 8 mois après le début de l'infection mais, comme pour les IgM, elles peuvent persister bien au-delà chez quelques patients (83,94).

Les IgG apparaissent plus tardivement, environ 2 à 3 semaines après la contamination et atteignent un plateau au bout de 2 mois. Leur taux reste alors stable pendant plusieurs mois, puis une décroissance progressive est observée jusqu'à un taux résiduel, variable d'un individu à l'autre, et qui persiste à vie si le sujet reste immunocompétent (83,94).

Enfin, les IgE sont sécrétées au bout d'1 mois après le contact avec *T. gondii*. Le pic est atteint à 3 mois puis les IgE décroissent très rapidement et persistent rarement au-delà de 4 mois (94).



*En ordonnées figurent les taux d'anticorps IgG, IgM, IgE et IgA produits suite à la primo-infection par *T. gondii*. En abscisses figure le temps écoulé exprimé en mois, entre la primo-infection et l'obtention du taux résiduel ou de la disparition des anticorps antitoxoplasmiques.*

**Figure 18** Cinétique des anticorps antitoxoplasmiques suite à une primo-infection par *T. gondii* (94)

La méthode utilisée pour détecter les marqueurs sérologiques peut également influencer certaines caractéristiques des marqueurs. Par exemple, la précocité de détection des marqueurs peut varier en fonction de la composition antigénique du réactif employé. C'est le cas des techniques utilisant des toxoplasmes entiers ou des antigènes de surface, cible première de la réponse immunitaire : technique d'immunocapture - agglutination, Dye - Test (DT), Immuno Fluorescence Indirecte (IFI). Ces tests détectent souvent les marqueurs sérologiques plus tôt que les techniques qui utilisent des antigènes cytosoliques ou métaboliques telles que certaines techniques immunoenzymatiques automatisées (54).

### **b) Techniques sérologiques de première intention**

Les techniques de première intention sont mises en œuvre dans le cadre du dépistage sérologique en vue d'une détermination du statut immunitaire vis-à-vis du parasite chez une femme enceinte, un patient immunodéprimé, ou en attente de greffe/transplantation, ou encore dans le but de faire le diagnostic de l'infection en présence d'adénopathies, d'une atteinte oculaire (84).

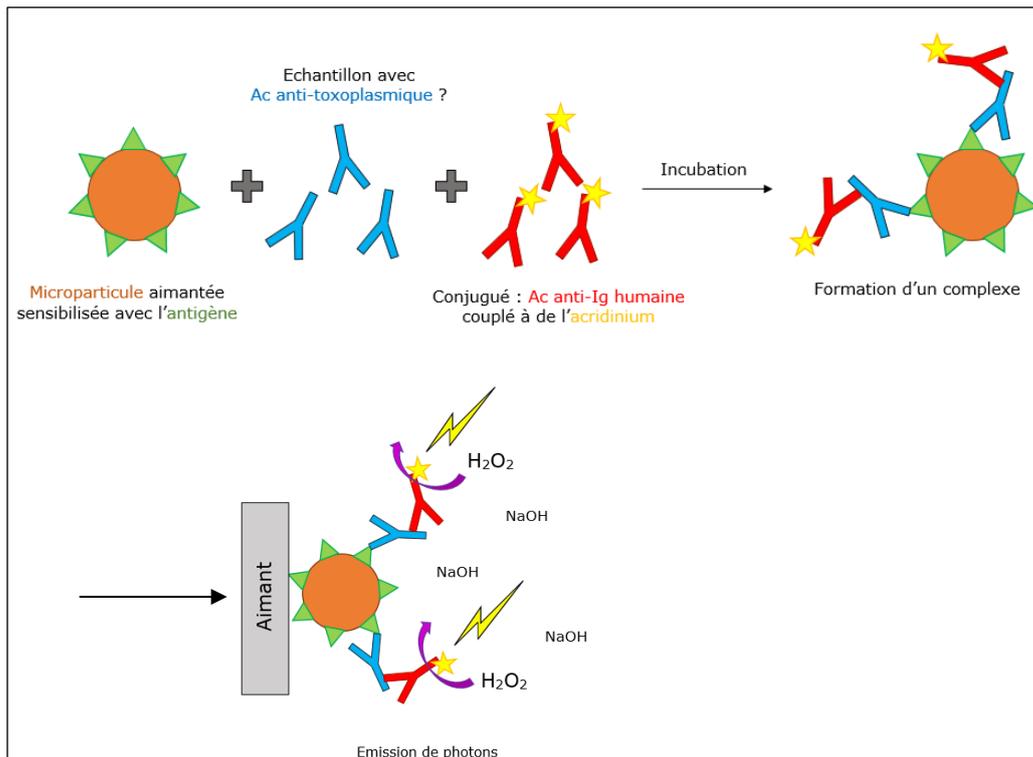
Les principales techniques utilisées aujourd'hui pour ce dépistage sérologique sont des techniques immunoenzymatiques automatisées (95). Depuis quelques années, dans la plupart des LBM en France, elles sont intégrées à un Plateau Technique Automatisé (PTA).

Il existe un bon nombre d'automates d'immunoanalyses proposés sur le marché, mais 3 représentent aujourd'hui à eux seuls plus de 65 % du marché : Elecsys (Roche), Architect (Abbott Diagnostics), VIDAS (bioMérieux) (98). Dans la très grande majorité des cas, ces automates proposent des tests de détection des IgG et des IgM antitoxoplasmiques. Le principe immunologique de base de ces techniques est de type ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) indirect, les différences résidant dans le mode de révélation du signal. Pour la détection des IgM antitoxoplasmiques, le principe d'immunocapture est souvent à la base de ces tests automatisés (99).

Le principe de la détection des IgG repose sur une première réaction entre les anticorps spécifiques présents dans le sérum du patient et un antigène toxoplasmique soluble fixé sur une phase solide (microplaques, particules, ou cône selon la technique). Après lavage, un conjugué est ajouté au milieu réactionnel. Ce conjugué est un anticorps anti-IgG humaines marqué par une molécule enzymatique (phosphatase alcaline) ou un autre marqueur (acridinium, ruthénium). Après une seconde étape de lavage, le substrat, de nature différente selon le marqueur utilisé (chromogène, solution d'activation) est ajouté. Il interagit avec le conjugué générant dans le cas d'une technique ELISA un signal coloré ou fluorescent mesuré par un spectrophotomètre ou un fluorimètre, et dans le cas d'une technique par chimiluminescence un signal lumineux. Les signaux proportionnels à la quantité d'anticorps spécifiques présents dans l'échantillon de sérum sont captés puis analysés *via* une interface informatique, et comparés à une gamme de sérums étalons (courbe de calibration) permettant de convertir les données en unités de concentration (78,100,101).

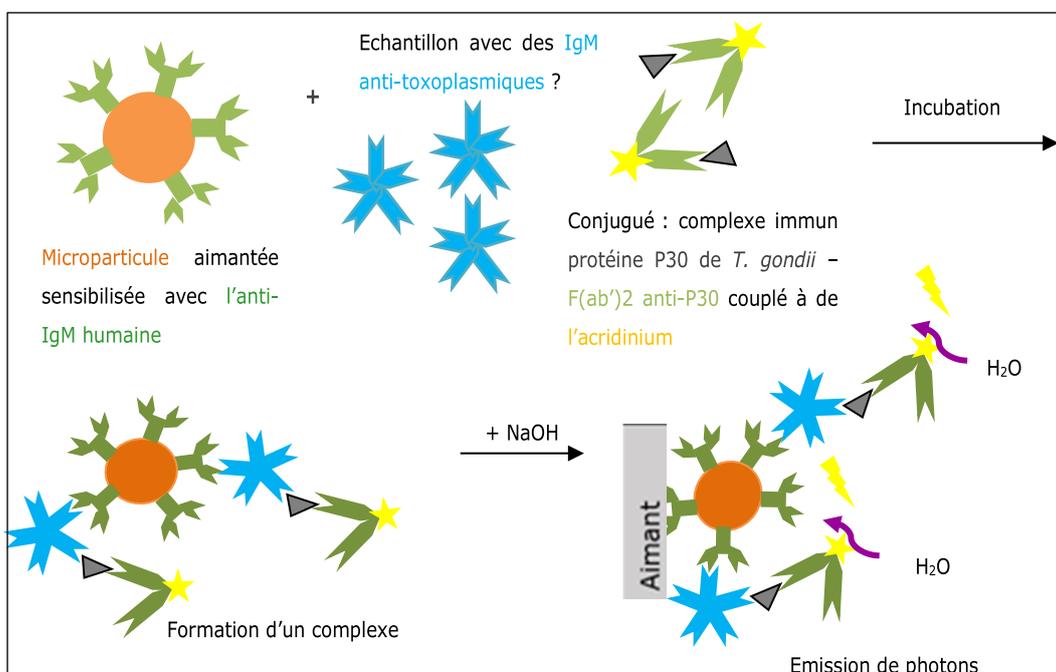
Pour la détection des IgM, l'étape initiale est différente de celle des IgG, reposant sur le principe d'immunocapture des IgM présentes dans le sérum du patient par des anticorps anti-IgM humaines fixés sur un support solide. Le conjugué est ici constitué d'un complexe composé d'un antigène toxoplasmique (en général la protéine P30) couplé à un anticorps monoclonal anti-P30 marqué (102).

A titre d'exemple, nous présentons dans les **figures 19 et 20** les principes de détection des IgG et des IgM antitoxoplasmiques sur l'automate Architect (Abbott Diagnostics) qui utilise la méthode de Chemiluminescence Microparticle Immuno Assay (CMIA).



Ac : anticorps ; NaOH : hydroxyde de sodium ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène.

**Figure 19** Principe CMIA dans la détection des IgG antitoxoplasmiques sur l'automate Architect (Abbott Diagnostics)



F(ab')<sub>2</sub> : fragment obtenu par digestion enzymatique d'une IgG et correspondant à 2 fragments Fab liés par des ponts disulfures ; NaOH : hydroxyde de sodium ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène.

**Figure 20** Principe CMIA dans la détection des IgM antitoxoplasmiques sur l'automate Architect (Abbott Diagnostics)

Ces techniques automatisées sont globalement fiables et reproductibles, et présentent par ailleurs une rapidité d'exécution qui permet d'optimiser le délai de rendu des résultats (103). De plus, contrairement aux techniques manuelles, la lecture est objective, ce qui élimine le risque de variabilité interopérateurs.

Par contre, bien qu'elles reposent sur des principes immunologiques souvent très proches, il existe des différences de performances entre ces techniques en termes de sensibilité, de spécificité mais aussi de précocité de détection des marqueurs sérologiques en début d'infection. Ainsi, selon les automates, la détection des IgG antitoxoplasmiques en début d'infection peut varier de 11 à 28 jours (104). D'autre part, certaines techniques automatisées présentent un taux non négligeable de réactions faussement positives dans la détection des IgM (103). Ces différences de performances peuvent s'expliquer notamment par la nature des antigènes utilisés qui diffère d'un réactif à l'autre. Bon nombre utilisent aujourd'hui des antigènes recombinants sensés standardiser les réactifs. Toutefois, les protocoles de préparation des protéines antigéniques recombinantes étant différents d'un fabricant à l'autre, les antigènes ainsi produits et utilisés dans les méthodes automatisées sont en réalité très hétérogènes (105).

Ce manque de standardisation des résultats pour les techniques automatisées pose un problème dans l'interprétation des résultats des taux d'IgG antitoxoplasmiques, surtout lorsque des systèmes analytiques différents sont utilisés dans le suivi d'un patient, par exemple au cours de la surveillance sérologique mensuelle chez une femme enceinte. En effet, quel que soit le système analytique employé, les résultats sont exprimés en Unité Internationale (UI), ce qui suggère une standardisation des valeurs observées (78). En réalité, il n'y a pas de correspondance entre les titres en IgG obtenus par des systèmes analytiques différents comme l'a montré l'étude comparative effectuée par le CNR à partir de 9 automates d'immunoanalyses (103) (**Tableau 5**). Cette utilisation ambiguë des UI dans ce contexte est source de confusion et doit absolument être prise en compte lorsqu'il s'agit de comparer des titres en IgG antitoxoplasmiques sur des sérums successifs. Ainsi, l'interprétation d'une cinétique des IgG à partir de sérums successifs n'est autorisée qu'à la seule condition que les différents échantillons de sérum aient été analysés sur un même automate d'immunoanalyse (95).

Enfin, sur ces automates d'immunoanalyses, les valeurs seuils proposées pour les IgG antitoxoplasmiques diffèrent également suivant le réactif employé. En cas de taux faible ou limite en IgG, le patient pourra parfois être considéré comme immunisé ou non, selon le système analytique. Or, dans le cas d'une femme enceinte, la définition exacte de son statut immunitaire est capitale car elle conditionne la poursuite de sa surveillance et l'application des mesures hygiéno-diététiques de prophylaxie lors de la grossesse (95,103).

Result category	IgG level (IU/ml)								
	Advia Centaur <sup>a</sup>	Architect <sup>a</sup>	AXSYM <sup>b</sup>	Elecsys <sup>a</sup>	Enzygnost <sup>a</sup>	Liaison <sup>a</sup>	Platelia <sup>a</sup>	VIDAS <sup>b</sup>	VIDIA <sup>b</sup>
<b>&lt;50 IU/ml</b>									
Mean	23.5	7.9	13.3	174.7	36.7	25.9	40.1	36.5	23.6
Median	13.7	5.6	10.1	108.1	27.5	17.1	28.0	21.0	16.5
SD	27.2	7.0	9.6	181.5	41.3	18.8	53.1	32.1	22.2
95% CI <sup>c</sup>	7.7	1.9	2.4	51.3	11.7	5.3	15	7.6	5.2
<b>50–100 IU/ml</b>									
Mean	90.8	22.6	33.6	339.3	88.5	61.5	135.2	103.4	58.8
Median	78.5	18.4	32.0	282.0	86.0	54.2	136.0	99.0	51.0
SD	62.9	15.3	8.4	190.4	38.6	32.4	113.8	37.6	30.3
95% CI	18	4	2.3	53	11	9	32	11.2	9
<b>100–200 IU/ml</b>									
Mean	212.1	65.5	55.9	1820.8	135.3	104.2	243.4	142.1	105.4
Median	171.5	38.5	50.2	1450.5	130.0	85.1	225.0	134.0	87.0
SD	167.0	53.2	23.0	1526.7	61.8	79.2	174.3	67.0	68.4
95% CI	40	16.6	6.8	54.8	19.4	22.5	37.8	19.8	21.4
<b>&gt;200 IU/ml</b>									
Mean	399.7	220.4	174.3	4,605.4	184.6	225.6	564.8	225.0	256.3
Median	327.8	144.2	123.5	3,292.0	195.0	236.0	386.5	221.0	221.0
SD	243.1	246.8	183.3	4,308.8	79.8	138.5	443.6	77.8	190.2
95% CI	51.9	16.5	14.7	107.3	29.8	25.3	19.6	33.9	18.5
<b>&gt;1 yr</b>									
Mean	167.7	80.4	113.3	399.7	101.7	91.1	108.0	266.4	131.2
Median	93.2	22.9	48.0	357.2	81.5	66.2	106.5	199.0	95.0
SD	184.7	224.6	129.0	188.0	70.1	83.7	49.8	262.0	130.8
95% CI	14.8	7	35.7	60	12.1	13.1	11	18.3	15.3

<sup>a</sup> évaluation 2 : analyse de 406 échantillons de sérum: 199 échantillons négatifs, 169 positifs pour les IgG et négatifs pour les IgM antitoxoplasmiques, et 39 positifs pour les deux isotypes ;

<sup>b</sup> évaluation 1 : analyse de 419 échantillons de sérum : 199 échantillons négatifs, 174 positifs pour les IgG et négatifs pour les IgM antitoxoplasmiques, et 45 positifs pour les deux isotypes ;

<sup>c</sup> intervalle de confiance à 95 % ;

Mean : moyenne ; Median : médiane ; SD : déviation standard.

**Tableau 5** Comparaison des taux quantitatifs exprimés en UI/mL d'IgG antitoxoplasmiques lors de l'utilisation de 9 tests analysés dans des panels de routine (103)

### c) Techniques de seconde intention

Les techniques de seconde intention sont des techniques complémentaires au dépistage et non systématiques, qui ont pour objectifs de clarifier l'interprétation sérologique afin d'adapter la prise en charge clinique et thérapeutique ultérieure. Elles sont multiples et leur choix de mise en œuvre est conditionné essentiellement par le profil IgG/IgM obtenu lors de l'étape de dépistage. L'interprétation des résultats de ces techniques complémentaires nécessite de bien connaître les limites propres à chaque méthode, et elles sont en général réalisées au sein de laboratoires experts (78,92).

Ces techniques de seconde intention peuvent être divisées en 2 groupes. Il y a d'une part des méthodes anciennes dites « de référence » (DT et IFI) qui sont pratiquées aujourd'hui par un tout petit nombre de laboratoires en France, et dont les champs d'application sont très restreints, concernant en particulier l'évaluation de nouveaux réactifs, ou la qualification de sérums servant de contrôles externes de qualité. Le second groupe comprend les techniques d'agglutination hypersensible et d'immunocapture - agglutination, la détermination de l'avidité des IgG, les méthodes de WB, et les tests de dosage des IgA spécifiques. A la différence des techniques de référence, ces dernières sont employées quotidiennement par les laboratoires qui réalisent les expertises sérologiques de toxoplasmose (78).

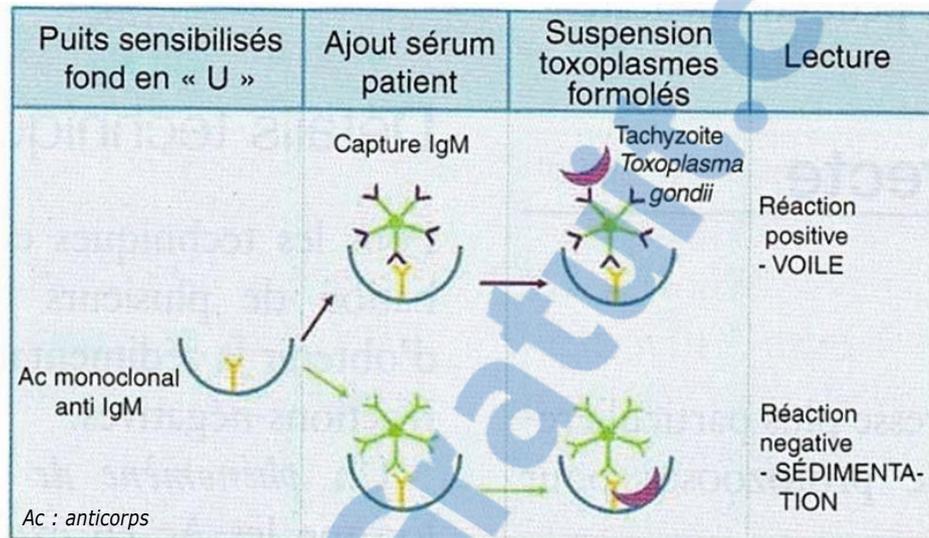
Le DT a été mis au point par Sabin et Feldman en 1948 (106). Son principe repose sur la lyse de toxoplasmes vivants par les anticorps spécifiques contenus dans le sérum en présence de complément. La lecture s'effectue à l'aide d'un microscope à contraste de phase (107). Une réaction est positive lorsqu'au moins 50 % des toxoplasmes sont lysés. Le titre est exprimé en UI/mL par rapport à un sérum étalon de référence, le seuil de positivité étant de 4 UI/mL (106). Cette technique dotée d'une excellente spécificité et sensibilité est toujours considérée comme le gold standard pour le dosage des IgG antitoxoplasmiques. Il s'agit néanmoins d'une technique particulièrement lourde à mettre en œuvre car nécessitant l'entretien d'une souche de toxoplasmes vivants, la fourniture de complément et un personnel très expérimenté pour la lecture au microscope et son emploi est aujourd'hui très limité (78,94).

L'IFI permet de détecter les IgG ou les IgM antitoxoplasmiques. Elle a été la première technique mise au point pour la recherche des IgM par Remington qui a donné son nom à ce test (108). Cette technique utilise des tachyzoïtes entiers, formolés et fixés sur lame en verre et incubés en présence du sérum à analyser. La révélation des anticorps spécifiques se fait par l'ajout d'une anti-Ig humaine (IgG ou IgM) couplée à l'isothiocyanate de fluorescéine, et la lecture est réalisée au microscope à fluorescence (107). Le titre est exprimé en UI/mL avec un seuil de positivité à 8 UI/mL. L'IFI possède globalement une bonne sensibilité et spécificité, notamment pour le dosage des IgG. Le test de Remington est par contre exposé à des faux-positifs, notamment en présence d'autoanticorps tels qu'un facteur rhumatoïde (109), ou des anticorps antinucléaires (110). Des faux-négatifs peuvent aussi être observés en cas de taux élevé des IgG antitoxoplasmiques dans le sérum, par phénomène de compétition IgM/IgG. Comme pour le DT, la méthode d'IFI reste une méthode de référence mais elle est de réalisation difficile, nécessitant un personnel expérimenté pour la lecture des lames, et elle est donc très peu utilisée aujourd'hui.

L'Agglutination Directe de Haute Sensibilité (ADHS), utilise quant à elle des plaques de microtitration de 96 puits en « U », où une suspension de toxoplasmes formolés est mise en présence du sérum à tester prétraité au 2-mercapto-éthanol (107). Une réaction positive se traduit par la formation d'un voile d'agglutination des toxoplasmes occupant au moins 50 % de la cupule. A l'inverse un bouton de sédimentation s'observe en cas de réaction négative (111,112). Cette technique facile à réaliser possède une excellente sensibilité dans la détection des IgG et est donc utilisée comme technique de confirmation en présence d'un taux faible en IgG antitoxoplasmiques (78).

La technique d'immunocapture - agglutination plus connue sous le nom d'ISAGA (Immuno Sorbent AGglutination Assay), utilise des plaques de microtitration dont la paroi des cupules est sensibilisée par une anti-IgM humaine (113) (**Figure 21**). Le principe consiste à incuber le sérum dans ces cupules sensibilisées. Après incubation et lavages, une suspension de toxoplasmes entiers formolés est ajoutée. La lecture est réalisée après 18 heures d'incubation et comme pour l'ADHS, une réaction positive se traduit par un voile et une absence d'IgM dans le sérum par un point au fond de la cupule (107). Chaque sérum est testé dans 3 cupules successives dans lesquelles sont ajoutées des concentrations croissantes en antigène. La lecture attribue un score de 0 à 4 à chaque cupule en fonction de l'intensité de la réaction, soit un score total variant de 0 à 12 pour un sérum donné.

Le seuil de positivité dépend de l'âge (107). La technique ISAGA très sensible et spécifique dans la détection des IgM antitoxoplasmiques est une technique de choix dans le diagnostic de la TC chez l'enfant (114). Par contre, du fait de cette grande sensibilité, et de sa capacité à détecter des IgM sur une longue période, parfois plus d'1 an après le début de l'infection, elle ne peut pas être employée comme technique de datation de la toxoplasmose, notamment chez la femme enceinte (115).



**Figure 21** Représentation schématique du principe de la technique ISAGA dans la détection des IgM antitoxoplasmiques (113)

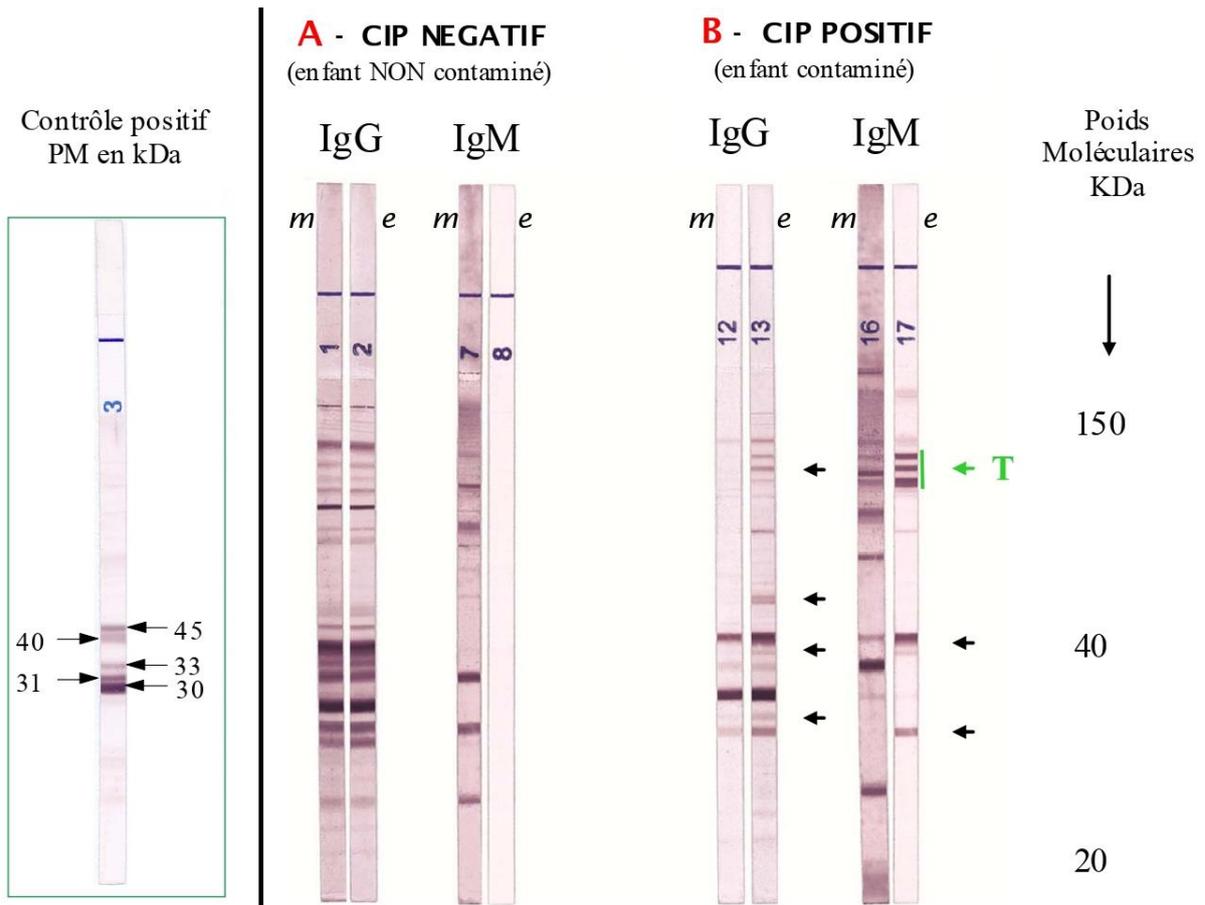
La technique du WB permet la détection dans un échantillon biologique tel que le sérum ou l'humeur aqueuse (HA) d'anticorps spécifiques dirigés contre les protéines antigéniques de *T. gondii* préalablement séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide puis transférées sur des bandelettes de nitrocellulose. La révélation immunologique consiste à mettre en contact l'échantillon biologique à tester avec la bandelette de nitrocellulose. Les anticorps spécifiques éventuellement présents dans l'échantillon se fixent sélectivement sur les protéines antigéniques. Après incubation et lavages, ces anticorps sont révélés par un conjugué anti-Ig humaines marqué par une enzyme, souvent la phosphatase alcaline. Après une nouvelle séquence d'incubation et de lavages, le substrat de l'enzyme est ajouté. Une réaction positive génère une réaction colorée au niveau des bandes protéiques (116).

Cette technique, très sensible et très spécifique, est essentiellement une méthode d'expertise sérologique de la toxoplasmose, réalisée dans les laboratoires spécialisés (117-119). Selon les recommandations du CNR de la toxoplasmose, il existe 3 indications majeures du WB dans le diagnostic de la toxoplasmose.

Le premier domaine d'application du WB concerne le diagnostic néonatal de la TC effectué à la naissance d'un enfant dont la mère a présenté une séroconversion pendant la grossesse. Le WB consiste ici à comparer les profils immunologiques de la mère et de l'enfant afin de rechercher des IgG et/ou des IgM spécifiques néosynthétisées par l'enfant (119,120) qui constituent alors un argument diagnostique d'une TC (**Figure 22**) (121).

Le WB est aussi employé comme méthode de confirmation en présence d'un titre en IgG faible ou équivoque (dans la zone grise) par la technique sérologique de dépistage (117). L'objectif dans ce cas est de préciser le statut immunitaire du patient vis-à-vis du toxoplasme et, dans le cas d'une femme enceinte, d'adapter sa surveillance lors de la grossesse. Sur le profil obtenu par WB, la présence d'une réponse contre plusieurs cibles antigéniques du parasite bien identifiées est exigée pour confirmer la positivité du test. Ainsi, doivent être présentes au moins 3 bandes parmi les 5 définies comme spécifiques dont la bande p30, pour affirmer cette positivité (122) (**Figure 22**).

Enfin, la troisième indication concerne le diagnostic de Toxoplasmose Oculaire (TO) par comparaison des profils immunologiques entre l'HA et le sérum afin d'identifier une synthèse intra-oculaire d'IgG spécifiques (83,92). Conjointement au WB, la recherche du génome de *T. gondii* par PCR et/ou le calcul de la charge immunitaire permettent d'augmenter la sensibilité de ce diagnostic (123,124). Cette technique a l'avantage d'être semi-automatisée, la rendant simple d'utilisation, mais possède cependant un coût élevé, et par ailleurs sa lecture est délicate, et peut parfois poser des problèmes d'interprétation.



PM : Poids Moléculaire ; CIP : Comparaison des Profils Immunologiques.

Dans l'encadré vert figure un profil d'IgG spécifiques antitoxoplasmiques obtenu avec le kit LDBIO TOXO II IgG® sur un sérum positif montrant la présence des 5 bandes spécifiques (flèches). Les profils A et B sont obtenus avec le kit TOXOPLASMA WB IgG IgM®. Le profil A correspond au cas d'une mère contaminée pendant la grossesse mais dont l'enfant est indemne (profils IgG strictement identiques entre la mère (m) et l'enfant (e), et aucune bande supplémentaire n'est présente sur les bandelettes IgG et/ou IgM de l'enfant). Le profil B correspond au cas d'une mère contaminée durant la grossesse et dont l'enfant est contaminé (néosynthèse d'IgG et d'IgM visualisée par la présence de bandes supplémentaires (flèches) sur les bandelettes 13 et 17 de l'enfant (e)). Trois bandes (acolade verte T) situées dans la zone entre 75 et 100 KDa peuvent parfois être retrouvées en cas de positivité du test.

**Figure 22** Exemples de profils sérologiques obtenus par technique WB (121,122)

La détermination de l'avidité des IgG est une technique très utilisée aujourd'hui dans certaines expertises sérologiques, en particulier pour la datation de l'infection toxoplasmique chez la femme enceinte (125). D'une manière générale, dans une réponse immunitaire vis-à-vis d'un agent infectieux, par exemple *T. gondii*, la force de liaison entre antigènes et anticorps spécifiques augmente progressivement avec le temps et la maturation de la réponse. Le principe pour évaluer cette force de liaison antigène-anticorps repose sur l'utilisation d'un agent dissociant, l'urée le plus souvent, qui va déstabiliser les liaisons de faibles affinités entre antigène et anticorps.

La méthode utilisée est en général une méthode immunoenzymatique avec laquelle est effectuée à partir du sérum à tester une double mesure, avec et sans agent dissociant. Le résultat est exprimé sous la forme d'un indice obtenu par le rapport des densités optiques du mélange réactionnel avec et sans agent dissociant (107). Des variantes techniques utilisent non pas l'urée, mais un agent bloquant ou un antigène recombinant soluble de toxoplasme qui fixent préférentiellement les IgG de forte avidité (101,126).

En termes d'interprétation, ce sont des tests qui permettent d'exclure une infection toxoplasmique récente. Par exemple, avec le test utilisé sur l'automate VIDAS (bioMérieux), un indice d'avidité supérieur à 0,3 permet d'exclure une infection toxoplasmique de moins de 4 mois à la date du prélèvement (125). Par contre, un indice inférieur à 0,3 peut correspondre à une infection toxoplasmique assez ancienne et n'est donc pas systématiquement le témoin d'une infection récente de moins de 4 mois (125,127). Cette technique automatisée est simple d'utilisation. Son emploi se limite à l'exclusion d'une suspicion d'une infection récente (99) particulièrement chez une femme enceinte au cours du premier trimestre de grossesse (128).

L'ensemble des techniques complémentaires qui viennent d'être présentées permet d'identifier des IgG et/ou des IgM spécifiques. Néanmoins, les IgA et les IgE antitoxoplasmiques peuvent également être recherchées. Des techniques immunoenzymatiques ainsi que l'immunocapture - agglutination, sur le même principe que l'ISAGA IgM mais avec des cupules sensibilisées par un anticorps anti- $\alpha$  (ou anti- $\epsilon$ ), peuvent être utilisées pour détecter les IgA (ou les IgE) antitoxoplasmiques (114,129). Les méthodes immunoenzymatiques apparaissent globalement moins sensibles et spécifiques que l'ISAGA dans la détection des IgA (120,130). Les IgA constituent un marqueur d'intérêt principalement dans le diagnostic postnatal de la TC (114,130), et comme argument sérologique d'appoint pour confirmer une réactivation toxoplasmique (78,92).

Enfin, la méthode Enzyme Linked Immuno Filtration Assay (ELIFA) permet de détecter les différents isotypes, à savoir les IgG, les IgM mais aussi les IgA et même les IgE antitoxoplasmiques. Son principe repose sur une électrosynérèse sur bande d'acétate de cellulose suivie d'une étape d'immunofiltration avec des anti-Ig spécifiques d'un isotype donné et marqués par une enzyme. Les complexes antigène/anticorps sont ainsi révélés sous forme d'arcs de précipitation. L'ELIFA présente un intérêt majeur dans le diagnostic néonatal de la TC par comparaison des profils immunologiques de la mère et de son enfant. Il s'agit néanmoins d'une technique lourde à mettre en œuvre, et dont l'utilisation reste très confidentielle, essentiellement pratiquée de nos jours par le laboratoire de Parasitologie - Mycologie du CHU de Reims (78,107).

### 2.4.2. Diagnostic direct

Le diagnostic direct qui consiste à mettre en évidence le parasite lui-même ou son génome dans un échantillon biologique est réservé au diagnostic de TC et aux formes graves de toxoplasmose, en particulier chez les immunodéprimés (84). Aujourd'hui, il repose essentiellement sur les techniques de biologie moléculaire. L'identification directe du parasite par l'examen direct microscopique à partir d'un frottis ou d'une apposition d'un prélèvement biopsique coloré au May Grünwald Giemsa (MGG) est très peu sensible et ne présente que peu d'intérêt (84,107).

La technique d'inoculation à la souris longtemps utilisée dans le diagnostic direct, en complément de la biologie moléculaire, n'est plus indiquée dans le diagnostic de la toxoplasmose depuis les recommandations formulées par la HAS en 2019 (92). L'inoculation à la souris ne conserve actuellement un intérêt que pour l'isolement de souches et leur typage, à visée épidémiologique.

La biologie moléculaire est actuellement la méthode recommandée pour identifier la présence de *T. gondii* dans divers échantillons biologiques tels que le Liquide Amniotique (LA), le sang total, le placenta, la moelle osseuse, le Liquide Cérébro-Spinal (LCS), le Lavage Broncho-Alvéolaire (LBA), ou encore une biopsie. La méthode de choix est la PCR et le pôle Biologie moléculaire du CNR de la toxoplasmose s'est attaché depuis une dizaine d'années à améliorer les pratiques et les performances du diagnostic de la toxoplasmose par PCR (80,131).

La technique de PCR en temps réel consiste à l'amplification en chaîne d'une séquence nucléotidique d'une partie du génome de *T. gondii*. La première étape permet de dénaturer les brins d'ADN par la chaleur (95 °C). S'en suit une seconde étape d'hybridation des amorces sens et antisens à leur séquence complémentaire du brin d'ADN (56-65 °C). Enfin au cours de la troisième étape, une enzyme thermotolérante, la Taq polymérase, va permettre l'élongation du brin complémentaire. La révélation se déroule au fur et à mesure de l'amplification grâce aux sondes fluorescentes fixées au niveau des amorces sens et antisens. L'amplification à chaque cycle se fait de façon exponentielle. La fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité d'amplicons produits pendant la PCR (132).

Cette technique de biologie moléculaire est dotée d'une excellente spécificité. Toutefois, la sensibilité est variable en fonction de la méthode employée, sachant que des laboratoires utilisent des kits commercialisés et d'autres une technique mise au point dans leur laboratoire (133,134). Dans le but d'harmoniser les pratiques, le pôle Biologie moléculaire du CNR préconise d'utiliser comme cible la séquence dénommée REP 529 constituée de 529 paires de bases et répliquée 200 à 300 fois dans le génome de *T. gondii*, de réaliser l'analyse en triplicate, d'utiliser un contrôle d'extraction, d'inhibition et de contamination afin d'optimiser la sensibilité et la spécificité de la PCR (135,136). La PCR est utilisée dans le diagnostic de la TC, que ce soit dans l'étape prénatale à partir du LA, ou dans l'étape néonatale à partir de divers échantillons biologiques (placenta, LA à l'accouchement, sang de cordon, LCS de l'enfant).

Sur la base de plusieurs études récentes, la sensibilité et la spécificité de la PCR sur le LA sont estimées à 90 % et 100 % (137,138). Dans le cadre du diagnostic néonatal de la TC, la sensibilité de la PCR est plus faible estimée à 21 % sur sang de cordon et à 79 % sur le placenta (139). Elle est aussi d'un grand intérêt pour le diagnostic de la toxoplasmose chez un patient immunodéprimé. Dans ce contexte, l'échantillon de choix est le sang périphérique mais divers autres échantillons biologiques, prélevés selon la symptomatologie clinique peuvent aussi être analysés par PCR (93). Dans ce domaine, les performances de la PCR restent aujourd'hui encore difficile à évaluer, la sensibilité de la technique pouvant varier de 30 à 80 % (90,140).

### 2.4.3. Stratégie diagnostique

#### a) Rôle du CNR dans l'évolution des pratiques de diagnostic de la toxoplasmose

Le CNR de la toxoplasmose créé en 2007, est coordonné par le laboratoire du CHU de Reims. Il est organisé en 4 pôles (Épidémiologie, Souches, Biologie moléculaire et Sérologie) et s'appuie sur un réseau de 37 laboratoires, impliqués et spécialisés dans le diagnostic, l'épidémiologie, et le traitement de la toxoplasmose (80) (**Figure 23**). Ses missions consistent à évaluer le programme national de prévention, diagnostic et traitement de la TC mis en place en France depuis 1978, mais aussi à développer et à standardiser les techniques de diagnostic, et enfin à apporter une aide aux professionnels de santé dans le domaine du diagnostic de la toxoplasmose (95,131).

Depuis 2007, de nombreux travaux ont été entrepris par chacun des pôles du CNR pour atteindre ces objectifs. Notre travail étant axé sur les techniques sérologiques de diagnostic de la toxoplasmose, nous ne présenterons ici que les travaux réalisés par le pôle Sérologie du CNR et dont les résultats publiés ont été utilisés pour argumenter la démarche qualité dans notre étude personnelle.

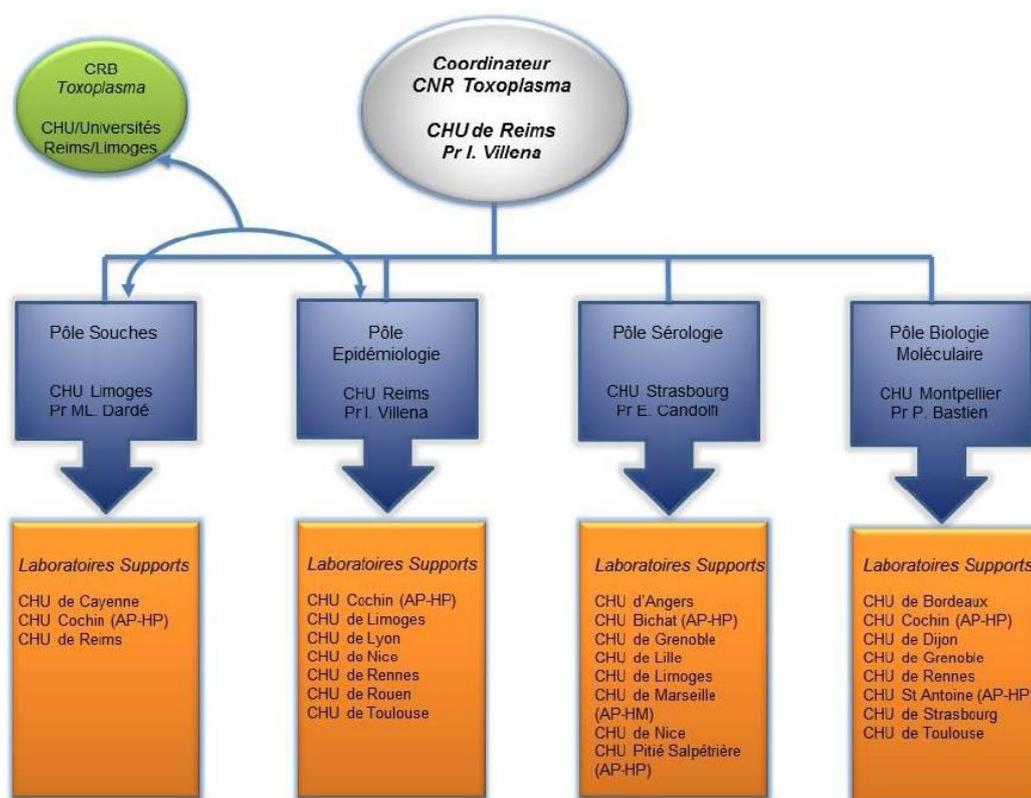
Le pôle Sérologie du CNR s'est attaché à répondre aux objectifs qui lui avaient été fixés initialement en apportant tout d'abord une aide aux LBM dans le domaine du sérodiagnostic de la toxoplasmose. C'est ainsi qu'en 2010, un guide pratique d'interprétation des différents profils sérologiques a été publié dans une revue francophone afin d'aider les biologistes exerçant sur le territoire à interpréter les résultats de ce sérodiagnostic, notamment dans le contexte de la surveillance des femmes enceintes (95).

La contribution des différents laboratoires qui participent au CNR a ensuite permis de constituer une importante sérothèque. A l'aide de ce support, ont pu être entreprises les évaluations de la plupart des techniques de sérodiagnostic de la toxoplasmose, automatisées ou manuelles, commercialisées en France. C'est ainsi qu'ont été évalués les différents tests d'agglutination présents sur le marché (112), les tests de détermination de l'avidité des IgG (125), et la plupart des méthodes automatisées de sérodiagnostic utilisées aujourd'hui en France dans les LBM (103).

En 2016, en s'appuyant sur les conclusions des études comparatives précédentes, des recommandations concernant les modalités du diagnostic sérologique ont été rédigées afin d'optimiser et de standardiser la prise en charge des patients dans les différents contextes, qu'il s'agisse de la surveillance de la femme enceinte, du diagnostic néonatal et du suivi de l'enfant à risque de TC, du diagnostic des formes oculaires, ou encore de la prévention et du dépistage des formes sévères chez les patients immunodéprimés (83).

Sur la base des travaux du CNR, la HAS a publié en 2019 deux avis, l'un concernant le patient immunocompétent (y compris la femme enceinte) et le second le patient immunodéprimé, qui constituent des guides de bonnes pratiques dans le choix des analyses à entreprendre pour le diagnostic biologique d'une infection toxoplasmique et la conduite à tenir selon le contexte clinique (92,93). Dans ces guides, la HAS propose une répartition de l'activité de diagnostic de la toxoplasmose entre laboratoires de dépistage et laboratoires experts. Selon la HAS, un laboratoire expert de la toxoplasmose est défini par sa maîtrise des techniques peu répandues ou manuelles, sa capacité à prendre en charge des dossiers complexes, et son intégration dans un réseau de réflexion et de collaboration avec les différents cliniciens et d'autres laboratoires experts (92).

Enfin, dans le cadre de la démarche d'accréditation des LBM, le pôle Sérologie du CNR organise depuis quelques années, pour les techniques analytiques très spécifiques souvent utilisées par les laboratoires spécialisés dans les expertises sérologiques, des Contrôles Inter Laboratoires (CIL), non commercialisés par les organismes proposant des Évaluations Externes de la Qualité (EEQ) pour le sérodiagnostic de toxoplasmose.



CRB : Centre de Ressources Biologiques

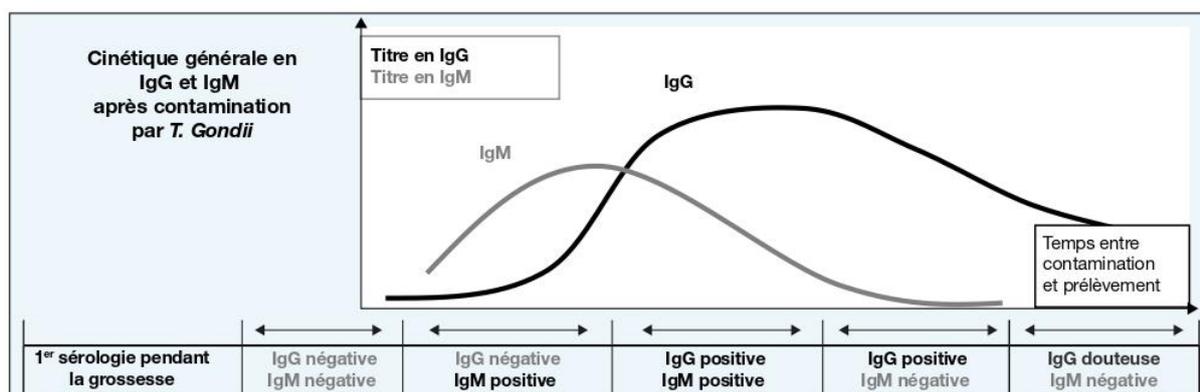
**Figure 23** Organigramme du CNR de la toxoplasmose (80)

## b) Recommandations et stratégie diagnostique selon le contexte clinique

### Stratégie diagnostique chez le patient immunocompétent (dont la femme enceinte)

Dans ce contexte du patient immunocompétent, la stratégie diagnostique est centrée sur la sérologie qui constitue l'analyse pivot chez ces patients, et tout particulièrement chez les femmes enceintes (92).

Le dépistage sérologique est réalisé dans tous les LBM et comprend la recherche des IgG et des IgM antitoxoplasmiques par une technique d'immunoanalyse le plus souvent automatisée (95). A l'issue de cette étape de dépistage 5 profils sérologiques peuvent être observés. Ils sont résumés sur la **figure 24** (141).



**Figure 24** Cinétique des anticorps antitoxoplasmiques après contamination par *T. gondii* (141)

Si le profil de dépistage ne présente aucune difficulté d'interprétation, notamment lorsqu'il associe « IgG négatives/IgM négatives » ou « IgG positives/IgM négatives », le LBM rend son résultat sans avoir recours à un laboratoire expert, et indique dans sa conclusion la conduite à tenir pour le patient.

Ainsi, s'il s'agit d'une femme enceinte, la conclusion devra indiquer qu'un suivi sérologique mensuel doit alors être poursuivi pendant la grossesse, avec un contrôle à l'accouchement et, depuis les dernières recommandations de la HAS, un ultime contrôle post-partum, 4 semaines après l'accouchement (92). De même chez une femme enceinte, face à un profil « IgG positives/IgM négatives », un contrôle sérologique sur un second sérum prélevé à 3 semaines d'intervalle devra être demandé par le biologiste dans la conclusion du dossier.

Par contre, en dehors de ces 2 situations, et face à un des trois autres profils sérologiques observés au terme du dépistage, l'envoi du sérum à un laboratoire expert est alors recommandé (92,95). Le laboratoire expert doit alors mettre en œuvre des techniques complémentaires adaptées au profil de dépistage et qui ont pour objectif de clarifier l'interprétation sérologique afin d'adapter la conduite à tenir diagnostique et thérapeutique ultérieure (83,92).

Dans la situation où seules des IgM sont détectées à l'étape de dépistage (IgG négatives/IgM positives), l'expertise sérologique consiste alors à réaliser une batterie de techniques telles que l'ISAGA IgM, la recherche d'IgA spécifiques ou encore le WB IgG afin de différencier une infection toxoplasmique débutante d'une fausse réaction positive en IgM (83). Dans ce cas, un second sérum prélevé 1 à 2 semaines après, est le plus souvent nécessaire pour confirmer l'hypothèse émise suite à la première expertise. S'il s'agit véritablement d'une primo-infection toxoplasmique, ce contrôle permet de constater la synthèse des IgG, argument sérologique indispensable pour confirmer la réalité de la séroconversion toxoplasmique (95).

Si des IgG et des IgM sont détectées lors du dépistage, la question est alors de dater l'infection toxoplasmique, car ce profil peut certes correspondre à une infection récente mais dans certains cas, et compte tenu de la persistance parfois très longue des IgM, il reflète en réalité une infection toxoplasmique déjà ancienne (115,142). L'enjeu est particulièrement important si ce profil sérologique est observé chez une femme enceinte car il est ici indispensable de dater l'infection par rapport au début de grossesse (95). L'expertise d'un tel sérum nécessite à minima de réaliser une détermination de l'avidité des IgG, technique de choix pour la datation de l'infection. Cette datation ne pourra en général être définitive sans l'analyse d'un second sérum à 3 semaines d'intervalles qui permettra d'évaluer la cinétique des IgG, autre argument majeur pour la datation de l'infection.

Enfin, devant un profil sérologique associant un taux équivoque en IgG, situé dans la zone grise de la méthode immunoenzymatique de dépistage, et sans IgM associées, le problème est alors de connaître précisément le statut immunitaire du patient vis-à-vis du toxoplasme. Là encore, chez une femme enceinte, cette précision est capitale car de ce statut dépend la justification à poursuivre ou non sa surveillance lors de la grossesse. En pratique, face à ce profil sérologique, le laboratoire expert met alors en œuvre des techniques complémentaires très sensibles dans la détection des IgG, comme la technique d'agglutination hypersensible et le WB IgG (78,83,92).

### **Stratégie diagnostique d'une toxoplasmose congénitale**

La TC peut être diagnostiquée dès la période anténatale, à la naissance de l'enfant ou lors de son suivi la première année. Le diagnostic doit être posé le plus tôt possible afin d'engager précocement un traitement adapté afin de prévenir les complications, notamment ophtalmologiques, liées à l'atteinte toxoplasmique (78).

Le diagnostic anténatal à la recherche d'une TC ne doit être entrepris qu'une fois la primo-infection toxoplasmique prouvée et datée par un laboratoire expert (78). Dès confirmation de la primo-infection toxoplasmique, 3 mesures doivent être prises. Un traitement par spiramycine est alors instauré, une surveillance échographique mensuelle est mise en place, et un diagnostic biologique prénatal par amniocentèse et analyse du LA doit être discuté (143). Dans la majorité des cas aujourd'hui, la décision est prise dans le cadre d'un Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Pré Natal (CPDPN), impliquant une étroite collaboration entre gynécologues et laboratoires spécialisés autorisés à pratiquer ce diagnostic (78).

Ce diagnostic biologique prénatal consiste à rechercher l'ADN de *T. gondii* par PCR sur le LA recueilli après au moins 16 à 18 Semaines d'Aménorrhées (SA) et pas moins de 4 semaines après le début de l'infection maternelle (144). Une PCR positive confirme le diagnostic de TC et implique la mise en route d'un traitement parasiticide associant Pyriméthamine - Sulfadiazine et Acide folinique chez la mère (PSA). Par contre, une PCR négative n'exclut pas totalement la possibilité d'une TC, des faux-négatifs peuvent se rencontrer du fait d'un passage transplacentaire tardif du parasite, d'une charge parasitaire faible, ou d'une ponction réalisée trop précocement (92,144).

Quel que soit le résultat du Diagnostic Pré Natal (DPN), tout enfant né de mère ayant fait une séroconversion pendant la grossesse ou en période périconceptionnelle doit bénéficier d'un bilan néonatal et d'une surveillance postnatale régulière dans un laboratoire expert et par des techniques adaptées (92). A la naissance, un bilan clinique et paraclinique est entrepris avec en particulier un fond d'œil à la recherche d'un foyer chorioretinien, une échographie transfontanellaire et un scanner cérébral à la recherche de calcifications intracrâniennes ou d'autres lésions cérébrales. Un bilan biologique est également prescrit associant une recherche de *T. gondii* par PCR (sang de cordon, sang périphérique du nouveau-né, LA prélevé à l'accouchement et placenta), et des tests sérologiques (92).

Ce bilan sérologique néonatal est essentiel au diagnostic de TC et repose sur un ensemble de techniques spécifiques tels que l'immunocapture - agglutination ou le WB avec comparaison des profils immunologiques de la mère et de l'enfant (83,84). A l'aide de ces techniques la démonstration d'une néosynthèse d'anticorps sériques spécifiques (IgG et/ou IgM et/ou IgA) chez le nouveau-né, confirmée après quelques jours de vie (entre J10 et J15), apporte la preuve d'une atteinte congénitale (92). Il existe une complémentarité des techniques sérologiques qui doivent donc être associées pour augmenter la sensibilité du diagnostic sérologique néonatal (83).

Lorsque le bilan anténatal ou néonatal n'a pas permis de poser le diagnostic de TC, seule une surveillance sérologique régulière de l'enfant jusqu'à négativation complète des IgG permettra d'exclure le diagnostic de TC (84,92). En l'absence de traitement de l'enfant, 2 sérologies successives et/ou une sérologie négative à l'âge d'1 an permettent ainsi d'éliminer définitivement une TC (92). Au contraire, si le titre des IgG augmente, ou si des néoanticorps (IgM, IgA) apparaissent ou encore si le taux d'IgG est toujours positif à 1 an, le diagnostic de TC est posé (92). Aujourd'hui, avec l'utilisation de techniques sérologiques adaptées et dans la mesure où les échantillons biologiques sont analysés par un laboratoire expert, le diagnostic de TC est posé dans les 3 premiers mois de vie dans plus de 90 % des cas (84,133).

Dès que le diagnostic de TC est confirmé chez l'enfant, que ce soit à la période néonatale ou dans le suivi au cours de la première année, un traitement parasiticide associant pyriméthamine - sulfamides est engagé chez l'enfant qui, en outre, devra bénéficier d'une surveillance ophtalmologique régulière et de longue durée, jusqu'à la puberté, à la recherche d'une chorioretinite (78).

### **Stratégie diagnostique chez le patient immunodéprimé**

Chez le patient immunodéprimé, qu'il s'agisse d'un greffé de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH), d'un transplanté d'organe, ou d'un patient infecté par le VIH, le diagnostic d'une toxoplasmose repose principalement sur la détection de l'ADN parasite par PCR à partir du sang principalement, et parfois d'autres échantillons biologiques (84).

La sérologie est surtout utile pour définir le statut immunitaire du patient, ce qui constitue une étape préalable capitale dans le cas particulier des greffes d'organe ou de CSH (93). Dans ce contexte, il est en effet indispensable de connaître le statut immunitaire du donneur et du receveur avant la greffe afin d'évaluer le risque de complication toxoplasmique et d'adapter l'attitude thérapeutique. Par contre, dans le suivi du patient immunodéprimé, la sérologie est peu contributive. Elle peut parfois objectiver une séroration se traduisant par une élévation du taux des IgG accompagnée d'une synthèse d'IgA (84). Toutefois, cette séroration est loin d'être constante lorsque survient une reprise évolutive de la toxoplasmose avec apparition de symptômes chez un patient immunodéprimé (90). Inversement, une séroration est parfois constatée sans traduction clinique. Les examens sérologiques chez les patients immunodéprimés sont habituellement pris en charge par un laboratoire expert, et la stratégie repose sur les mêmes règles que chez le patient immunocompétent, avec un recours si nécessaire aux tests sérologiques complémentaires déjà cités (92,93).

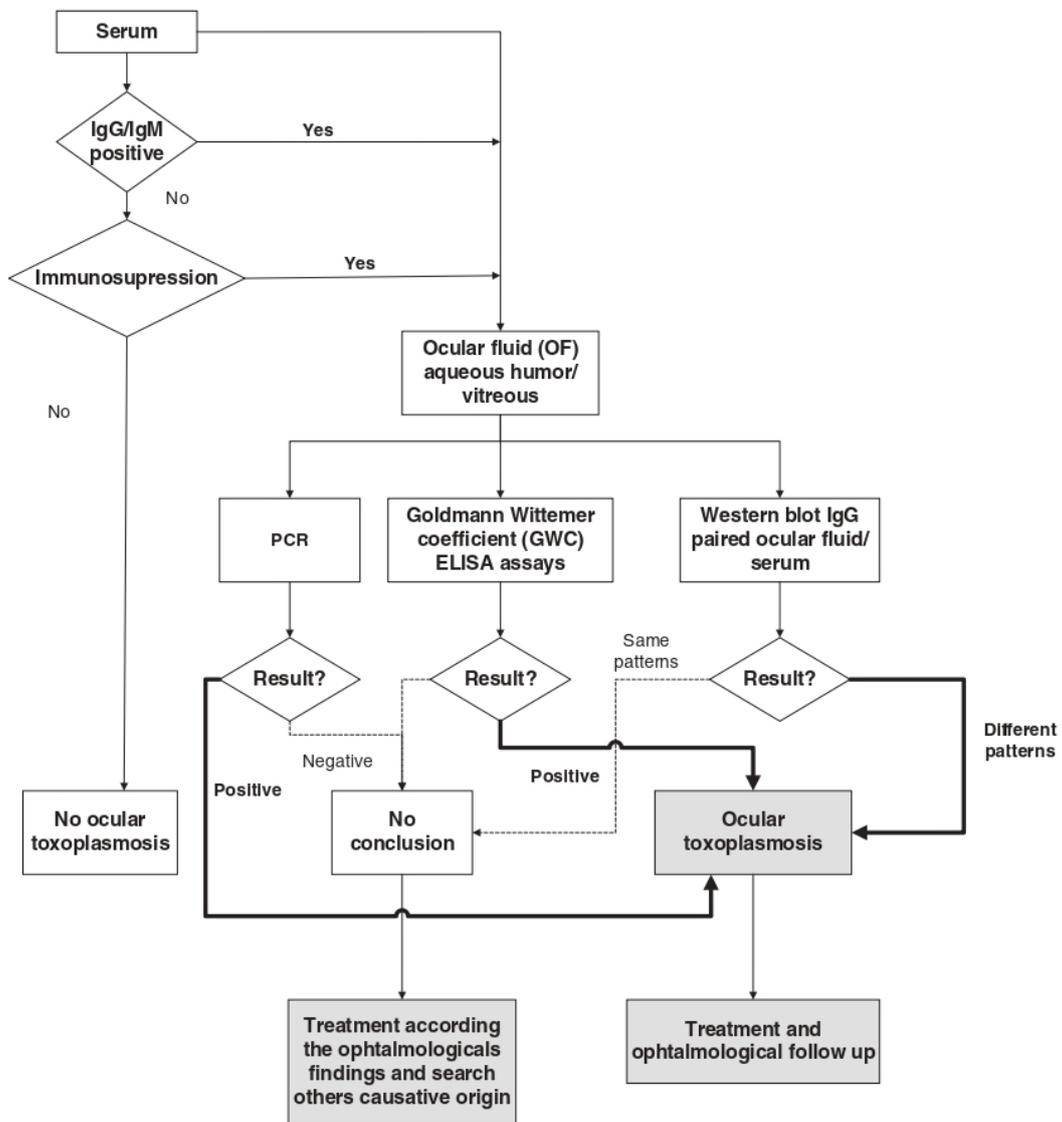
La PCR en temps réel est aujourd'hui la méthode de référence pour le diagnostic biologique d'une forme sévère de toxoplasmose chez l'immunodéprimé (93). Chez un patient infecté par le VIH, une PCR positive à partir du sang périphérique ou à partir d'autres échantillons biologiques comme le LCS, constitue un des éléments, au sein du faisceau d'arguments cliniques et d'imagerie médicale, pris en compte pour retenir le diagnostic de toxoplasmose (93). Sur le plan biologique, la PCR est également l'outil majeur pour poser le diagnostic de toxoplasmose évolutive en présence de signes cliniques chez le greffé de CSH (93). Dans ce contexte, la nature des prélèvements analysés par PCR est liée à la symptomatologie, mais le sang périphérique demeure l'échantillon biologique de choix (84). D'une manière générale, chez un patient immunodéprimé, un résultat négatif de la PCR n'exclut pas le diagnostic de toxoplasmose évolutive.

### **Stratégie diagnostique d'une toxoplasmose oculaire**

Les indications du diagnostic biologique de TO concernent les sujets séropositifs pour la toxoplasmose présentant des lésions oculaires atypiques, une expression fulminante de la maladie, un diagnostic différentiel incertain avec d'autres causes de rétinopathie ou encore une réponse retardée au traitement d'épreuve antitoxoplasmique (92).

Le diagnostic biologique repose sur 3 types de techniques : la détection de l'ADN du toxoplasme par technique de PCR dans les liquides oculaires, la détection d'une production locale d'IgG et/ou d'IgA par comparaison des profils immunologiques en immunoblot d'échantillons appariés sérum/liquides oculaires, et la détection d'une production locale d'IgG par comparaison des charges immunitaires également sur des échantillons appariés sérum/liquides oculaires (83,92). La charge immunitaire se calcule à l'aide du Coefficient de Goldmann - Witmer (CGW) ou par sa variante qui emploie une technique ELISA IgG (83,123). Les performances du diagnostic biologique de TO sont améliorées lorsque les tests de biologie moléculaire et immunologiques sont combinés. Ainsi, la sensibilité du calcul de la charge immunitaire est de 45 % dans le diagnostic de la TO. Elle est de 53 % pour l'immunoblot et de 55 % pour la PCR. Par contre, lorsque ces tests sont utilisés en association, la sensibilité atteint 85 % (145).

Un des obstacles majeurs dans ce diagnostic est le faible volume disponible de liquide oculaire pour réaliser l'ensemble de ces techniques. C'est pourquoi, le CNR a proposé une stratégie diagnostique présentée dans la **figure 25**. Les recherches moléculaires sont d'abord entreprises. Si la PCR est négative, la synthèse intra-oculaire d'anticorps antitoxoplasmiques est alors recherchée en privilégiant la technique par WB. En effet, contrairement au CGW, le WB n'est pas perturbé en cas de lésion de la barrière hématorétinienne provoquant une fuite des anticorps et une sous-estimation du CGW.



**Figure 25** Algorithme dans le choix des techniques pour le diagnostic d'une TO (83)

## 2.5. Prise en charge thérapeutique

Les molécules utilisées, la posologie et la durée de traitement vont dépendre du contexte clinique. Il existe actuellement 2 familles de molécules utilisées dans le traitement de la toxoplasmose : les inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique et les macrolides. Les molécules sont actives sur les tachyzoïtes, et inactives sur les formes kystiques (131).

### 2.5.1. Traitement chez un patient immunocompétent

La survenue d'une toxoplasmose chez un patient immunocompétent ne requiert habituellement aucun traitement (78). Il n'est prescrit qu'en cas de forme sévère très rare dans ce contexte, et peut être discuté en cas de persistance de la symptomatologie, notamment des adénopathies et/ou de l'asthénie (91).

En cas de forme sévère de toxoplasmose, l'association PSA : Pyriméthamine (Malocide®) + Sulfadiazine (Adiazine®) + Acide folinique (Lederfoline®) est recommandée au même titre que chez l'immunodéprimé (78,91). En revanche en cas de symptomatologie prolongée, la spiramycine (Rovamycine®) est préférée à raison de 6 à 9 millions d'unités par jour pendant 1 mois (78,91,146).

### 2.5.2. Traitement chez la femme enceinte

Un traitement préventif anténatal par spiramycine à raison de 9 millions d'unités par jour en 3 prises est débuté le plus rapidement possible chez toute femme ayant présenté une séroconversion en cours de grossesse. Il doit être poursuivi jusqu'à l'accouchement (147).

Ce macrolide à action parasitostatique a une capacité à se concentrer dans le placenta où son taux est 4 à 6 fois plus élevé que dans le sérum, limitant ainsi le passage de la barrière placentaire de *T. gondii* vers le fœtus. Il est dénué d'effet tératogène contrairement à la pyriméthamine, pouvant donc être utilisé au cours du premier trimestre de grossesse (53).

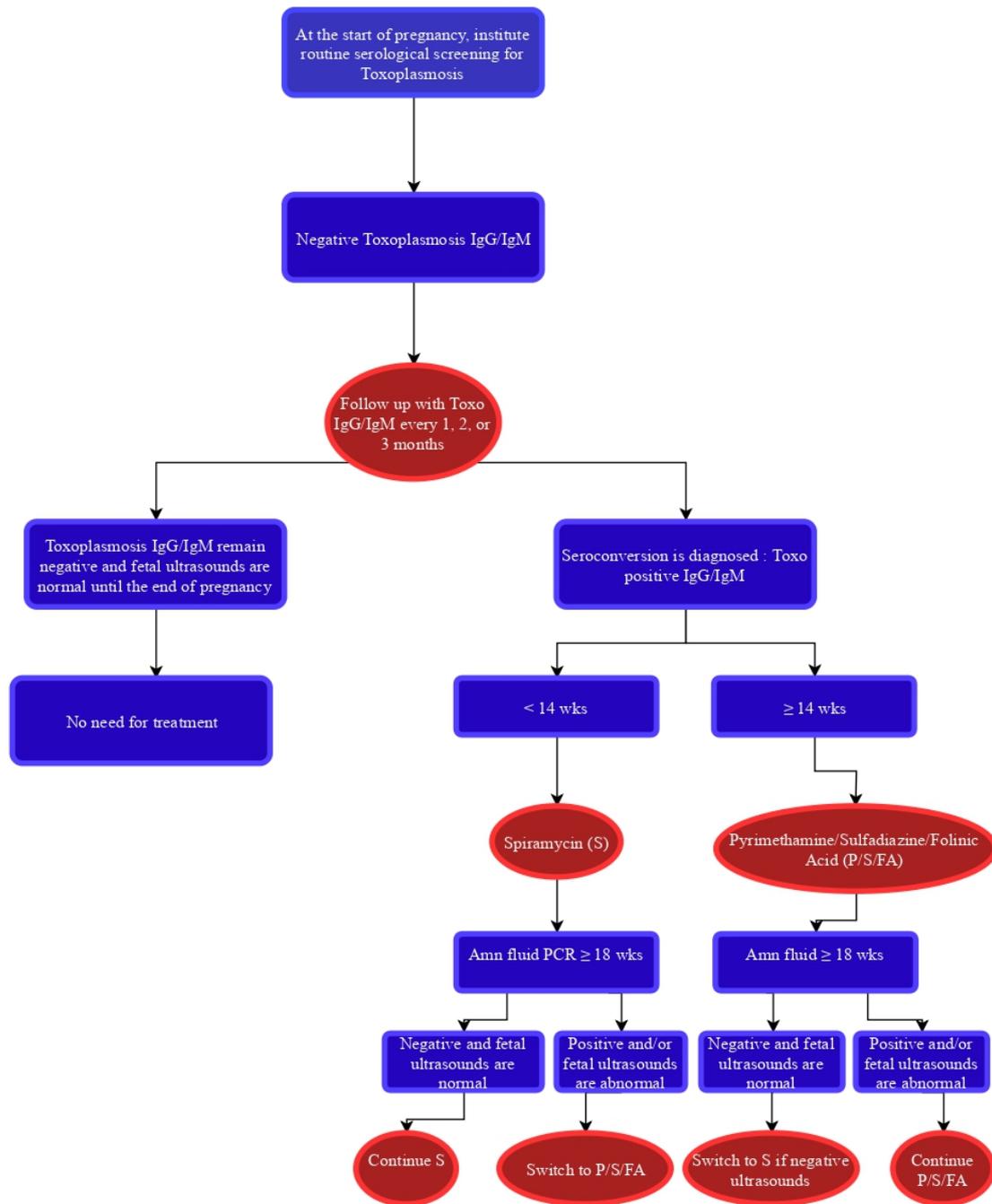
En cas de DPN positif et/ou de signes échographiques, la spiramycine doit être remplacée par l'association d'un antiprotozoaire, la pyriméthamine (1 comprimé à 50 mg par jour), d'un sulfamide, la sulfadiazine (6 comprimés à 500 mg par jour en 2 prises) et de l'acide folinique (2 comprimés à 25 mg par semaine) (147-150). Ce traitement parasiticide inhibe le métabolisme de l'acide folique et folinique par inhibition de la dihydrofolate réductase (pyriméthamine) et dihydroptéroate synthétase (sulfadiazine). L'association synergique de ces 2 molécules permet de réduire la dose et la toxicité de la pyriméthamine. Toutefois, leur action antimétabolique est exercée aussi sur les cellules de l'hôte, c'est pourquoi doivent être systématiquement associés l'acide folinique et une surveillance hématologique en prévention de la survenue d'effets indésirables hématologiques (neutropénie, thrombocytopénie, anémie). L'acide folinique permet à la fois de restaurer le pool de folates et d'empêcher les antagonistes des folates de pénétrer dans la cellule hôte (53,96,150). Le traitement par PSA vise à réduire le risque de survenue de séquelles graves chez le fœtus. En cas de DPN négatif et d'absence de signe échographique, ou si le DPN n'a pas pu être réalisé, la spiramycine sera poursuivie jusqu'à l'accouchement (147).

Lors de séroconversion tardive au cours du troisième trimestre, le risque de transmission materno-fœtal du parasite étant alors élevé, certains centres proposent d'instaurer d'emblée le traitement par PSA sans réaliser de ponction de LA, geste plus à risque pour le fœtus à cet âge de la grossesse (144).

Récemment l'étude TOXOGEST réalisée dans le cadre d'un Projet Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) à l'échelle nationale a permis de comparer le bénéfice d'un traitement par l'association PSA *versus* la spiramycine dans la réduction de la transmission materno-fœtale de *T. gondii*.

Les résultats de cette étude ont montré que le taux de transmission materno-fœtale était de 18,5 % dans le groupe traité par PSA et de 30 % dans le groupe traité par spiramycine. De plus, aucune anomalie cérébrale n'a été mise en évidence lors du suivi échographique dans le groupe traité par PSA, alors que 8,6 % des enfants ont présenté des signes neurologiques dans le groupe traité par spiramycine. Globalement, et même si cette étude révèle des résultats en faveur du traitement associant PSA, le nombre trop limité d'inclusions de cas dans cette étude ne permet pas d'apporter des conclusions définitives sur un bénéfice de ce protocole thérapeutique par rapport au protocole conventionnel. Malgré tout, en tenant compte de ces résultats, a été proposé un nouvel algorithme de prise en charge de la femme enceinte en cas de primo-infection toxoplasmique pendant la grossesse (151) (**Figure 26**). Cette nouvelle stratégie thérapeutique introduit une date pivot à 14 SA. En cas de séroconversion survenue avant cette date, la spiramycine est proposée. Si la séroconversion survient après 14 SA, c'est l'association PSA qui est mise en place d'emblée. Dans les 2 cas, les résultats de l'amniocentèse pratiquée à partir de 18 SA conditionneront le choix thérapeutique pour la fin de la grossesse.

Dans le cas particulier de la femme enceinte immunodéprimée présentant une toxoplasmose évolutive, il est préconisé de débiter d'emblée le traitement par PSA (53).



**Figure 26** Proposition d'un algorithme dans la conduite à tenir dans le cadre d'un suivi de grossesse pour la toxoplasmose (151)

### 2.5.3. Traitement chez l'enfant

La démarche thérapeutique postnatale va être fonction des résultats du bilan biologique et échographique anténatal, et du bilan biologique, clinique et paraclinique postnatal.

Un traitement antitoxoplasmique doit être systématiquement instauré chez tout enfant dont le diagnostic de TC a été prouvé biologiquement même en l'absence de signe clinique (78). Dans ce cas, le but est de prévenir les formes oculaires (choriorétinite) pouvant survenir secondairement. A nouveau, le traitement préconisé repose sur l'association PSA : Pyriméthamine (1 mg/kg par jour en 1 prise pendant 2 mois puis 0,5 mg/kg par jour) + Sulfadiazine (100 mg/kg par jour en 2 prises) + Acide folinique (1 gélule à 25 mg 2 fois par semaine) (147,152). Du fait de la toxicité hématologique potentielle de ce traitement, une numération formule sanguine devra être réalisée tous les mois. Un bilan clinique, ophtalmologique et sérologique est également réalisé tous les 3 mois pendant la durée du traitement (147).

Jusqu' alors en France, la durée du traitement varie d'1 à 2 ans selon les centres. Globalement, cette durée de traitement est bien supérieure aux 3 mois préconisés au Danemark ou même à celle recommandée aux États-Unis qui ne dépasse pas 1 an pour les formes sévères (153). Ainsi, l'étude TOSCANE initiée en 2010 dans le cadre d'un PHRC national en France a eu pour objectif d'optimiser le protocole thérapeutique chez l'enfant. Dans cette étude, 2 durées de traitements (3 mois *versus* 12 mois) ont été comparées. Les 2 groupes d'enfants inclus dans cette étude ont ainsi reçu l'association PSA pendant 3 mois puis ce traitement a été poursuivi pendant encore 9 mois par Fansidar® (pyriméthamine + sulfadoxine) pour un des deux groupes. Ce protocole est actuellement suspendu du fait de l'arrêt de commercialisation du Fansidar®. Actuellement nous comptons 302 inclusions pour lesquelles des experts procèdent à la relecture des examens du fond d'œil et les conclusions de ce travail devraient être publiés prochainement (80).

Selon les recommandations actuelles du CNR et de la HAS, le traitement antitoxoplasmique chez l'enfant ne doit être instauré qu'après confirmation biologique du diagnostic de TC (78). Chez les enfants traités la première année, la cinétique des marqueurs sérologiques peut être modifiée et il est parfois observée une négativation de la sérologie lors du contrôle à 1 an, qui est trompeuse car laissant suggérer que l'enfant est indemne de TC. En fait, après l'arrêt du traitement, un rebond sérologique est habituellement constaté, mais n'est en général pas accompagné d'une reprise évolutive de la maladie. Par conséquent, il ne nécessite pas une reprise du traitement s'il reste isolé, sans manifestation clinique ou ophtalmologique associée (154,155).

#### **2.5.4. Traitement chez un patient immunodéprimé**

Un traitement médicamenteux peut être à la fois instauré en tant que prophylaxie primaire, ou bien en traitement curatif ou encore en tant que prophylaxie secondaire.

La prophylaxie primaire vise à prévenir une réactivation chez un patient VIH positif avec un taux de lymphocytes T CD4 < 100 /mm<sup>3</sup> ou chez un patient greffé de CSH. Chez le patient transplanté, cette prophylaxie a pour but de prévenir une infection transmise par le greffon en cas de discordance sérologique entre un donneur séropositif et un receveur non immunisé (D+ / R -).

Le traitement recommandé dans ces indications est le cotrimoxazole (sulfaméthoxazole + triméthoprime) à raison d'1 comprimé à 160 mg/800 mg 3 fois par semaine ou 80 mg/400 mg 1 fois par jour pendant 3 mois pour le patient VIH positif, et jusqu'à 6 mois ou jusqu'à restauration de l'immunité pour le transplanté d'organe ou le greffé de CSH (90,91).

Le traitement curatif est prescrit en cas d'infection évolutive chez le patient greffé, transplanté ou VIH positif par l'association pyriméthamine (50 à 75 mg par jour, après une dose de charge de 100 mg) + sulfadiazine (4 à 6 g par jour) + acide folinique (25 mg par jour) (91). En cas d'intolérance ou de contre-indication à la sulfadiazine, cette molécule peut être remplacée par la clindamycine. La durée de traitement préconisée est en moyenne de 6 semaines jusqu'à l'obtention d'une évolution clinique et radiologique favorable en cas de toxoplasmose cérébrale chez le patient VIH.

La prophylaxie secondaire fait suite quant à elle au traitement curatif, mais à des posologies plus réduites. Elle sera maintenue jusqu'à la restauration immunitaire (90).

#### **2.5.5. Traitement de la toxoplasmose oculaire**

Une toxoplasmose oculaire est parfois résolutive spontanément en 1 à 2 mois chez un immunocompétent et ne nécessite donc pas systématiquement un traitement médicamenteux. Toutefois, en cas de lésions atypiques ou d'un contexte d'immunodépression, le traitement est entrepris d'emblée et de manière systématique (78).

Le traitement de première intention est là encore l'association PSA accompagnée, si nécessaire, d'un traitement par corticoïdes. Si ce traitement de première intention ne peut être utilisé, des alternatives peuvent être proposées, notamment les associations cotrimoxazole + prednisone, pyriméthamine + clindamycine, mais aussi l'atovaquone ou l'azithromycine peuvent être proposées (78,156).

# Étude personnelle

# 1. Matériel et méthodes

## 1.1. Outils et moyens utilisés

L'utilisation des différents outils qualité et la prise de connaissance des documents du COFRAC nous ont permis de construire les dossiers de vérification de méthodes, de résoudre certains points faibles, et de proposer des solutions aux constats mis en évidence lors de l'audit des différentes techniques.

Les techniques du sérodiagnostic de la toxoplasmose faisant l'objet d'une demande d'accréditation pour la prochaine visite du COFRAC, sont la sérologie automatisée par technique CMIA sur l'Architect i2000 (Toxo IgG® et Toxo IgM®; Abbott Diagnostics), les 2 tests western-blot (TOXO II IgG® et TOXOPLASMA WB IgG IgM®; LDBIO Diagnostics) sur l'EUROBlot Master (EUROIMMUN), le test au latex (PASTOREX TOXO®; BIO-RAD), et les 2 tests ISAGA pour le dosage des IgM et des IgA antitoxoplasmiques (Toxo-ISAGA® et Toxo-ISAGA IgA®; bioMérieux). En ce qui concerne le volet sérologique du diagnostic de la toxoplasmose, il restera à accréditer la technique de détermination de l'avidité des IgG antitoxoplasmiques sur l'automate VIDAS 3 (bioMérieux) qui n'a pas fait partie de notre travail.

### 1.1.1. Documents du COFRAC

Un certain nombre de documents proposés par le COFRAC ont été consultés ou utilisés comme supports dans le cadre de ce travail. Ils sont disponibles en ligne sur le site du COFRAC ([https://tools.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol\\_id=59](https://tools.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=59)).

#### a) Documents de RÉFérence (REF)

Les SH REF sont des documents de référence opposables, et le laboratoire doit donc répondre aux exigences qui y figurent. Si elles ne sont pas respectées, le LBM s'expose à un écart, au même titre que le non-respect de la norme. Nous avons utilisé lors de ce travail le SH REF 02 « Exigences pour l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 », et nous avons consulté le SH REF 08 « Expression et évaluation des portées d'accréditation ».

#### b) Guides Techniques d'Accréditation (GTA)

Ces guides ne sont pas opposables, et ne constituent donc pas une obligation pour le LBM de les appliquer. Toutefois, si le laboratoire décide de répondre aux exigences d'une autre façon, il doit être en mesure de présenter des éléments de preuves solides pour justifier ses choix le jour de la visite du COFRAC. Ces guides sont là pour apporter davantage de précisions afin de répondre efficacement et aisément aux exigences de la norme. Les guides techniques que nous avons utilisés dans ce travail sont le SH GTA 01 « Guide Technique d'Accréditation en biologie médicale », le SH GTA 04 « Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes de biologie médicale », le SH GTA 06 « Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale », et le SH GTA 14 « Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale ».

### c) Documents d'INformation (INF)

Ils ont pour objectifs de donner des éléments d'informations sur les divers volets de l'accréditation, et de mettre à disposition des fiches pratiques quant à la gestion de la portée flexible, la résolution des écarts suite à un audit par exemple. Ce ne sont pas des documents opposables. Les documents d'information que nous avons consultés dans ce travail sont le SH INF 30 « Fiche pratique : Étendre sa portée d'accréditation avec la flexibilité ! » et le SH INF 50 « Portées-types d'accréditation ».

### d) FORMulaires (FORM)

Ces formulaires ont été créés par le COFRAC dans le but d'harmoniser la présentation et le rendu des résultats des dossiers de vérification/validation de méthodes. Ces formulaires ne sont cependant pas opposables, mais fortement recommandés. Le SH FORM 43 « Fiche type - Vérification (portée A)/Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale » a été à la base de la construction de nos dossiers de vérification de méthodes. Nous avons également pris connaissance du SH FORM 06 « Liste détaillée des examens/analyses demandées à l'accréditation », document repris et utilisé par la cellule Qualité afin d'établir la liste détaillée de l'ensemble des examens du PBH.

## 1.1.2. Outils de la qualité

### a) Cycle PDCA (roue de Deming)

Ce cycle nous a permis d'établir notre plan d'action afin de mener à bien notre démarche d'accréditation (**Tableau 6**).

<b>Plan (P) Planification</b>	Faire un état des lieux de l'existant
<b>Do (D) Réalisation</b>	Mettre en œuvre les actions planifiées
<b>Check (C) Évaluation</b>	Évaluer les actions réalisées (exemples : audit croisé, conformité des résultats obtenus)
<b>Act (A) Amélioration</b>	Établir les axes d'amélioration, les actions correctives et préventives

**Tableau 6** Les 4 étapes du cycle PDCA pour l'élaboration de notre plan d'action

### b) Diagramme de Gantt

Ce diagramme est un outil de planification qui a pour finalité de modéliser les tâches nécessaires à la réalisation d'un projet, d'en assurer le suivi et d'en visualiser les échéances (157). Ainsi nous nous sommes inspirée de ce principe pour construire un planning général disponible en **annexe 1**, suite aux constats recensés lors de l'état des lieux. Il nous a permis d'une part de programmer les principales tâches à accomplir durant notre projet, et d'autre part d'avoir une vision globale de l'avancée de notre travail.

### c) Tableau de bord et gestion documentaire

Le tableau de bord est un outil de pilotage au sein d'un projet et peut être défini comme étant un support informatif présentant des informations de synthèse des tâches à réaliser (158). Dans le cadre de notre projet, cet outil nous a été utile pour suivre notre gestion documentaire.

Avant d'établir notre tableau de bord, nous avons à l'aide du logiciel KaliLab de gestion de la qualité au sein du PBH, fait un état des lieux complet des documents déjà existants et en relation avec notre sujet. Ainsi notre tableau de bord été composé uniquement des documents à rédiger ou à actualiser selon l'organisation décrite au **tableau 7**. Au sein de chaque onglet nous retrouvons le titre du document, l'état d'avancement (à rédiger/en cours/terminé), la date de rédaction/actualisation, la date de diffusion dans KaliLab, ainsi que la référence du document.

Chapitre 5 « Exigences techniques » Norme NF EN ISO 15189	Onglets du tableau de bord
Personnel (Chapitre 5.1)	Gestion des compétences
Locaux et conditions environnementales (Chapitre 5.2)	
Matériel de laboratoire, réactifs et consommables (Chapitre 5.3)	Gestion des réactifs et consommables
Processus préanalytique (Chapitre 5.4)	Préanalytique
Processus analytique (Chapitre 5.5)	Analytique
Garantie de qualité des résultats (Chapitre 5.6)	Gestion des contrôles qualité
Processus postanalytique (Chapitre 5.7)	Postanalytique
Compte rendu des résultats (Chapitre 5.8)	
Diffusion des résultats (Chapitre 5.9)	
Gestion des informations de laboratoire (Chapitre 5.10)	

**Tableau 7** Agencement de notre tableau de bord pour la gestion documentaire

### d) Analyse des Modes de Défaillance de leurs Effets et de leur Criticité (AMDEC)

L'outil AMDEC utilisé à but préventif, est construit autour des 5M du diagramme d'Ishikawa (Matières, Milieu, Matériel, Méthodes, Main d'œuvre). Il consiste à recenser et identifier l'ensemble des causes possibles ou points critiques à un problème, au fonctionnement d'un secteur, ou à l'obtention d'un résultat. A chaque cause doit correspondre un élément à maîtriser ainsi que son/ses moyen(s) de maîtrise. Cela fait l'objet d'une pondération grâce à une échelle de criticité établie sur la probabilité d'apparition du risque, le niveau de gravité, et sa détectabilité (**Annexe 2**). Ainsi l'application de ce principe permet de hiérarchiser ces causes ou points critiques entre eux afin de prioriser, en cas de problème, les plus importants à résoudre en premier. Lors de ce projet, nous avons utilisé l'AMDEC pour l'élaboration de la maîtrise des risques des différentes techniques à accréditer.

### e) Méthode Qui ? Quoi ? Où ? Quand ? Comment ? Combien ? Pourquoi ? (QQOQCCP)

Le QQOQCCP, est un outil qui permet de décrire rapidement et efficacement une situation ou un problème afin d'y apporter une solution adaptée. Il tient son nom des questions auxquelles il doit répondre et qui sont rassemblées dans le **tableau 8**. Cet outil qualité a pu nous servir plusieurs fois pour mieux définir certaines tâches à accomplir.

<b>Qui ?</b>	Qui est concerné ?
<b>Quoi ?</b>	De quoi s'agit-il ?
<b>Où ?</b>	Où cela se produit-il ?
<b>Quand ?</b>	Quand cela survient-il ?
<b>Comment ?</b>	Comment procède-t-on ?
<b>Combien ?</b>	Combien de fois cela se produit-il ?
<b>Pourquoi ?</b>	Pourquoi cela se passe-t-il ainsi ?

**Tableau 8** Les questions de l'outil QQOQCCP (159)

### f) Réunions

La réunion d'équipe est indispensable pour l'avancée d'un projet, pour souder et motiver les membres d'un groupe. C'est pourquoi, dans le déroulement de notre travail, nous avons planifié plusieurs réunions afin de faire le point sur les difficultés, les points forts, les changements. Ces réunions ont fait intervenir divers participants possédant des compétences dans différents domaines concernant des aspects techniques ou la Qualité elle-même.

## 1.2. Démarche mise en œuvre dans le diagnostic de la toxoplasmose au sein de l'UF de Parasitologie - Mycologie

### 1.2.1. Positionnement de l'UF au sein du Plateau de Biologie Hospitalière et état des lieux de l'accréditation des examens

#### a) Présentation de l'UF de Parasitologie - Mycologie

En 2011, les 13 laboratoires jusqu'alors dispersés sur le site du CHU, ont été regroupés au sein de l'Institut de Biologie en Santé (IBS) qui comprend le PBH et l'Institut de Recherche et d'Ingénierie en Santé (IRIS). Comme les autres pôles du CHU, le PBH est composé de Départements eux-mêmes constitués d'UF mais aussi d'un Centre de Prélèvements et de Consultations Spécialisées (CPCS). L'UF de Parasitologie - Mycologie fait partie du Département de Biologie des Agents Infectieux qui comprend également les UF de Virologie et de Bactériologie - Hygiène hospitalière.

L'UF de Parasitologie - Mycologie est divisée en 3 secteurs : Morphologie parasitaire, Mycologie, et Sérologies parasitaires et fongiques. C'est dans ce dernier secteur que sont réalisées les techniques de diagnostic de la toxoplasmose (techniques sérologiques et de biologie moléculaire). Pour la partie sérologique, un peu plus de 10000 analyses sont réalisées par an, pour le compte du CHU d'Angers et, depuis 2015 pour le Centre Hospitalier (CH) de Saumur. En plus de cette activité, l'UF exerce une fonction de « laboratoire expert » selon la définition de la HAS (92), et dans ce cadre, elle prend en charge plusieurs centaines de demandes d'expertises sérologiques de la toxoplasmose par an, envoyées par les LBM du secteur public et du secteur privé. L'UF qui possède également un agrément pour le DPN de la toxoplasmose, est intégré au CPDPN du CHU d'Angers. Enfin, elle est membre du pôle Sérologie du CNR de la toxoplasmose depuis 2007, date de la création de ce CNR.

### b) Démarche d'accréditation

Le PBH du CHU d'Angers obtient une première accréditation pour la recherche et le dénombrement de légionelles dans l'eau en 2013, selon la norme NF EN ISO 17025, l'inscrivant ainsi dans une démarche volontaire d'accréditation qui a été poursuivie par la suite comme le montre le **tableau 9**.

Années	Disciplines	Nombre d'examens	Volume d'examens accrédités
2013	Bactériologie - Hygiène hospitalière (recherche et dénombrement des légionelles dans l'eau)		
2015	Neurobiologie, Pharmacotoxicologie, Hématologie moléculaire, Virologie	+ 8 examens	< 1 %
2016	PTA hémostase, Hématocytologie et Biochimie	+ 17 examens	52 %
2017	Hormonologie métabolisme, Bactériologie, Parasitologie - Mycologie, Biologie de la reproduction - spermologie, Allergologie	+ 8 examens	53 %
2018	Biologie de la reproduction - Assistance médicale à la procréation	+ 43 examens	<b>58,3 %*</b>

*\*En référence à la loi du 30 mai 2013 (36), 70 % des examens auraient dû être accrédités en 2018. Cependant, la loi Sapin 2 (160) vient redéfinir les échéances imposées par cette loi, en supprimant le palier intermédiaire de 2018.*

**Tableau 9** Évolution de la démarche d'accréditation de 2013 à 2018 au PBH du CHU d'Angers

En 2019, 175 examens sont demandés en extension par le PBH pour la prochaine visite du COFRAC qui aura lieu en début d'année 2020, ce qui correspond à l'ouverture de 27 lignes de portées d'accréditation sur les 900 existantes dans la liste définie par le COFRAC. Cette année, le Département de Biologie des Agents infectieux a fait une demande d'accréditation pour 54 examens.

En présentant conjointement différents examens de sérologies infectieuses automatisées sur l'Architect i2000 (toxoplasmose et sérologies virales), les UF de Parasitologie - Mycologie et de Virologie vont ainsi permettre d'ouvrir la ligne de portée BM MG01. Les techniques complémentaires du sérodiagnostic de la toxoplasmose font également parties de cette ligne de portée.

### **1.2.2. Circuit de prise en charge d'une analyse de toxoplasmose**

Les demandes de sérologies de la toxoplasmose, peuvent arriver par 2 circuits au PBH. Dans le premier cas, lorsque la demande est faite par un service du CHU qui utilise la prescription connectée, l'échantillon arrive dans une pochette par un système de transport par tubes pneumatiques (conduit reliant le service clinique au PBH). Dans le second cas, l'échantillon est déposé à la Réception Centralisée des Échantillons Biologiques (RCEB) soit par une infirmière lorsque le patient est prélevé au CPCS du PBH, soit par le biais d'un coursier notamment lorsque la demande provient d'un LBM extérieur au CHU (CH de Saumur ou autre LBM notamment dans le cadre des demandes pour expertises sérologiques de la toxoplasmose).

#### **a) Phase préanalytique**

Si le prélèvement est parvenu à la RCEB par le circuit de la prescription connectée, ou déposé au guichet de la RCEB pour les sérums provenant du CH de Saumur, le tube primaire est placé sur des automates de tri, de centrifugation, et d'aliquotage (AU800 et AU2550) pour ensuite être acheminé vers l'Architect i2000 par le biais de la chaîne automatisée (Siemens) du PTA. Si le prélèvement est déposé à la RCEB par un coursier, la demande d'examen est enregistrée par le personnel de la RCEB qui procède à une double vérification de la saisie. Le tube et la prescription sont transmis au secteur spécialisé de l'UF de Parasitologie - Mycologie située à l'étage du PBH, par un système de balancelle. Les techniciennes de l'UF de Parasitologie - Mycologie réalisent une centrifugation du tube primaire avant l'analyse du sérum sur l'Architect i2000.

Dans notre travail, nous avons revu les documents existants et validé l'ensemble des étapes de la phase préanalytique pour le sérodiagnostic de la toxoplasmose.

#### **b) Phase analytique**

Tous les échantillons de sérum faisant l'objet d'une demande de sérologie de toxoplasmose sont d'abord analysés par méthode CMIA sur l'automate Architect i2000 situé au niveau du PTA. A l'exception des nouveau-nés et nourrissons pour qui le test de détection des IgM n'est pas réalisé sur l'Architect, dans tous les autres cas, les 2 tests Toxo IgG® et Toxo IgM® sont entrepris et constituent les tests de dépistage. Les techniques complémentaires sont pour la plupart réalisées à l'étage au sein de l'UF de Parasitologie - Mycologie, à l'exception de la détermination de l'avidité des IgG effectuée sur l'automate VIDAS 3 présent, comme l'Architect, sur le PTA.

Ce sont les techniciens de l'UF de Virologie qui assurent l'essentiel de la prise en charge des tests Toxo IgG® et Toxo IgM® sur l'automate Architect i2000. Outre les analyses proprement dites, ils réalisent également les calibrations, l'analyse des CIQ, et la maintenance sur l'automate, étapes spécifiques qui ont fait l'objet d'une part importante de notre travail et que nous avons individualisées dans le chapitre suivant.

Chronologiquement, une fois les CIQ analysés sur l'Architect i2000 et contrôlés dans le logiciel Unity Real Time (URT) les résultats sont transférés dans une interface informatique appelée OneLink, puis transmis dans le logiciel General Laboratory Information Management System (GLIMS) pour la gestion des résultats. Pour la sérologie de la toxoplasmose, les étapes de confirmation des résultats sur OneLink et GLIMS sont réalisées respectivement par les techniciens de l'UF de Virologie et par les techniciens de l'UF de Parasitologie - Mycologie.

Ces derniers assurent également la réalisation des techniques sérologiques complémentaires (WB, latex, et ISAGA). Ces techniques n'étant pas reliées au middleware OneLink, les résultats doivent donc être retranscrits manuellement dans GLIMS.

### **c) Gestion des calibrations, des maintenances et des contrôles**

Pour la première étape de dépistage sur l'automate Architect i2000, la calibration des paramètres est réalisée dès lors qu'il y a un nouveau lot de réactif à bord de l'automate, ou un contrôle défectueux. De plus, l'automate nécessite pour son entretien régulier, des maintenances préventives tracées dans la fiche de vie de l'automate disponible dans KaliLab.

Dans notre travail, nous avons revu entièrement la gestion des CIQ. Avant cette réorganisation, les CIQ étaient analysés tous les jours après la Maintenance Journalière (MJ), et suite à une intervention sur l'automate (calibration, maintenance, panne). En semaine (hors jours fériés), ces tâches étaient effectuées par un technicien de l'UF de Virologie en poste sur le PTA. Le week-end et les jours fériés, ces tâches revenaient aux techniciens du PTA.

En ce qui concerne les techniques d'expertises, la calibration et les maintenances préventives sont réalisées uniquement pour la technique WB qui est semi-automatisée, avec l'utilisation de l'appareil EUROBlot Master. Pour l'ensemble des techniques, les CIQ sont analysés dans la même série que les échantillons des patients. Ces tâches sont réalisées par les techniciens de l'UF de Parasitologie - Mycologie, excepté pour l'EUROBlot Master. Cet appareil étant mutualisé, l'analyse des contrôles de trousse et la réalisation de la MJ sont pratiqués alternativement par les techniciens qui l'utilisent. Dans ce cadre, notre travail a consisté à homogénéiser certaines pratiques sur l'automate EUROBlot Master, notamment celles concernant la maintenance.

Enfin, l'UF de Parasitologie - Mycologie est abonnée à des programmes d'EEQ et de CIL pour les différentes techniques sérologiques de dépistage et d'expertises de toxoplasmose. Elle participe aux programmes d'EEQ proposés par le Centre Toulousain pour le Contrôle de la qualité en Biologie (CTCB) pour l'évaluation des tests Toxo IgG® et Toxo IgM® sur l'Architect i2000 et de la technique de détection des IgM par ISAGA. Pour les autres techniques, des CIL sont organisés par le CNR de la toxoplasmose. Depuis plusieurs années, l'UF y participe et a même été l'UF organisatrice pour le CIL du test WB en 2016 et en 2018, chargée alors de préparer et diffuser les échantillons de CIL puis de rendre compte des résultats aux laboratoires inscrits sur l'ensemble du territoire. Pour ce qui concerne la gestion des EEQ/CIL, nous avons rédigé un document décrivant la gestion de ces contrôles pour le diagnostic de la toxoplasmose dans l'UF.

#### **d) Phase postanalytique**

La validation des résultats de la sérologie automatisée sur l'Architect i2000 est effectuée par le biologiste sur le logiciel GLIMS. Elle est précédée d'une étape de validation des CIQ à l'aide du logiciel URT. Par ailleurs, les techniques manuelles font l'objet d'une vérification par le biologiste à l'aide des feuilles de travail.

Cette validation est assurée du lundi au vendredi par le biologiste référent du secteur. Et en cas d'absence, par un autre biologiste de l'UF ou un interne de biologie médicale, habilité à la validation de ces examens. Les examens de la toxoplasmose ne sont pas considérés comme des urgences et ne sont donc pas validés en période de garde, le samedi et le dimanche ainsi que les jours fériés. Pour ce qui concerne les CIQ, notre travail a consisté à mettre en place et à rédiger les documents permettant aux biologistes d'assurer leur gestion, notamment la validation quotidienne, et le suivi à moyen et à long terme.

Enfin, une fois l'analyse terminée, une aliquote de chaque sérum est conservée au sein d'une sérothèque selon les règles de conservation imposées par la législation en cours (161). Dans ce cadre, nous avons rédigé un document sur la gestion de la sérothèque.

#### **1.2.3. Stratégie d'utilisation des techniques sérologiques au sein de l'UF**

La stratégie employée par l'UF de Parasitologie - Mycologie pour réaliser les sérologies de la toxoplasmose suit les recommandations récentes énoncées par la HAS et le CNR de la toxoplasmose et qui ont été présentées dans la première partie de ce travail.

Lors de l'étape de dépistage, le dosage des IgG et des IgM antitoxoplasmiques est ainsi réalisé par méthode CMIA sur l'automate Architect i2000 (Toxo IgG® et Toxo IgM®; Abbott Diagnostics). En fonction des profils sérologiques observés lors de ce dépistage, une seconde étape composée de techniques complémentaires peut alors être entreprise de manière stratégique, afin de résoudre les difficultés d'interprétations rencontrées en présence de dossiers complexes.

En dehors du profil associant une absence conjointe d'IgG et d'IgM par méthode CMIA, les autres profils observés lors de cette étape de dépistage vont induire des techniques complémentaires. Ainsi, face un profil sérologique de dépistage avec IgM positives et IgG négatives, les 2 techniques d'immunocapture - agglutination de détection des IgM (Toxo-ISAGA®; bioMérieux) et de détection des IgA (Toxo-ISAGA IgA®; bioMérieux) associées éventuellement à un test WB IgG (TOXO II IgG®; LDBIO Diagnostics) sont mis en œuvre afin de différencier une infection toxoplasmique débutante d'une fausse réaction positive en IgM. Si des IgG et des IgM sont détectées lors du dépistage, une technique de confirmation des IgM par technique ISAGA (Toxo-ISAGA®; bioMérieux) et une détermination de l'avidité des IgG par méthode automatisée sur VIDAS 3 (TOXO IgG Avidity; bioMérieux) sont entreprises. Cette dernière technique est essentielle pour dater l'infection toxoplasmique, ce qui est capital s'il s'agit d'une femme enceinte.

En présence d'un profil associant un taux faible ou équivoque en IgG, situé entre 1 et 5 UI/mL par test Toxo IgG® sur l'Architect i2000, sans IgM associées, une technique d'agglutination directe de haute sensibilité, ADHS (Toxoscreen DA®; bioMérieux) était effectuée jusqu'alors dans l'UF, complétée par le test WB de détection des IgG (TOXO II IgG®) en cas de réaction équivoque de l'ADHS. Par l'utilisation de ces techniques complémentaires, l'objectif est ici de préciser le statut immunitaire du patient vis-à-vis du toxoplasme. Enfin, en présence d'un taux d'IgG supérieur à 5 UI/mL par test Toxo IgG®, et sans IgM, un test d'agglutination au latex (PASTOREX TOXO®; BIO-RAD) est réalisé afin de repérer une éventuelle fausse réaction positive dans la détection des IgG par méthode CMIA.

Certaines de ces techniques s'appliquent dans le diagnostic biologique d'une TC. En effet, lorsque nous recevons un sang de cordon, nous mettons en œuvre la technique d'immunocapture - agglutination par les tests Toxo-ISAGA® et Toxo-ISAGA IgA® pour la détection des IgM et des IgA antitoxoplasmiques, respectivement. Dans le même temps, ces techniques sont réalisées sur le sérum à l'accouchement de la mère, en plus du dosage des IgG et IgM antitoxoplasmiques sur l'Architect i2000. Puis, les 2 tests, Toxo-ISAGA® et Toxo-ISAGA IgA®, sont appliqués sur le sérum à 3 jours de vie de l'enfant et renouvelés entre le dixième et le quinzième jour en cas de résultat positif, conjointement à la technique WB de détection des IgG et IgM (TOXOPLASMA WB IgG IgM®; LDBIO Diagnostics) pour comparaison des profils immunologiques de la mère et de l'enfant. Enfin, dans le cadre de la surveillance de l'enfant au-delà de la période néonatale, nous entreprenons sur ces sérums un dosage des IgG par méthode CMIA sur l'Architect i2000 avec analyse itérative du sérum antérieur dans la même série, ainsi qu'un dosage des IgM et des IgA par les tests d'immunocapture - agglutination cités précédemment.

Enfin, pour le diagnostic d'une TO, lorsque nous recevons un prélèvement d'HA, nous réalisons la technique de PCR associée, en cas de volume suffisant d'échantillon (> 50 µL), à la recherche d'IgG spécifiques par technique WB de comparaison des profils immunologiques entre le sérum et l'HA. La sérologie nous permet de mettre en évidence une néosynthèse intra-oculaire d'IgG antitoxoplasmiques. Conjointement, nous réalisons sur le sérum, la technique de dépistage par méthode CMIA sur l'Architect i2000 afin de connaître le statut immunitaire du patient.

Ces différentes stratégies déjà en place dans l'UF lorsque nous avons commencé notre travail, ont été rédigées et insérées dans le logiciel KaliLab. Pour chacune d'elles, nous avons élaboré des logigrammes permettant de mieux visualiser l'organisation des techniques entre elles, et dans lesquels nous avons inclus les liens avec les interprétations proposées pour chaque situation.

### 1.3. Dossiers de vérification de méthodes

Dans le cadre de l'accréditation des techniques sérologiques de la toxoplasmose, nous avons construit les dossiers de vérification de méthodes à l'aide du logiciel Performance LEVER (PLEVER). Ce logiciel mis à disposition par la société VISKALI, nous permet de compléter le document SH FORM 43 à partir des données brutes obtenues pour les tests de performances exigés par le COFRAC.

Nous avons dû répondre à 3 questions en amont de leur élaboration :

- Sommes-nous en portée flexible de type A ou de type B ?
- Les techniques sont-elles qualitatives ou quantitatives ?
- Quels sont les tests qui feront l'objet d'un essai sur site ou d'une recherche bibliographique ?

Ainsi, en respectant strictement les recommandations du fournisseur, nous sommes pour l'ensemble des techniques en portée flexible de type A. Les sérologies infectieuses sur l'Architect i2000 emploient une technique CMIA qui génère des résultats quantitatifs. Les autres techniques de sérodiagnostic de la toxoplasmose que nous avons eu à vérifier dans notre travail sont qualitatives.

Conformément au SH GTA 04 (47), nous allons décrire succinctement les tests que nous avons réalisés dans le cadre d'une technique quantitative et d'une technique qualitative, accompagnés des modalités pour la mise en œuvre de ces tests. L'ensemble des références des réactifs utilisés pour ces tests sont disponibles en **annexe 3**.

#### 1.3.1. Dossiers de vérification de méthodes d'une technique quantitative

Nous avons appliqué cette démarche pour l'élaboration des dossiers de vérification de méthodes des IgG et IgM antitoxoplasmiques (Toxo IgG<sup>®</sup> et Toxo IgM<sup>®</sup>; Abbott Diagnostics) dosées sur l'Architect i2000.

##### a) Tests faisant l'objet d'un essai sur site

###### **Répétabilité :**

Elle consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible (47). Nous avons donc réalisé cet essai sur 30 échantillons de contrôle à 2 niveaux de concentration (négatif et positif), fournis dans les trousse de réactifs Architect, le même jour. A l'issue de ce test sont calculés une moyenne, un écart-type ainsi qu'un Coefficient de Variation (CV), ce dernier étant ensuite comparé au CV du fournisseur.

###### **Fidélité intermédiaire (ou reproductibilité intralaboratoire) :**

Elle consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs suivants : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages (47). Ce test a été effectué sur 30 échantillons de CIQ du fournisseur BIO-RAD sur 2 niveaux de concentration (positif et négatif) et sur une période de 30 jours. L'interprétation statistique des résultats est basée sur le même principe que le test de répétabilité.

### **Exactitude :**

L'exactitude évalue l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie d'un mesurande (47). Nous avons utilisé les résultats des EEQ fournis par le CTCB pour l'année 2018. Ainsi, l'évaluation de l'exactitude a été effectuée à partir des résultats de 6 EEQ pour les IgG et de 8 EEQ pour les IgM antitoxoplasmiques, en les comparant au groupe de pairs utilisant l'Architect i2000.

### **Incertitude de mesure (IM) :**

L'IM est un paramètre non négatif qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à un mesurande, à partir des informations utilisées (47). Elle se calcule à partir des EEQ et des CIQ intralaboratoires, à l'aide de la formule ci-dessous. Nous avons utilisé les résultats des EEQ fournis par le CTCB, et le CV obtenu suite à l'étude de la fidélité intermédiaire à partir des CIQ de la même année.

$$u(C) = \sqrt{\left(\frac{CV \times m}{100}\right)^2 + \left(\frac{\bar{E}}{\sqrt{3}}\right)^2 + \sigma_E^2}$$

« u(C) » correspond à l'incertitude combinée  
« CV » correspond au coefficient de variation de la moyenne des CIQ étudiés  
« m » correspond à la moyenne des CIQ étudiés  
« E » correspond au biais moyen des EEQ obtenu sur la même année que les CIQ étudiés  
«  $\sigma_E$  » correspond à l'écart-type du biais

### **Comparaison de méthodes :**

La comparaison de méthodes a été réalisée suite à l'introduction de la chaîne automatisée (Siemens) sur le PTA. Les 2 automates comparés sont les mêmes, à savoir deux Architect i2000. Le premier automate introduit en 2011, a été remplacé par son homologue courant avril 2017.

Afin de réaliser cette comparaison, plusieurs sérums de patients, possédant différents profils sérologiques ont été sélectionnés. Au total, nous avons pu analyser 30 sérums pour l'étude des IgG et des IgM antitoxoplasmiques. Les intervalles de mesures ont été définis en appliquant la règle «  $\pm 2$  écarts-types » à la moyenne obtenue lors de l'étude de la fidélité intermédiaire, pour chacun des niveaux de CIQ (**Tableau 10**). Les résultats obtenus ont été exploités grâce à une étude de corrélation à l'aide du graphique de régression des moindres rectangles et le graphique de Bland et Altman.

Nous avons conjointement étudié les données de la littérature, notamment à l'aide des publications portant sur des études comparatives récentes réalisées par le CNR de la toxoplasmose.

<b>IgG antitoxoplasmiques</b>	<b>Moyenne (m)</b>	<b>Ecart-type (<math>\sigma</math>)</b>	<b>Intervalle *</b>
<b>CIQ négatif</b>	0,03	0,05	[0 – 0,13] UI/mL
<b>CIQ positif</b>	8,66	0,33	[8 – 9,32] UI/mL

<b>IgM antitoxoplasmiques</b>	<b>Moyenne (m)</b>	<b>Ecart-type (<math>\sigma</math>)</b>	<b>Intervalle *</b>
<b>CIQ négatif</b>	0,07	0,01	[0 – 0,09] valeur index
<b>CIQ positif</b>	7,67	0,38	[6,91 – 8,43] valeur index

\* avec un intervalle =  $[m - 2 \sigma ; m + 2 \sigma]$

**Tableau 10** Intervalles de mesures obtenus suite à l'application de la règle  $\pm 2$  écarts-types à la valeur obtenue lors de l'étude de la fidélité intermédiaire des IgG et IgM antitoxoplasmiques

### **Contamination :**

L'étude de la contamination interéchantillons a été effectuée à partir de 30 échantillons au total en analysant 3 fois consécutivement un échantillon de forte concentration (H1, H2 et H3, de moyenne mH) suivi d'un échantillon négatif analysé 3 fois consécutivement (B1, B2, B3, de moyenne mB), ces séquences sont répétées 5 fois. L'estimation de la contamination est calculée à l'aide de la formule suivante :  $\text{contamination (\%)} = (mB1 - mB3) / (mH - mB3)$ . Le pourcentage doit être au plus proche de zéro (47).

Le test de contamination a été réalisé sur le dosage de l'antigène HBs, un des marqueurs sérologiques utilisés en Virologie pour le diagnostic sérologique de l'hépatite B, également dosé sur l'Architect i2000.

### **b) Tests faisant l'objet d'une étude bibliographique**

L'étude bibliographique dans le cadre de l'évaluation d'une méthode quantitative en portée A est nécessaire pour déterminer les performances analytiques (sensibilité et spécificité), les interférences, la robustesse et la stabilité des réactifs, ainsi que les intervalles de référence. Nous nous sommes donc appuyée sur la notice du fournisseur, complétée par une revue approfondie des données de la littérature.

### **1.3.2. Dossiers de vérification de méthodes d'une technique qualitative**

Nous avons appliqué cette démarche pour l'élaboration du dossier de vérification de méthode des tests WB (TOXO II IgG® et TOXOPLASMA WB IgG IgM®; LDBIO Diagnostics), au latex (PASTOREX TOXO®; BIO-RAD), ISAGA (Toxo-ISAGA® et Toxo-ISAGA IgA®; bioMérieux).

### **a) Tests faisant l'objet d'un essai sur site**

#### **Variabilité interopérateurs :**

Ce test est un indicateur de la maîtrise de la réalisation des méthodes non automatisées (Toxo-ISAGA®, Toxo-ISAGA IgA® et PASTOREX TOXO®) ou semi-automatisées (TOXO II IgG® et TOXOPLASMA WB IgG IgM®).

La technique WB employée dorénavant dans l'UF est semi-automatisée sur automate EUROBlot Master. Elle nécessite l'intervention d'un technicien pour la préparation de la solution de lavage, mais aussi les dépôts des échantillons et du contrôle. Compte tenu de ces étapes « manuelles » dans cette technique semi-automatisée, nous avons évalué la variabilité interopérateurs sur 10 échantillons de contrôle de trousse du Kit LDBIO TOXO II IgG® avec le même numéro de lot de réactif, et des opérateurs différents en l'occurrence les 2 techniciennes habilitées pour réaliser ces techniques dans l'UF. Rappelons que pour cette technique de détection des IgG antitoxoplasmiques, le résultat est positif si au moins 3 des 5 bandes spécifiques sont présentes dans la zone de 30 à 45 kDa dont la p30. Le contrôle positif utilisé dans ce test d'évaluation de la variabilité interopérateurs doit donc présenter les 5 bandes spécifiques à 30, 31, 33, 40 et 45 kDa.

La variabilité interopérateurs a également été évaluée pour les techniques d'agglutination au latex (PASTOREX TOXO®) et d'immunocapture - agglutination (Toxo-ISAGA®). Les modalités employées pour évaluer cette variabilité sont résumées dans le **tableau 11**.

Par ailleurs, cette évaluation n'a pas été répétée pour le test TOXOPLASMA WB IgG IgM® et Toxo-ISAGA IgA®. Les étapes techniques étant identiques.

Tests	n	Nature de l'échantillon	Méthode
<b>PASTOREX TOXO®</b>	10	Contrôle de trousse positif et négatif du kit PASTOREX TOXO®	6 échantillons avec le lot n°1 et 4 échantillons avec le lot n°2, analysés par des opérateurs différents sur 10 jours
<b>Toxo-ISAGA®</b>	10	Contrôle de trousse positif et témoin antigène du kit Toxo-ISAGA®	1 échantillon avec le lot n°1 et 9 échantillons avec le lot n°2, analysés par des opérateurs différents sur 10 jours

*n = nombre d'échantillon*

**Tableau 11** Modalités de réalisation du test de variabilité interopérateurs du test au latex et des techniques d'immunocapture - agglutination

**Exactitude :**

L'exactitude a été évaluée à partir des données des EEQ fournies par les organisateurs de ces évaluations externes, ou des résultats des CIL organisés par le pôle Sérologie du CNR de la toxoplasmose (**Tableau 12**). Nos résultats sont ainsi comparés au groupe de pairs utilisant la même technique.

Tests	n	Type d'échantillon	Organisateur de l'EEQ / du CIL
<b>TOXO II IgG®</b>	6	CIL	UF de Parasitologie - Mycologie du CHU d'Angers*
<b>TOXOPLASMA WB IgG IgM®</b>	12	CIL	Laboratoire de Parasitologie - Mycologie du CHU de Marseille
<b>PASTOREX TOXO®</b>	NA	NA	**
<b>Toxo-ISAGA®</b>	8	EEQ	CTCB
<b>Toxo-ISAGA IgA®</b>	6	CIL	Laboratoire de Parasitologie - Mycologie du CHU de Grenoble

*n = nombre d'échantillon ; NA : non applicable ; CIL : contrôle interlaboratoires ; EEQ : évaluation externe de la qualité*

*\*Dans ce cas-là, la concordance des réponses entre le centre organisateur et les centres évalués vaut pour validation du CIL en question / \*\*il n'existe à ce jour pas d'EEQ ou de CIL pour le test au latex dans le cadre de la toxoplasmose. La mise en place d'un CIL pour ce test est actuellement en cours avec le laboratoire de microbiologie du CH Le Mans.*

**Tableau 12** Modalités de l'évaluation de l'exactitude des tests qualitatifs

### **Contamination :**

L'étude de contamination a été réalisée uniquement pour la technique du WB qui possède une partie semi-automatisée sur l'EUROBlot Master, contrairement aux autres techniques qualitatives entièrement manuelles, et utilisant des supports de tests à usage unique. En ce qui concerne cette méthode WB, la contamination inter-réactifs est très improbable étant donné que chaque réactif empreinte une tubulure spécifique. Par contre, l'absence de contamination interéchantillons doit être vérifiée car les têtes de dépôt et d'aspiration ne sont pas lavées entre chaque échantillon. Nous avons donc évalué ce risque de contamination sur 12 échantillons de sérum au total, en analysant 3 fois consécutivement un échantillon fortement positif suivi d'un échantillon négatif analysé lui aussi 3 fois de suite, cette séquence étant répétée 2 fois dans la même série.

Cette étude de contamination n'a été réalisée qu'avec le test WB TOXO II IgG® puisque le second test TOXOPLASMA WB IgG IgM® reprend exactement les mêmes étapes techniques.

### **b) Tests faisant l'objet d'une étude bibliographique**

L'étude bibliographique dans le cadre de l'évaluation d'une méthode qualitative en portée A est nécessaire pour déterminer les performances analytiques (sensibilité et spécificité), faire une étude comparative des méthodes avec les techniques de référence ou de principes différents dosant les mêmes isotypes. Elle doit également être réalisée pour argumenter les rubriques concernant les interférences, la robustesse, la stabilité des réactifs, ainsi que les intervalles de référence. Nous nous sommes donc appuyée sur la notice du fournisseur, accompagnée d'une revue approfondie des données de la littérature afin de compléter ces rubriques.

## **1.4. Audit croisé**

Les UF de Parasitologie - Mycologie et de Virologie concernées par la demande d'accréditation des sérologies infectieuses sur l'Architect i2000 ont proposé d'évaluer le travail déjà entrepris dans ce cadre par le biais d'un audit croisé. Dans ce but, la cellule Qualité du PBH a sollicité le CH de Cholet qui a accepté de réaliser cet audit.

### **1.4.1. Préparation à l'audit croisé**

Quelques jours avant l'évaluation, les auditeurs nous ont demandé de leur faire parvenir des documents en relation avec le périmètre audité. Concernant le volet technique, les auditeurs nous ont demandé de fournir les documents suivants : la stratégie et les modalités de validation des examens de sérologies infectieuses sur l'Architect i2000 pour les 2 UF, les dossiers de vérification de méthodes des IgG et IgM antitoxoplasmiques, ainsi que celui de l'antigène HBs pour l'UF de Virologie. Sur les aspects en lien avec la qualité, ont été transmis aux auditeurs les documents en relation avec le SMQ comme la procédure générale pour la métrologie, pour la gestion des non-conformités, la gestion des processus ainsi que leur cartographie. Conjointement, les auditeurs nous ont envoyé un plan d'audit prévisionnel disponible en **annexe 4**.

Quelques jours avant l'audit, une réunion de préparation en présence du personnel (techniciens et biologistes) des 2 UF concernées, a permis de revoir notre organisation pour la journée de l'audit et de rappeler les règles de déroulement d'un audit.

#### **1.4.2. Déroulement de l'audit croisé**

L'audit s'est tenu le 4 juillet 2019. Il s'est déroulé selon 4 étapes : la réunion d'ouverture, l'évaluation sur site, la rédaction des conclusions par les auditeurs, et la réunion de clôture.

##### **a) Réunion d'ouverture**

Lors de la réunion d'ouverture, nous avons dans un premier temps procédé aux présentations de l'ensemble des auditeurs et des audités. Puis, les évaluateurs ont fait un rappel de l'objectif de l'évaluation et du champ de l'audit. Cette phase nous a permis d'ajuster le plan d'audit prévisionnel annoncé quelques jours auparavant en précisant la répartition des auditeurs et des audités sur le site, ainsi que les plages horaires à respecter. Dans le même temps, nous avons présenté le circuit d'un échantillon dans le cadre d'une prescription d'une demande de sérologie infectieuse de dépistage arrivant à la RCEB et devant être analysé sur l'Architect i2000.

##### **b) Évaluation sur site**

Les évaluateurs se sont ensuite dirigés vers leur site respectif où ils ont pu nous poser leurs questions en suivant leur grille d'audit qu'ils avaient préparées avant leur venue. Ainsi pour la sérologie de la toxoplasmose l'audit s'est déroulé en 2 temps. Nous avons commencé par un exercice de traçabilité qui s'est déroulé sur le restant de la matinée sur un dossier choisi au hasard. La deuxième partie de l'audit s'est déroulée l'après-midi. Elle a particulièrement été centrée d'une part sur la gestion documentaire autour de l'Architect i2000. D'autre part, les responsables qualité, métrologiques de l'UF de Virologie, ainsi que l'ingénieur responsable de la cellule Qualité ont été sollicités plus précisément pour répondre à des questions des auditeurs portant sur la métrologie et le SMQ.

##### **c) Synthèse des auditeurs et réunion de clôture**

A l'issue de cette évaluation, les auditeurs se sont réunis afin de faire un résumé des constats, une synthèse des points forts, et des axes d'amélioration, ainsi que la formulation des écarts éventuels. L'ensemble du bilan a été ensuite restitué lors de la réunion de clôture. Si un écart (critique ou non) est annoncé, nous devons proposer un plan d'action et mettre en place une/des action(s) corrective(s) avant la prochaine visite du COFRAC qui sera susceptible de vérifier ce point-là. Si ce dernier constate qu'aucune action n'a été entreprise depuis cet audit croisé, cela pourra constituer un écart.

Enfin, dans les semaines qui suivent l'audit croisé, un rapport d'audit nous est adressé, reprenant le champ d'évaluation, la liste des documents et les personnes évaluées, la description de la situation observée, et les éventuelles fiches écarts associées.

## 2. Résultats

### 2.1. Phase préanalytique

Selon la norme, la phase préanalytique est un processus commençant par la prescription des examens par le clinicien, comprenant la préparation et l'identification du patient, le prélèvement de l'échantillon primaire, l'acheminement jusqu'au laboratoire et au sein du laboratoire pour le prétraitement de l'échantillon avant l'analyse (39). Cette étape constitue l'une des phases les plus critiques où est retrouvée la majeure partie des causes d'un résultat non conforme.

Dans cette phase, notre rôle a été axé sur la gestion documentaire et l'élaboration de la maîtrise des risques. En effet, le PBH a entamé sa démarche d'accréditation depuis maintenant 6 ans, et de nombreux documents et moyens concernant la phase préanalytique déjà mis en place ont pu être utilisés pour ce travail. A titre d'exemple, nous pouvons citer les documents concernant l'identitovigilance, ou les prélèvements (type de contenant, volume à prélever, préparation du patient, délai et température d'acheminement) référencés dans le manuel de prélèvements (UBILAB) disponible sur l'intranet du CHU. D'autres éléments en lien avec la phase préanalytique avaient également été traités préalablement à notre travail. C'est le cas du système informatique avec les procédures dégradées associées, la métrologie (cartographie des enceintes, surveillance des centrifugeuses, contrôle des pneumatiques par exemple), la gestion des compétences du personnel du secteur préanalytique.

Ainsi, pour l'étape préanalytique des examens sérologiques de la toxoplasmose, nous avons pu vérifier que l'ensemble de nos pratiques étaient conformes aux documents opératoires déjà rédigés. De plus la gestion documentaire à cette étape n'a pas nécessité de rédaction de nouveaux documents.

L'analyse des risques montre que la phase préanalytique comprend un grand nombre d'éléments à maîtriser. Pour chacun des 5 chapitres qui composent les «5 M» (Matières, Milieu, Matériel, Méthodes, Main d'œuvre), nous avons ainsi défini les points critiques et les éléments à maîtriser. Après avoir évalué pour chacun d'eux l'échelle de criticité (**Annexe 2**), nous avons ensuite établi les différents moyens mis en œuvre dans le laboratoire pour maîtriser ces risques, avec les références dans KaliLab des documents cités.

A titre d'exemple, nous présentons dans le **tableau 13** la partie « Matières » de la maîtrise des risques pour le dosage des IgG antitoxoplasmiques sur l'Architect i2000. L'ensemble du tableau de maîtrise des risques pour cette analyse est présenté en **annexe 5**.

Nous pouvons illustrer notre démarche en prenant l'exemple d'un point critique dans cette partie « Matières ». Ainsi, « Nature et volume de l'échantillon » constituent un point critique ayant un score à 3 sur l'échelle de criticité. Afin de maîtriser ce risque, plusieurs règles doivent être respectées. Le préleveur doit se référer aux instructions du manuel de prélèvements UBILAB, et par ailleurs, la conformité du prélèvement doit être contrôlée par les techniciens de la RCEB du PBH en se référant au Document Opérationnel (DO) « Critères d'acceptation et de rejet des échantillons » référencé dans le logiciel KaliLab sous l'appellation BIO-90350-DO-001. En cas de non-conformité, le technicien devra alors se reporter au document « Gestion et enregistrement d'une non-conformité préanalytique » (BIO-87300-DO-002).

5M	Points critiques	Echelle de criticité	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai) / Documents (procédure, instruction, enregistrement) avec les références du SMQ du laboratoire
Matières (échantillons)	Préanalytique Identité	4	Formation et information du personnel	<b>Instructions dans le manuel de prélèvement UBILAB</b> <b>Réception/Enregistrement des prélèvements</b> (BIO-70130-PR-001) <b>Réception et saisie des demandes en provenance du CH de Saumur</b> (BIO-70130-DO-159) <b>Gestion de l'IPP des Capucins dans GLIMS</b> (BIO-70130-DO-092) <b>Vérification de l'enregistrement manuel des prescriptions</b> (BIO-70130-DO-191) <b>Prise en charge et enregistrement des demandes de Toxoplasmose</b> (BIO-70130-DO-145) En cas de panne du logiciel de prescription connectée, se référer au document <b>Procédure dégradée : presco et pneumatique</b> (BIO-87300-DE-526)
	Préanalytique Préparation du patient	3	Information des patients et préleveurs	<b>Instructions dans le manuel de prélèvement UBILAB</b>
	Préanalytique Type de contenants	2	Formation (CPCS en interne) et information des préleveurs, et contrôle à réception	<b>Instructions dans le manuel de prélèvement UBILAB</b> <b>Critères d'acceptation et de rejet des échantillons</b> (BIO-90350-DO-001) En cas de contenant non adapté, se référer au document <b>Gestion et enregistrement d'une non-conformité préanalytique</b> (BIO-87300-DO-002)
	Préanalytique Nature et volume de l'échantillon	3	Contrôle à réception	<b>Instructions dans le manuel de prélèvement UBILAB</b> <b>Réception/Enregistrement des prélèvements</b> (BIO-70130-PR-001) Si le prélèvement n'est pas conforme, se référer au document <b>Gestion et enregistrement d'une non-conformité préanalytique</b> (BIO-87300-DO-002)
	Préanalytique Délai et température avant traitement analytique	3	Information des préleveurs et gestion logistique (coursiers, pneumatiques)	<b>Instructions dans le manuel de prélèvement UBILAB</b> <b>Réception/Enregistrement des prélèvements</b> (BIO-70130-PR-001) <b>Prise en charge des prélèvements arrivés en urgence</b> (BIO-70130-DO-043) <b>Liste des examens d'urgence</b> (BIO-87300-DO-011) Si les conditions ne sont pas respectées, se référer au document <b>Gestion et enregistrement d'une non-conformité préanalytique</b> (BIO-87300-DO-002) En cas de panne des pneumatiques SWISSLOG, se référer au document <b>Procédure dégradée en cas de panne du pneumatique SWISSLOG</b> (BIO-70130-DO-068)
	Préanalytique Prétraitement : centrifugation, aliquotage	3	Formation du personnel et traitement préanalytique	<b>AU800 : Utilisation</b> (BIO-70130-DO-048) En cas de panne de l'AU800, se référer au document <b>Procédure dégradée : Automate AU800</b> (BIO-70130-DO-162) <b>Gestion des tubes non aliquotés sur Automate 800</b> (BIO-70130-DO-143) et <b>Gestion des échantillons infectieux sur l'ilot PTA</b> (BIO-90490-DO-103)
	Préanalytique Interférences	3	Formation des préleveurs	<b>Instructions dans le manuel de prélèvement UBILAB</b> <b>Instruction ordre de prélèvement des tubes</b> (BIO-87300-DO-041)
	Préanalytique Perte d'un échantillon	3	Traçabilité et formation du personnel	<b>Suivi de la traçabilité des échantillons à la RCEB</b> (BIO-70130-PR-002) <b>Liste des "en cours"</b> réalisée en fin de journée par les techniciens concernés par l'Architect i2000 (Cf. fiche d'habilitation des techniciens à l'Architect i2000)

DE : Document d'Enregistrement ; FO : FORMulaire d'enregistrement ; IPP : Identifiant Permanent du Patient ; PR : PROCédure.

**Tableau 13** Extrait de la maîtrise des risques du test Toxo IgG® illustrant la phase préanalytique d'un des 5 M « Matières »

## 2.2. Phase analytique

Dans un premier temps nous présenterons les résultats obtenus pour l'ensemble des tests réalisés dans le cadre de la construction des dossiers de vérification de méthodes. Et dans un second temps, nous nous attacherons plus particulièrement aux actions réalisées suite aux constats soulevés lors de l'état des lieux des techniques auditées.

### 2.2.1. Dossiers de vérification de méthodes des tests quantitatifs (SH FORM 43)

Nous avons rédigé des dossiers de vérification de méthodes pour les tests quantitatifs de détection des IgG (Toxo IgG®) et des IgM (Toxo IgM®) antitoxoplasmiques sur l'automate Architect i2000. Pour illustrer chacun des tests qui ont fait l'objet d'un essai sur site, ou d'une étude bibliographique, nous présenterons à titre d'exemple les résultats obtenus pour établir le dossier de vérification de méthode du test Toxo IgG®. Pour le dossier de vérification de méthode du test Toxo IgM®, les résultats des essais sur site sont présentés en **annexe 6**.

#### a) Tests qui ont fait l'objet d'un essai sur site

##### **Répétabilité :**

Dans cet exemple du test Toxo IgG®, nos résultats sont conformes au CV proposé par le fournisseur Abbott Diagnostics et au CV retenu par l'UF qui a été fixé à 15 %, en l'absence de recommandations de sociétés savantes ou de publications dans ce domaine (**Tableau 14**). En effet, avec une valeur de CV maximum à 15 %, il n'y a aucun impact sur l'interprétation des résultats. Il convient de noter que le CV à 7,5 % affiché par le fournisseur a été calculé à partir de la formule : **CV répétabilité = CV reproductibilité x 0,75** (162).

REPETABILITE								
Unité	UI/mL							
Date	CIQ positif (27/01/17) et CIQ négatif (03/02/17)							
Echantillons / Niveaux	n	m	σ	CV (%)	CV (%) retenu par le laboratoire	CV (%) fournisseur	Source	Conclusion
CIQ positif	30	6,06	0,18	2,95	15	7,50	SFBC	VALIDE
CIQ négatif	30	0,00	0,00	NA	NA	NA	SFBC	-

NA : non applicable ; n : nombre d'échantillon ; m = moyenne ; σ = écart-type ; CV : coefficient de variation ; SFBC : Société française de biologie clinique.

**Tableau 14** Résultats des CV obtenus pour l'étude de la répétabilité, calculés à partir de la moyenne et de l'écart-type des CIQ positifs et négatifs du test Toxo IgG® sur l'Architect i2000

### **Fidélité intermédiaire :**

Pour le test Toxo IgG®, les résultats que nous avons obtenus lors de l'évaluation de la fidélité intermédiaire effectuée à partir des CIQ positifs et négatifs sont présentés dans le **tableau 15**. Le CV indiqué par le fournisseur Abbott Diagnostics dans sa notice est  $\leq 10\%$  pour des valeurs comprises entre 3 et 120 UI/mL. De même que pour la répétabilité, il n'y a pas de recommandations de sociétés savantes ou de publications pour la valeur limite de reproductibilité, et le laboratoire a donc fixé un CV maximum à 15 %, considérant qu'avec cette valeur de CV, il n'y a aucun impact sur l'interprétation des résultats. Nos résultats sont donc conformes.

En ce qui concerne le CV du contrôle négatif, il n'est pas interprétable. En effet, nous nous trouvons face à des valeurs proches de zéro. Dans ce cas, les variations sont considérées comme non significatives et n'ont aucun impact sur l'interprétation des résultats. Par contre, du fait de ces variations, le calcul du CV peut montrer une valeur élevée mais qui n'a donc aucune signification.

Enfin, nous avons également rappelé dans l'argumentaire qui accompagne l'évaluation de la fidélité intermédiaire, les recommandations de la HAS et du CNR de la toxoplasmose lorsque des sérums successifs doivent être analysés. Ainsi, dans cette situation, notamment lors de la surveillance sérologique des femmes enceintes afin d'apprécier l'évolution des IgG et de dater l'infection, les échantillons de sérum doivent être analysés « en parallèle », c'est-à-dire que le ou les sérum(s) antérieur(s) sont réanalysé(s) simultanément avec le nouvel échantillon dans le même système analytique et dans la même série.

FIDÉLITE INTERMÉDIAIRE								
Unité	UI/mL							
Période	Du 12/10/18 au 10/11/18							
Echantillons / Niveaux	n	m	$\sigma$	CV (%)	CV (%) retenu par le laboratoire	CV (%) fournisseur	Source	Conclusion
CIQ positif	30	8,66	0,33	3,79	15	$\leq 10$	SFBC	VALIDE
CIQ négatif	30	0,03	0,05	NA	NA	NA	SFBC	-

NA : non applicable ; n : nombre d'échantillon ; m = moyenne ;  $\sigma$  = écart-type ; CV : coefficient de variation ; SFBC : Société française de biologie clinique.

**Tableau 15** Résultats des CV obtenus pour l'étude de la fidélité intermédiaire calculés à partir de la moyenne et de l'écart-type des CIQ positifs et négatifs du test Toxo IgG® sur l'Architect i2000

### **Exactitude :**

L'ensemble de nos résultats obtenus à partir des sérums qui nous ont été fournis par le CTCB, nous permet de conclure à une exactitude de notre technique en référence aux limites fixées par le CTCB (**Tableau 16**). La conformité de nos EEQ est évaluée par rapport à un z-score représentant le nombre d'écart-types pour lequel le résultat du laboratoire s'écarte au-dessus (signe positif) ou au-dessous (signe négatif) de la valeur attendue, par un calcul statistique. Ainsi, un résultat est conforme lorsque la valeur absolue de ce score ( $|z\text{-score}|$ ) se situe entre 0 et 2.

Concernant l'EEQ 1811, l'abréviation NA pour « Non Applicable » qui apparaît dans ce **tableau 16** signifie que le résultat de cet échantillon n'a pas pu être exploité dans ce cadre, le résultat attendu étant « absence d'IgG ».

EXACTITUDE						
Unité	UI/mL					
Période d'essai	Année 2018					
		Laboratoire		Groupe de pairs		
EEQ	LOT	Niveau de contrôle	Valeur du laboratoire	Nombre de laboratoires	Cible	z-score
CTCB 181 Sérum 1811	181	1	NA	135	NA	NA
CTCB 181 Sérum 1812	181	1	69	127	59,10	-0,288
CTCB 182 Sérum 1821	182	1	87	129	88,10	-0,265
CTCB 182 Sérum 1822	182	1	64	127	65,50	-0,508
CTCB 183 Sérum 1831	183	1	10	130	9,30	0,833
CTCB 183 Sérum 1832	183	1	54	123	59,90	-0,157
Niveau	Objectif analytique		Source	Conclusion		
1	0 ≤  z-score  ≤ 2		CTCB	VALIDE		

**Tableau 16** Évaluation de l'exactitude du test Toxo IgG® sur l'Architect i2000

#### **Incertitude de mesure (IM) :**

Au laboratoire du CHU d'Angers, la méthode de détermination de l'IM est commune au PBH, selon la procédure référencée dans KaliLab sous l'appellation BIO-87300-PR-016 (S1-Main d'œuvre). Elle est ainsi calculée à partir des EEQ et des CIQ à l'aide de la formule présentée dans le **tableau 17**.

Dans notre travail, nous avons donc estimé cette incertitude à l'aide des résultats des CIQ et des EEQ analysés sur l'année 2018. Dans l'exemple que nous donnons du calcul d'incertitude pour le dosage des IgG antitoxoplasmiques par le test Toxo IgG® sur l'Architect i2000, le résultat obtenu n'est pas interprétable du fait des valeurs très différentes des cibles de notre CIQ, à 8,6 UI/mL, et des cibles des échantillons positifs d'EEQ qui nous ont été adressés pour l'année 2018 (**Tableau 17**).

En lien avec cette notion d'IM, nous avons par ailleurs rappelé dans le SH FORM les conditions analytiques qui doivent être respectées dans le cadre du sérodiagnostic afin de réduire cette incertitude. Ainsi, dans le cadre d'une grossesse, afin de dater correctement l'infection toxoplasmique par rapport à la date de début de grossesse, le/les échantillon(s) antérieur(s) doi(ven)t d'être réanalysé(s) dans la même série et par le même système analytique.

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input type="checkbox"/> ; calcul <input checked="" type="checkbox"/>		
Unité	UI/mL	
Période d'évaluation CIQ	Du 12/10/18 au 10/11/18	
Période d'évaluation CIQ externe ou EEQ	Année 2018	
	<b>Incertitudes calculées</b>	<b>Exigence de performances</b>
Mode de calcul (SH GTA 14)	$u(C) = \sqrt{\left(\frac{CV \times m}{100}\right)^2 + \left(\frac{\bar{E}}{\sqrt{3}}\right)^2 + \hat{\sigma}_E^2}$	
Quantification de l'incertitude (niveau 1)	NA	NA
Quantification de l'incertitude (niveau 2)	8,66 ± 11,67 UI/mL	NA

NA : non applicable. La quantification de l'incertitude appliquée à la moyenne des CIQ positifs obtenue lors de la fidélité intermédiaire, est rendue dans ce document en valeur absolue ± U où U correspond à l'incertitude élargie soit 2 x u (C) en UI/mL.

**Tableau 17** Évaluation de l'incertitude de mesure du test Toxo IgG® sur l'Architect i2000

### **Comparaison de méthodes :**

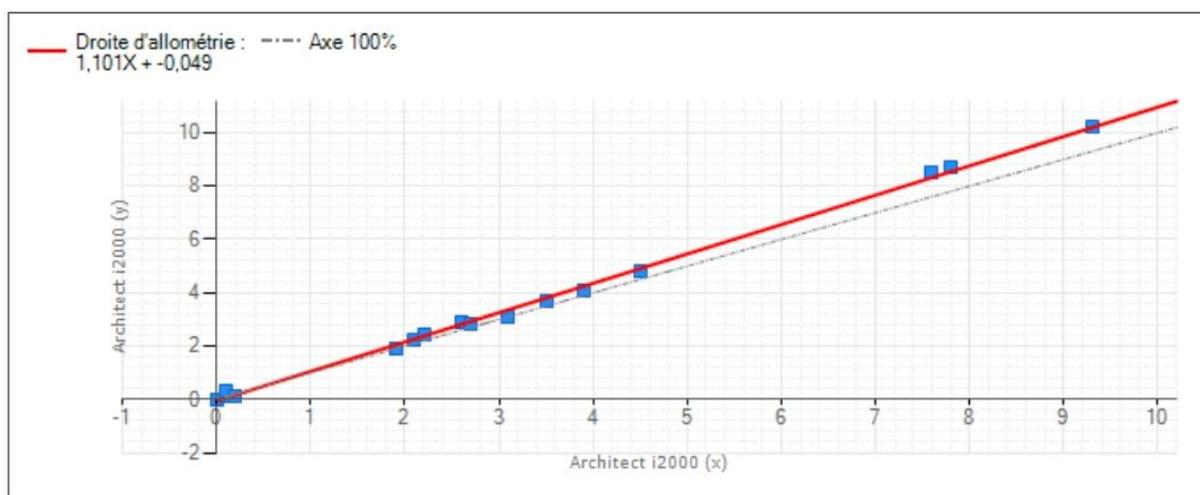
Cette comparaison a concerné la même méthode CMIA sur 2 automates Architect i2000 installés successivement sur le PTA, le premier ayant été introduit en 2011 lors de la mise en service du PTA, et remplacé ensuite par son homologue début avril 2017, suite à l'introduction d'une chaîne automatisée (Siemens).

Pour cette comparaison de méthodes, nous avons réalisé des tests comparatifs sur les 2 automates, et analysé également la bibliographie sur ce thème. Suite à l'analyse de 30 échantillons de sérum (17 négatifs et 13 positifs) sur les 2 automates, nous observons une bonne corrélation entre les résultats du test Toxo IgG® obtenus sur l'ancien et le nouvel automate Architect i2000 comme illustrée par les 2 graphiques des **figures 27 et 28**. Aucun point déviant n'a été constaté. Nous concluons à une excellente concordance entre les résultats obtenus par la même technique sur les 2 automates.

L'étude bibliographique que nous avons réalisée par ailleurs montre qu'il existe une bonne corrélation entre les résultats du dosage des IgG antitoxoplasmiques obtenus sur l'Architect i2000, et ceux obtenus par d'autres méthodes immunoenzymatiques automatisées telles que celles utilisées sur l'automate AxSYM (Abbott Diagnostics), VIDAS (bioMérieux) ou encore LIAISON (DiaSorin) (**Tableau 18**).

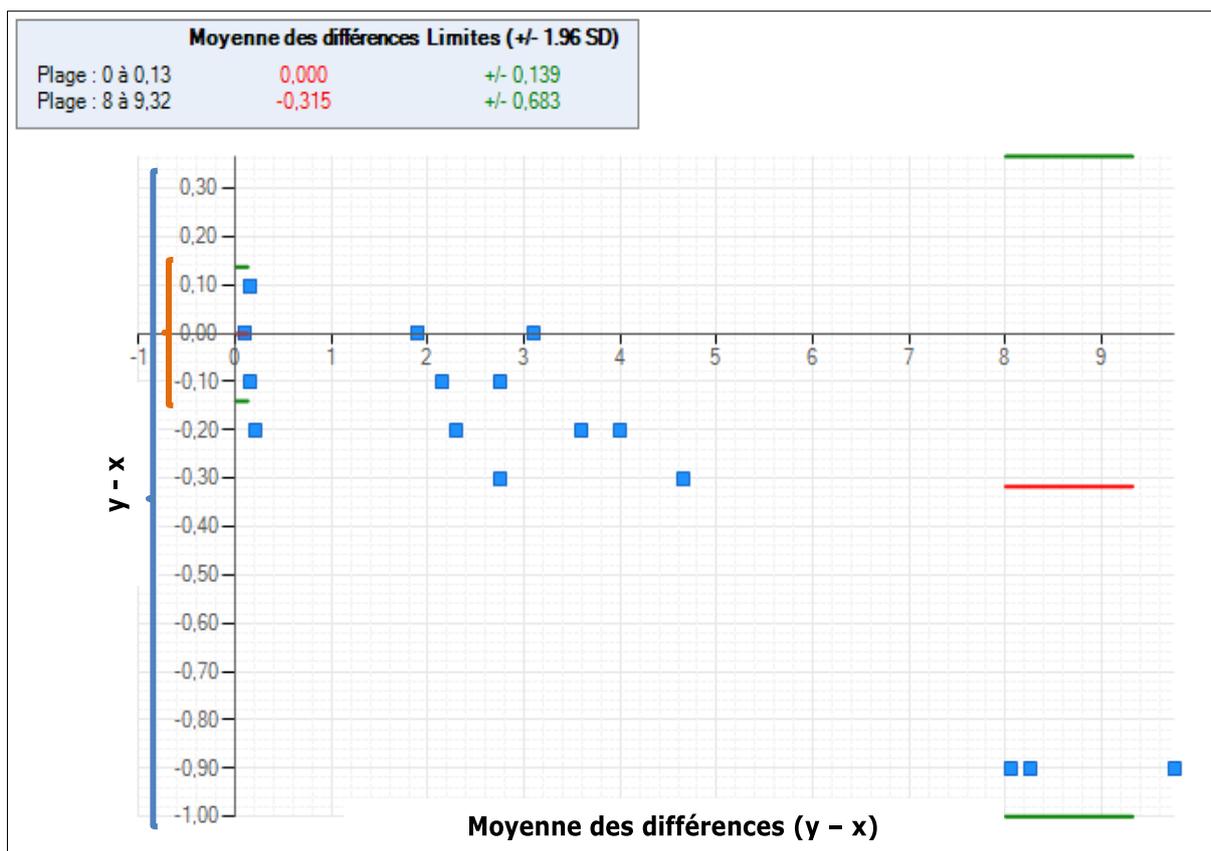
COMPARAISON DE METHODES	
Unité	IgG (UI/mL)
Date	03/2017
Données bibliographiques	<p><b>Comparaison :</b>            Architect et AxSYM Toxo IgG (101)            Architect, VIDAS et AxSYM Toxo IgG (163)            Architect, VIDAS et LIAISON Toxo IgG (164)</p> <p><b>Nombre de mesures :</b>            2464 sérums de femmes enceintes, donneurs de sang et patients hospitalisés (101)            730 sérums de femmes enceintes (163)            631 sérums issus de femmes enceintes et de nouveau-nés (164)</p> <p><b>Conclusion :</b> Concordance            Architect et VIDAS = 95,2 % (101)            Architect et AxSYM = 95,3 % et concordance Architect et VIDAS = 93,8 % (163)            Architect et VIDAS = 95,2 % (164)</p>
Nombre de mesures	30
Equation de la droite de régression	$Y = 1,101X - 0,049$
Diagramme des différences et/ou des rapports	Nombre de déviants = 0

**Tableau 18** Étude de comparaison de méthode du test Toxo IgG® entre l'ancien (X) et le nouvel (Y) Architect i2000



Représentation graphique de la corrélation des résultats obtenus à partir des 30 sérums pour le dosage des IgG antitoxoplasmiques sur l'ancien et le nouvel Architect i2000, illustrée par la droite d'allométrie en rouge d'équation  $Y = 1,101X - 0,049$ . En abscisses figurent les résultats obtenus sur l'ancien Architect i2000 (x) en UI/mL. En ordonnées figurent les résultats obtenus sur le nouvel Architect i2000 (y) en UI/mL.

**Figure 27** Droite de régression des moindres rectangles pour le test Toxo IgG® sur l'Architect i2000



Représentation graphique de la dispersion des résultats obtenus à partir des 30 sérums analysés sur l'ancien et le nouvel Architect i2000. En abscisses figure la moyenne des différences obtenues entre les résultats sur le nouvel (y) et l'ancien (x) Architect i2000. En ordonnées figure la différence obtenue entre les résultats sur le nouvel (y) et l'ancien (x) Architect i2000. Les limites pour lesquelles 95 % des différences seront susceptibles de se trouver sont définies par une accolade orange pour les points qui se situeront dans l'intervalle de mesure [0 ; 0,13], et bleue pour les points qui se situeront dans l'intervalle de mesure [8 ; 9,32].

**Figure 28** Graphique de Bland et Altman du test Toxo IgG® sur l'Architect i2000

## b) Tests qui ont fait l'objet d'une étude bibliographique

### Sensibilité et spécificité analytique :

Une étude réalisée par le groupe Sérologie du CNR de la toxoplasmose a permis d'évaluer les performances analytiques de 9 techniques immunoenzymatiques automatisées, dont la méthode CMIA sur l'Architect i2000. Les résultats montrent une sensibilité de 99,6 % et une spécificité de 99,5 % dans la détection des IgG antitoxoplasmiques sur l'Architect i2000 (103). D'autres études montrent des performances similaires (**Tableau 19**). Enfin, la notice fournisseur indique une sensibilité et spécificité analytique de 99,7 % et 99,6 % respectivement pour ce test Toxo IgG® sur l'Architect i2000.

Références	Effectifs	Sensibilité	Spécificité
Sickinger, E., et al., 2008 (101)	2464 sérums de femmes enceintes, donneurs de sang et patients hospitalisés	99,7 %	99,6 %
Gay-Andrieu, F., et al., 2009 (163)	730 sérums de femmes enceintes	97,5 %	99,1 %
Murat, JB., et al., 2013 (164)	500 sérums de femmes enceintes	93,8 %	99,5 %

**Tableau 19** Sensibilité et spécificité issues des données de la littérature pour le test Toxo IgG® sur l'Architect i2000

Par ailleurs, pour l'évaluation des interférences, de la robustesse de la technique, de la stabilité des réactifs, et pour la définition des intervalles de référence, seules les références bibliographiques citées dans la notice du fabricant ont été rapportées dans le SH FORM 43.

### 2.2.2. Dossiers de vérification des tests qualitatifs (SH FORM 43)

Nous avons rédigé des dossiers de vérification de méthodes pour les tests qualitatifs du WB (TOXO II IgG® et TOXOPLASMA WB IgG IgM®), de la technique d'immunocapture - agglutination (Toxo-ISAGA® et Toxo-ISAGA IgA®), et du test d'agglutination au latex (PASTOREX TOXO®). Pour chacun des tests, nous avons réalisé des essais sur site, et une étude bibliographique.

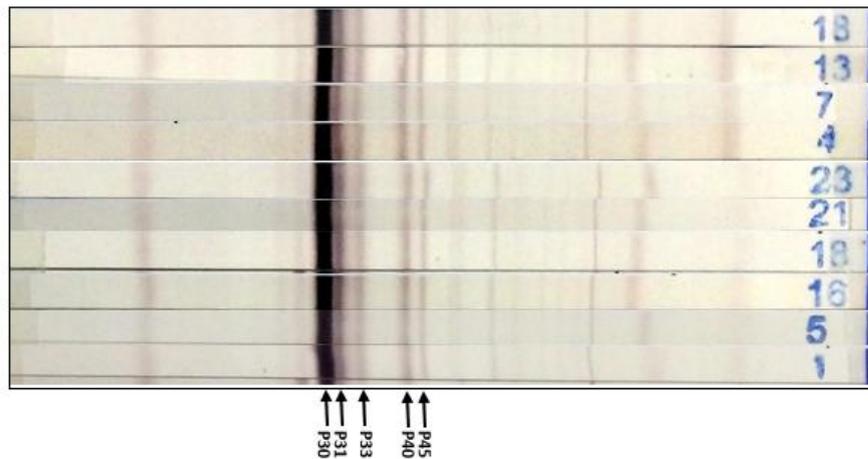
Pour illustrer cette partie de notre travail, nous présenterons à titre d'exemple les résultats obtenus pour établir le dossier de vérification de méthode du test TOXO II IgG® sur l'automate EUROBlot Master. Pour le dossier de vérification de méthode des autres tests, les résultats des essais sur site sont présentés en **annexe 7**.

#### a) Tests qui ont fait l'objet d'un essai sur site

##### **Variabilité interopérateurs :**

Les résultats du test de variabilité interopérateurs sont présentés dans la **figure 29**. Nous constatons qu'il n'y pas de différences dans le résultat de l'analyse par WB du contrôle positif en fonction de l'opérateur, avec la présence des 5 bandes spécifiques (p45, p40, p33, p31, et p30) sur les 10 pistes. Nous avons donc conclu à l'absence de variabilité interopérateurs.

**Opérateurs évalués :** GAM et NAC



Dans cette figure, les abréviations GAM et NAC correspondent aux initiales des techniciennes qui ont réalisé ces tests. Le test WB a été réalisé par GAM pour les pistes 7, 16 et 1 et par NAC pour les deux pistes 18, la piste 13, 4, 23, 21, et 5. Les 5 bandes spécifiques du contrôle positif sont indiquées par des flèches.

**Figure 29** Évaluation de la variabilité interopérateurs du test TOXO II IgG® sur l'EUROBlot Master

**Exactitude :**

Pour le test TOXO II IgG®, l'UF de Parasitologie - Mycologie du CHU d'Angers a été désignée par le CNR comme laboratoire organisateur du CIL en 2018. Elle a eu ainsi la charge d'assurer la gestion des différentes étapes pour les laboratoires participants au niveau national, avec la sélection des échantillons pour ce CIL, leur qualification par différentes techniques, leur aliquotage ainsi que les envois par courrier, et enfin la diffusion des résultats et des attestations de participation. En 2018, 25 laboratoires s'étaient inscrits à ce CIL. Nous avons observé 100 % de résultats conformes pour les 25 laboratoires participants à partir de 5 des 6 échantillons du CIL. Pour un échantillon du CIL, un laboratoire a rendu un résultat positif, les 24 autres laboratoires ayant rendu un résultat négatif correspondant au résultat attendu.

En 2018, pour le test TOXO II IgG® l'UF de Parasitologie - Mycologie du CHU d'Angers n'a pas participé à un CIL autre que celui qu'il organisait dans le cadre du CNR de la toxoplasmose. Toutefois, du fait de la concordance des résultats attendus avec ceux qui ont été rendus par les laboratoires participants qui constituent ici le groupe de pairs, cela permet de valider en retour l'exactitude de nos résultats comme indiqué dans le **tableau 20**.

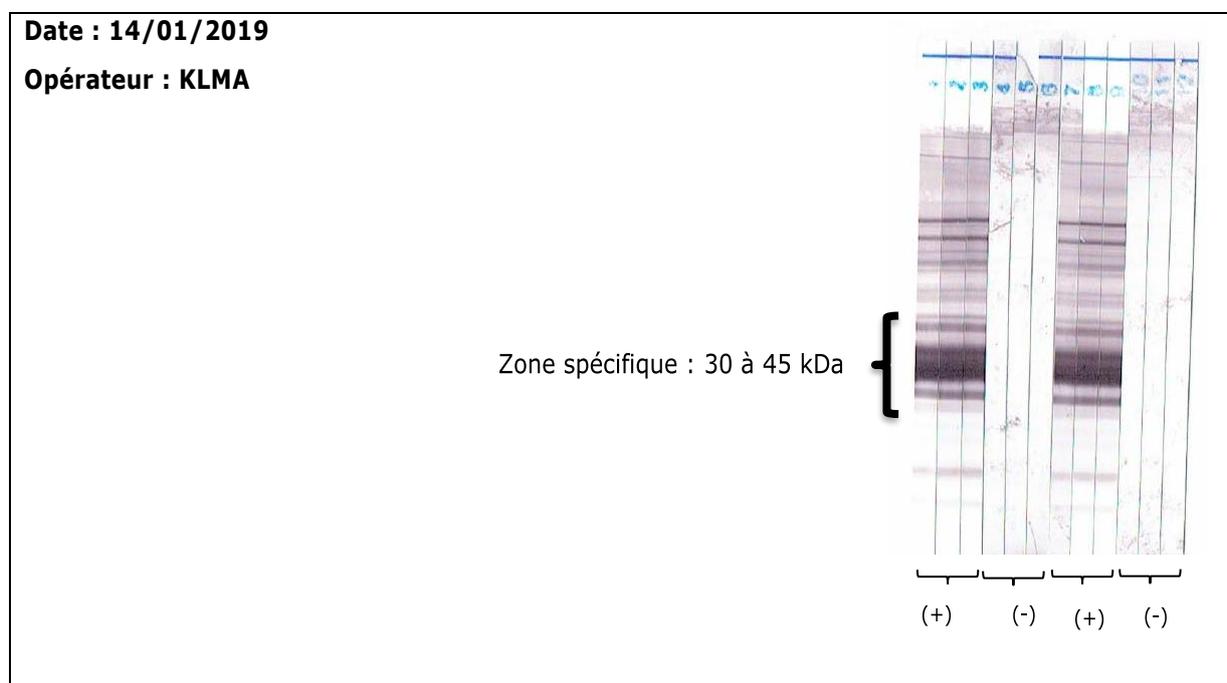
Echantillons	Cible (résultat de l'UF de Parasitologie - Mycologie du CHU d'Angers)	Résultats des laboratoires participants (groupe de pairs) en % de bonnes réponses
1811	+ (Bandes p30, p31, p33, p45)	100 %
1812	- (Aucune bande)	100%
1821	+ (Bandes p30, p31, p33, p40)	100%
1822	- (Aucune bande)	100%
1831	- (Aucune bande)	96%
1832	+ (Bandes p30, p31, p33, p45)	100%

**Tableau 20** Évaluation de l'exactitude du test TOXO II IgG® utilisé au sein de l'UF par comparaison des résultats attendus à ceux rendus par les laboratoires participants (groupe de pairs)

### **Contamination :**

Les résultats de l'évaluation du risque de contamination à partir d'une série de 12 échantillons de sérum testés en alternant les sérums positifs et négatifs, sont présentés dans la **figure 30**.

Pour les sérums positifs, les 5 bandes spécifiques sont bien présentes sur les pistes, et aucune bande n'est présente sur les pistes sur lesquelles ont été déposés les sérums négatifs. Nous concluons donc à l'absence de contamination interéchantillons pour le test Toxo II IgG®.



Dans cette figure, l'abréviation KLMA correspond à la personne qui a réalisé ce test. La zone spécifique où doivent être présentes au moins 3 bandes parmi les 5 pour définir la positivité du test est indiquée par l'accolade sur la figure. De même, pour le sérum négatif (-) et le sérum positif (+) analysés 3 fois consécutivement l'un après l'autre.

**Figure 30** Étude du risque de contamination pour le test Toxo II IgG® sur l'EUROBlot Master

## **b) Tests qui ont fait l'objet d'une étude bibliographique**

### **Sensibilité et spécificité analytique et comparaison de méthodes :**

La notice fournisseur nous renseigne sur la sensibilité et la spécificité à partir d'une étude menée sur 569 sérums analysés par 4 techniques différentes (117). Les performances du test LDBIO TOXO II IgG<sup>®</sup> sont ainsi comparées à celles du dye test (méthode de référence), et à celles de 2 autres techniques immunoenzymatiques automatisées de dosage des IgG antitoxoplasmiques, sur VIDAS et sur COBAS.

Cette étude montre d'une part que le test LDBIO TOXO II IgG<sup>®</sup> possède une sensibilité analytique de 99 %. En début d'infection toxoplasmique, ce test est capable de détecter plus précocement la synthèse d'IgG, comparativement aux 2 techniques immunoenzymatiques évaluées dans cette étude. Par ailleurs, selon cette étude dans laquelle étaient également analysés des sérums de patients présentant des infections virales ou parasitaires autres que la toxoplasmose, la spécificité analytique de la trousse LDBIO TOXO II IgG<sup>®</sup> est de 100 %.

Une deuxième étude a comparé le test TOXO II IgG<sup>®</sup> avec 2 autres techniques, l'IFI et une technique d'immunoanalyse (Platelia Toxo IgG<sup>®</sup>) (165). Elle a été menée sur 39 sérums de femmes enceintes présentant un profil sérologique avec un taux d'IgG équivoque ou négatif obtenu sur l'automate Elecsys (Roche). Cette étude montre que parmi ces 3 techniques, le western-blot TOXO II IgG<sup>®</sup> est le test qui permet de détecter le plus précocement les IgG lors d'une séroconversion toxoplasmique.

Les excellentes performances de la trousse LDBIO TOXO II IgG<sup>®</sup> justifient son utilisation comme technique de confirmation en cas de taux faible ou équivoque des IgG antitoxoplasmiques par technique de dépistage sur l'automate Architect i2000. Du fait de sa précocité de détection des IgG en cas de séroconversion toxoplasmique, il est également indiqué face à un profil sérologique de dépistage sur Architect associant des IgG négatives et des IgM positives.

Par ailleurs, pour l'évaluation des interférences, de la robustesse de la technique, de la stabilité des réactifs, et de la définition des intervalles de référence, seules les données bibliographiques citées dans la notice du fabricant ont été rapportées dans le SH FORM 43.

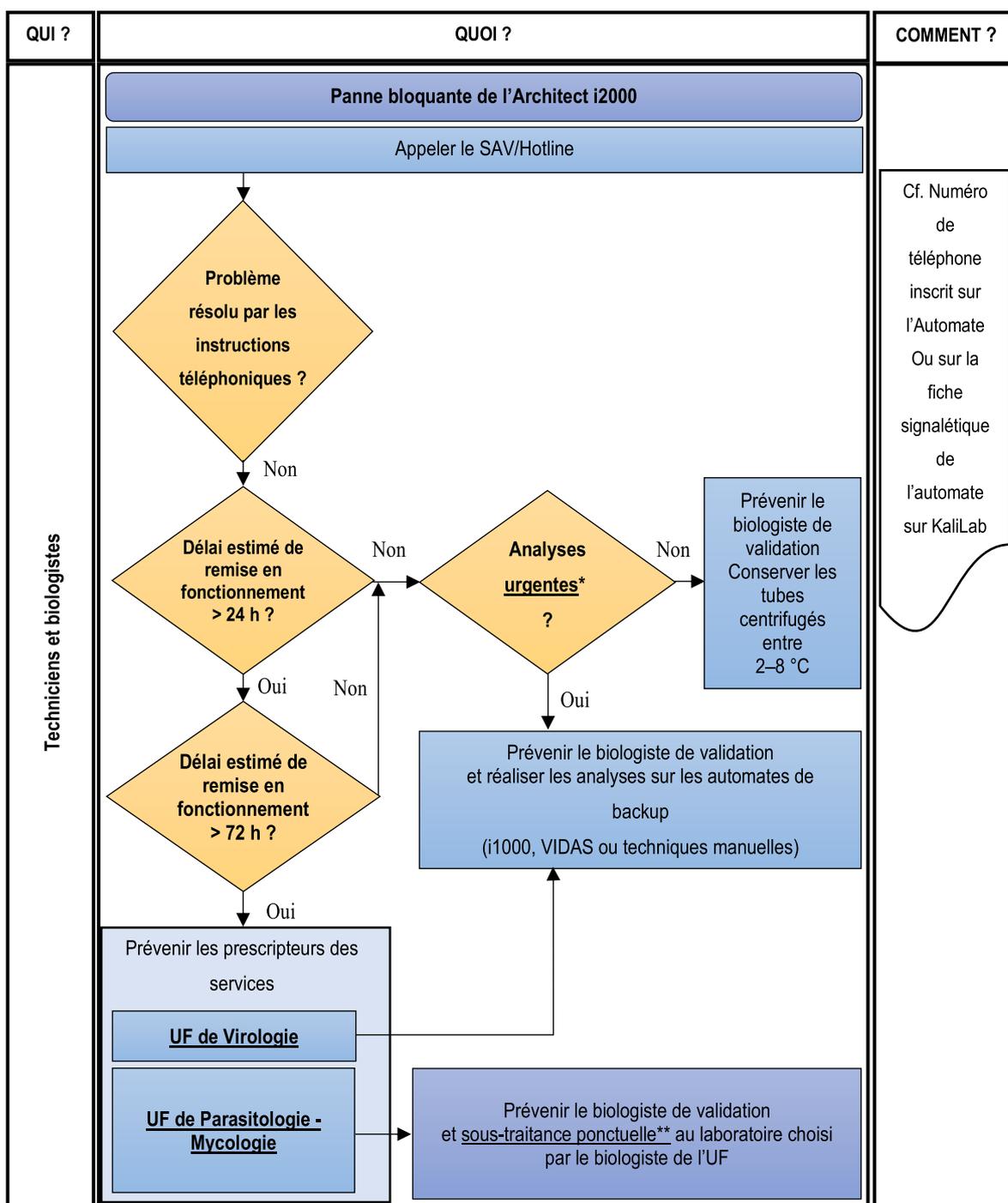
### **2.2.3. Procédures dégradées**

Lorsque nous avons entamé ce travail, les solutions dégradées pour l'étape sérologique de dépistage sur l'automate Architect i2000 et pour l'étape de confirmation par WB sur l'automate EUROBlot Master n'étaient pas encore formalisées et aucun document n'avait alors été rédigé à ce sujet dans le logiciel KaliLab. Nous les avons donc élaborés en tenant compte d'un certain nombre de paramètres : alternatives techniques disponibles au sein des UF, caractère urgent de l'analyse et délai de rendu des résultats, stabilité des échantillons, coût, et contraintes éventuelles pour le personnel.

Ainsi, pour la sérologie de la toxoplasmose qui ne constitue pas une urgence diagnostique, un automate backup n'était pas justifié. En effet, cela aurait nécessité un maintien d'un kit de réactif à bord de cet automate, la nécessité d'analyser des CIQ et EEQ, et une comparaison de méthodes. Contrairement à certaines sérologies réalisées en urgence, notamment des sérologies virales dans des contextes tels qu'un Accident d'Exposition au Sang (AES), ou un bilan prégreffe lors de Prélèvements Multi Organes (PMO), il n'y a pas de situation qui nécessite la réalisation d'une sérologie de la toxoplasmose en urgence. A ce sujet, rappelons que la sérologie de la toxoplasmose fait partie du bilan prégreffe, en particulier afin d'évaluer le risque et d'adapter la conduite à tenir selon le statut immunitaire du donneur et du receveur, mais son résultat ne conditionne pas la greffe elle-même, et elle peut donc être réalisée sans urgence.

D'autre part, en cas de panne sur l'automate Architect i2000, l'organisation de l'assistance technique de la société Abbott Diagnostics permet le plus souvent une intervention rapide et un dépannage en moins de 48 heures, compatible avec notre délai de rendu du résultat qui a été fixé à 72 heures dans UBILAB pour l'étape de dépistage d'une sérologie de toxoplasmose. Enfin, la mise en place d'une technique de secours, par exemple sur le second automate Architect i1000, nécessiterait l'achat de réactifs, de contrôles et de calibrateurs pour être à disposition permanente en cas de panne de l'automate Architect i2000, ce qui engendrerait un coût important pour un événement susceptible de se présenter très rarement. C'est pourquoi, concernant la sérologie de toxoplasmose de dépistage sur l'Architect i2000, il n'est pas apparu opportun aux biologistes de l'UF de mettre en place une technique de secours. La solution qui a donc été retenue est ici la sous-traitance en cas de panne prolongée de l'automate, au-delà de 72 heures. Nous avons ainsi rédigé une procédure dégradée intitulée « Procédure dégradée Architect i2000 » qui comporte un logigramme présentant la conduite à tenir en cas de panne sur l'Architect i2000 et que nous présentons en **figure 31**. Ce document a été validé et inséré dans KaliLab sous la référence BIO-90490-DO-182.

Pour les analyses par technique WB réalisées sur l'EUROBlot Master, et qui constituent des techniques complémentaires dans la stratégie de diagnostic sérologique de la toxoplasmose, la technique manuelle réalisée dans l'UF avant l'acquisition de cet automate, est proposée comme méthode de secours en cas de panne de l'EUROBlot Master. La technique est alors effectuée conformément à la notice du fournisseur en cas d'impossibilité d'utiliser l'automate. De même que pour l'Architect i2000, nous avons rédigé le document correspondant à cette solution dégradée, et il a été inclus dans KaliLab sous l'appellation « BIO-70180-DO-152 ».



**\*Les urgences** : les urgences concernent essentiellement les AES, les sérologies de PMO, les hépatites aiguës, l'antigène HBs chez la femme enceinte, et autres urgences à l'appréciation du biologiste.

**\*\*Sous-traitance ponctuelle** : elle s'entend comme une incapacité temporaire pour le PBH à réaliser des analyses et/ou émettre des comptes-rendus suite à une panne du système analytique.

- ⇒ **Le biologiste** responsable choisira le laboratoire « sous-traitant » en fonction du type d'analyse, du domaine de compétences du laboratoire, et du nombre d'échantillons à envoyer.
- ⇒ **Les techniciens** de Sérologies parasitaires et de Virologie procéderont à l'aliquotage des tubes lorsqu'il y aura des prélèvements partagés entre les 2 UF.

**Le personnel de la RCEB** (poste des envois extérieurs) préparera les envois après réception des échantillons/ aliquotes, associés à la liste de travail, il procédera à l'enregistrement sur le Système d'Information du Laboratoire (SIL), au conditionnement et à l'acheminement au sous-traitant par des transporteurs spécialisés.

**Figure 31** Procédure dégradée de l'automate Architect i2000 (BIO-90490-DO-182)

## 2.2.4. Habilitation technique pour la sérologie automatisée de la toxoplasmose sur l'Architect i2000

La compétence du personnel technique est primordiale pour le bon déroulement de l'analyse et pour garantir un résultat fiable. Ainsi tout personnel amené à occuper un poste dans le laboratoire doit faire l'objet d'une formation initiale qui aboutira à la qualification de la personne. Cette étape de qualification est atteinte après avoir validé plusieurs phases successives, d'observation, et de tutorat de la personne, le tout étant tracé sur une feuille d'habilitation.

Nous avons ainsi rédigé cette feuille d'habilitation pour la réalisation des sérologies de la toxoplasmose sur l'Architect i2000. Pour cela, nous avons repris la feuille d'habilitation technique déjà existante pour les techniciens de l'UF de Virologie en poste sur le PTA, et l'avons adaptée aux critères de compétences requis pour les techniciens de l'UF de Parasitologie – Mycologie. Ce document est présenté en **annexe 8**.

Une fois qualifié, le technicien doit entretenir ses compétences selon des critères de « maintien des compétences » définis par les biologistes de l'UF. Là aussi, nous avons repris un document déjà existant au sein de l'UF (BIO-70180-FO-094) que nous avons complété en ajoutant les critères de maintien des compétences spécifiques à l'automate Architect i2000. Ainsi, la participation à au moins 2 séances de présentations de dossiers clinico-biologiques par les internes et/ou les biologistes, et la réalisation des techniques concernées au moins 3 fois par semestre, sont les critères exigés pour maintenir cette habilitation.

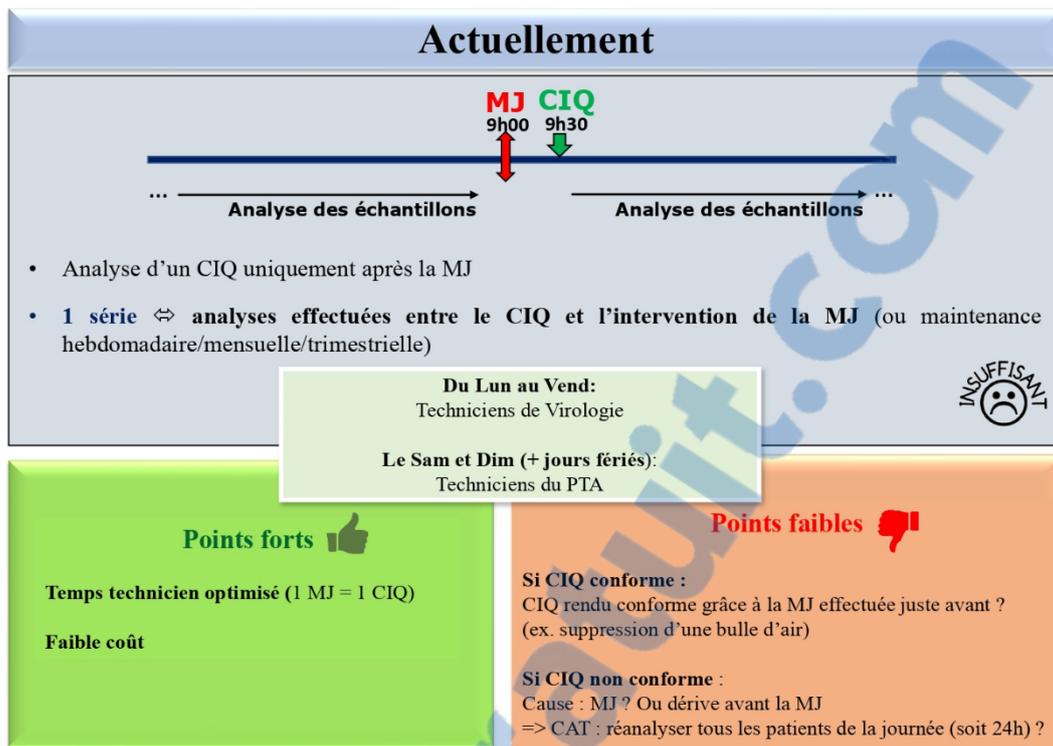
Ces différents documents attestant de l'habilitation initiale puis du maintien des compétences sont archivés dans KaliLab.

## 2.3. Gestion des contrôles et des maintenances

### 2.3.1. Gestion quotidienne des CIQ sur l'Architect i2000

Après avoir identifié différents problèmes lors de l'état des lieux initial au sujet de la gestion des CIQ sur l'automate Architect i2000, nous avons ensuite proposé plusieurs scénarios pour résoudre ces problèmes et adapter notre stratégie d'analyse des CIQ à la fois aux exigences de l'accréditation et à notre activité sur cet automate.

Ainsi, lorsque nous avons entrepris ce travail, le rythme d'analyse des CIQ était quotidien, mais avec uniquement l'analyse d'un contrôle positif et d'un contrôle négatif après la Maintenance Journalière (MJ) sur un automate fonctionnant 24h/24 et 7j/7, ce qui n'est pas suffisant pour répondre aux exigences de qualité imposées par l'accréditation. En effet, selon cette stratégie, les résultats des CIQ analysés après la MJ ne sont pas suffisants pour s'assurer de la fiabilité des analyses effectuées préalablement à la MJ. Les opérations de MJ peuvent par exemple éliminer un problème de fonctionnement de l'automate qui ne pourra pas être repéré si les CIQ analysés juste après cette MJ apparaissent conformes. A l'inverse, si un CIQ est non conforme après la MJ, nous ne pouvons pas savoir si la cause de cette non-conformité est la MJ elle-même ou si le problème était présent en amont de cette MJ (**Figure 32**).



MJ: Maintenance journalière / CIQ: Contrôle Interne de Qualité / CAT: Conduite à tenir

**Figure 32** Stratégie actuelle pour l'analyse de nos CIQ sur l'Architect i2000

De plus, avec cette organisation pour l'analyse des CIQ, il était alors difficile de définir une « série » d'analyses. Selon les recommandations qui figurent dans le document SH REF 02 du COFRAC (166), une série d'analyses doit être encadrée par des contrôles de début et de fin de série avec des contrôles à plusieurs niveaux de concentration. Le laboratoire doit définir la fréquence d'analyses de ces CIQ et donc la durée d'une série qui dépend notamment du volume d'analyses.

A cet état des lieux initial sur le plan technique, s'ajoutait des difficultés pour l'équipe technique du PTA qui assure le relai dans l'utilisation de l'automate le week-end et les jours fériés. Les problèmes rapportés par les techniciens du PTA concernaient notamment leur investissement en temps et les difficultés à maintenir leurs compétences sur cet automate.

Sur la base de ces constats, et à l'aide de l'outil QOQCCP illustré en **annexe 9**, nous avons élaboré 4 stratégies, les objectifs majeurs étant de mettre en place un CIQ de fin de série afin de définir précisément la notion de série, et de limiter par ailleurs le nombre d'échantillons à analyser rétrospectivement en cas d'étude d'impact.

Avec l'aide des biologistes et des techniciens de l'UF de Virologie, l'analyse critique de ces 4 scénarios a permis d'éliminer les 3 premières stratégies proposées qui ne permettaient pas de résoudre ni les problèmes techniques ni les difficultés de fonctionnement évoquées par l'équipe technique du PTA lors de l'état des lieux.

La quatrième stratégie que nous présentons à la **figure 33** a donc été adoptée lors d'une réunion qualité. Elle présente l'avantage de ne faire intervenir que les techniciens de l'UF de Virologie pour l'analyse des CIQ, ce qui résout les problèmes de formation et de maintien des compétences pour les techniciens du PTA qui ne sont donc pas impliqués dans cette activité. D'autre part, selon ce scénario, la notion de série est bien définie, et comprend ainsi les analyses réalisées entre le CIQ 1 et le CIQ 2. Cette stratégie est divisée en 2 parties : en semaine, du lundi au vendredi, cela consiste à analyser les contrôles négatifs et positifs pour chacun des paramètres avant et après la MJ. Dans ce scénario, pour la période du week-end, les CIQ sont analysés le samedi matin puis de nouveau le lundi matin, la série étant alors définie par l'ensemble des analyses effectuées pour les patients entre le CIQ 1 du samedi et le CIQ 2 du lundi matin (étendue d'un jour en cas de vendredi ou de lundi férié). Ce scénario a été retenu après avoir évalué l'activité analytique moyenne à partir de données archivées sur l'Architect i2000, et démontré ainsi que l'activité moyenne sur une période de week-end était 4 fois moins importante que celle observée lors d'une journée en semaine, du lundi au vendredi (**Figure 34**). Cette stratégie de gestion des CIQ a été mise en place à partir du 6 juillet 2019.

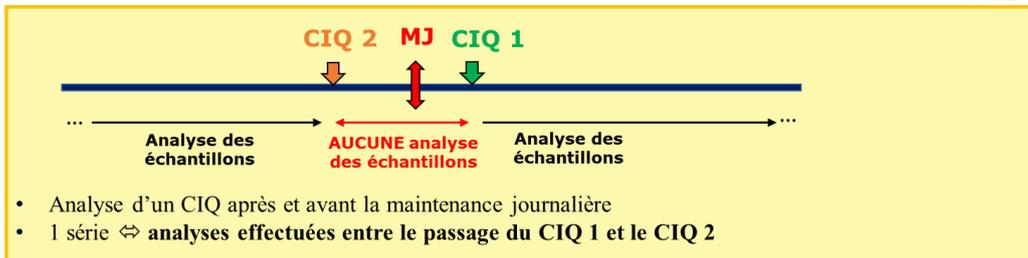
Suite à ce changement de stratégie, nous avons également modifié le document BIO-90490-DO-161 décrivant les modalités d'analyse des calibrateurs et des contrôles sur l'Architect i2000 pour tenir compte du volume beaucoup plus important de contrôles que les techniciens doivent dorénavant préparer pour assurer l'analyse des CIQ sur une période d'une semaine.

Dans le même temps, nous nous sommes assurée en nous appuyant sur la bibliographie (167-169) et notre expérience au laboratoire, que les règles d'interprétation des CIQ programmées dans notre logiciel de gestion des contrôles URT convenaient à nos besoins en sérologie infectieuse. Ces règles permettent de signaler des erreurs aléatoires ou systématiques qui seront identifiées sur les cartes de contrôle utilisant les règles de Westgard (**Annexe 10**). En tenant compte de ces règles de Westgard, nous avons élaboré des logigrammes permettant de gérer les différentes situations induites par la conformité ou non des CIQ (**Figures 35 et 36**). L'ensemble a été intégré dans un document intitulé « Gestion des contrôles internes de qualité sur Architect i2000 » (BIO-90490-DO-183) qui inclut également les modalités de réalisation d'une étude d'impact imposée dans certains cas de non-conformité des CIQ. Enfin, dans ce document, un paragraphe explique les modalités d'un reciblage qui doit être réalisé par un biologiste et qui consiste à définir une nouvelle valeur cible du/de(s) CIQ après constatation d'une modification des résultats des CIQ (décalage systématique de plus d'1 écart-type par rapport à la cible) sur une période minimale de 2 mois.

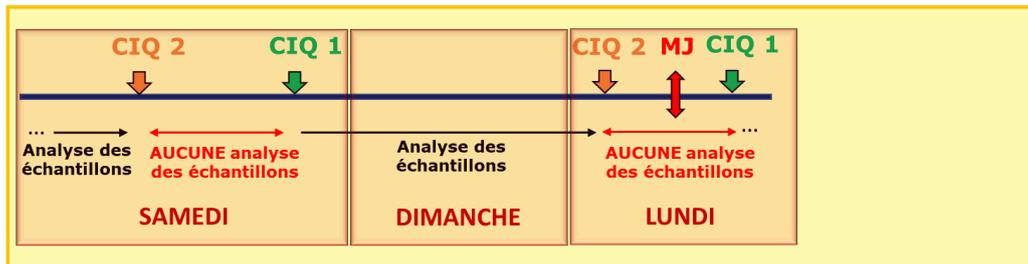
## Stratégie 4

S'affranchir des techniciens du PTA

Du lundi au vendredi inclus (techniciens de Virologie)



Du samedi au lundi matin (techniciens de Virologie)



MJ: Maintenance journalière / CIQ: Contrôle Interne de Qualité

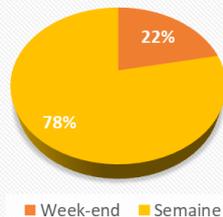
Figure 33 Stratégie 4 - Gestion des CIQ sur l'Architect i2000

### Matériels et Méthodes :

Recueil rétrospectif des résultats d'échantillons de patients analysés sur **6 week-end** (Oct. 2018 à Janv. 2019) et **5 jours** (Lun au Vend d'une semaine en Sept 2018), à l'aide de l'extraction des données brutes via les sauvegardes de l'Architect i2000.

### Résultats :

Proportion moyenne d'analyses effectuées le week-end par rapport à un jour de semaine tous paramètres confondus



Nombre moyen d'analyses par paramètres effectuées le week-end par rapport à un jour de semaine

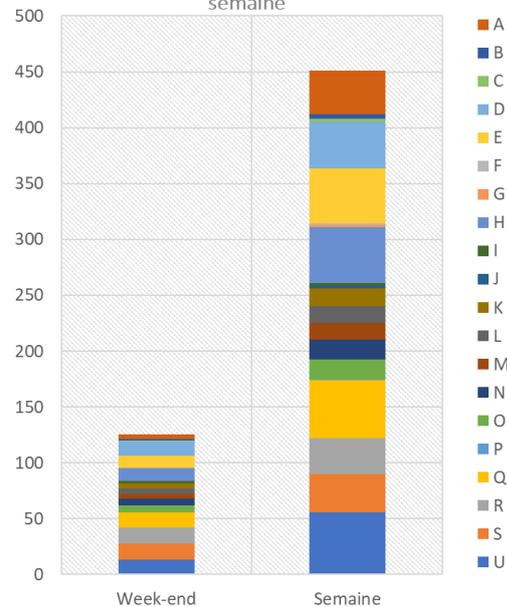
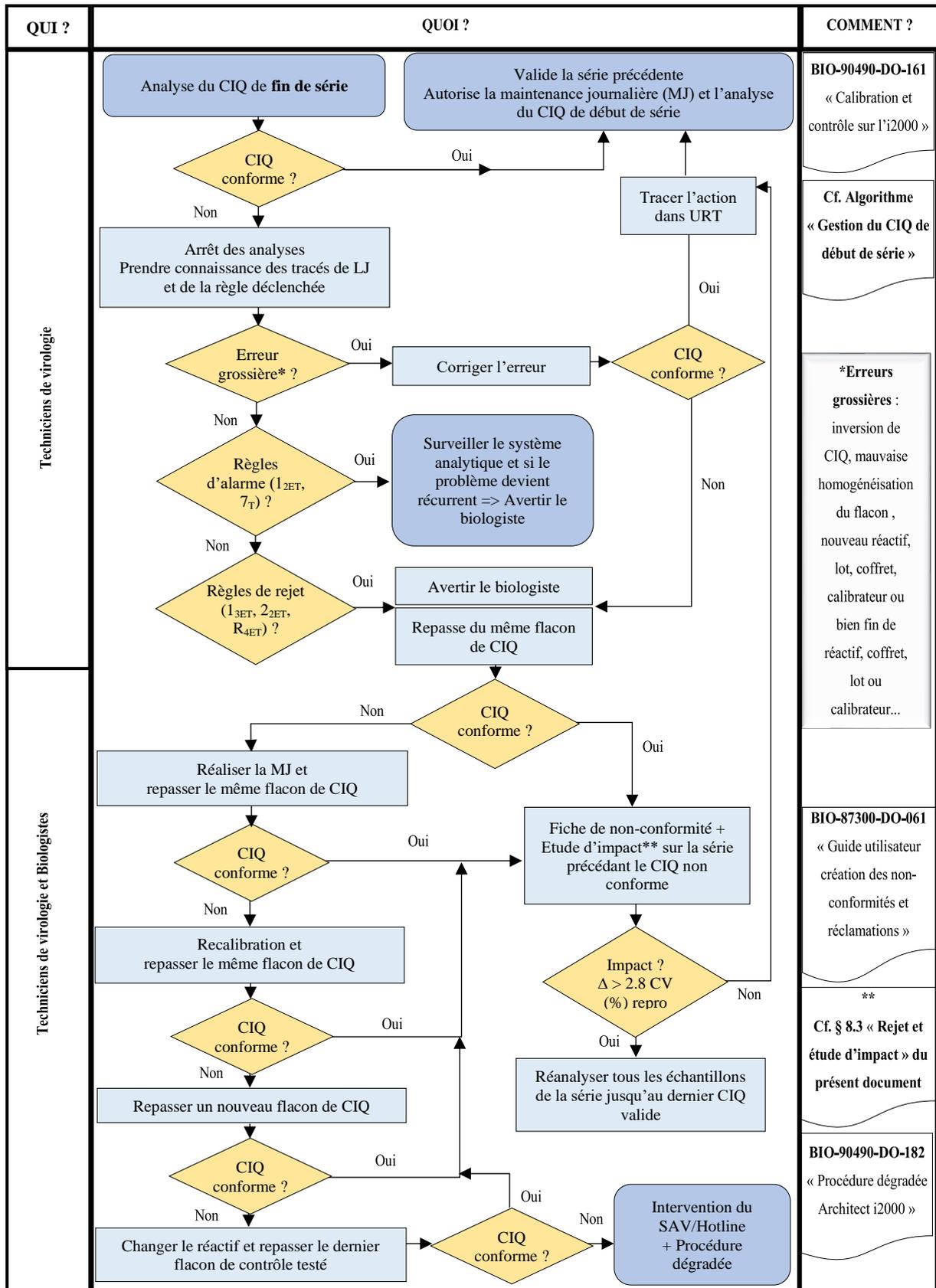


Figure 34 Évaluation du nombre d'échantillons analysés sur l'Architect i2000, le week-end par rapport à un jour de semaine





LJ : Levey-Jennings

**Figure 35** Algorithme de gestion des CIQ de fin de série sur l'Architect i2000

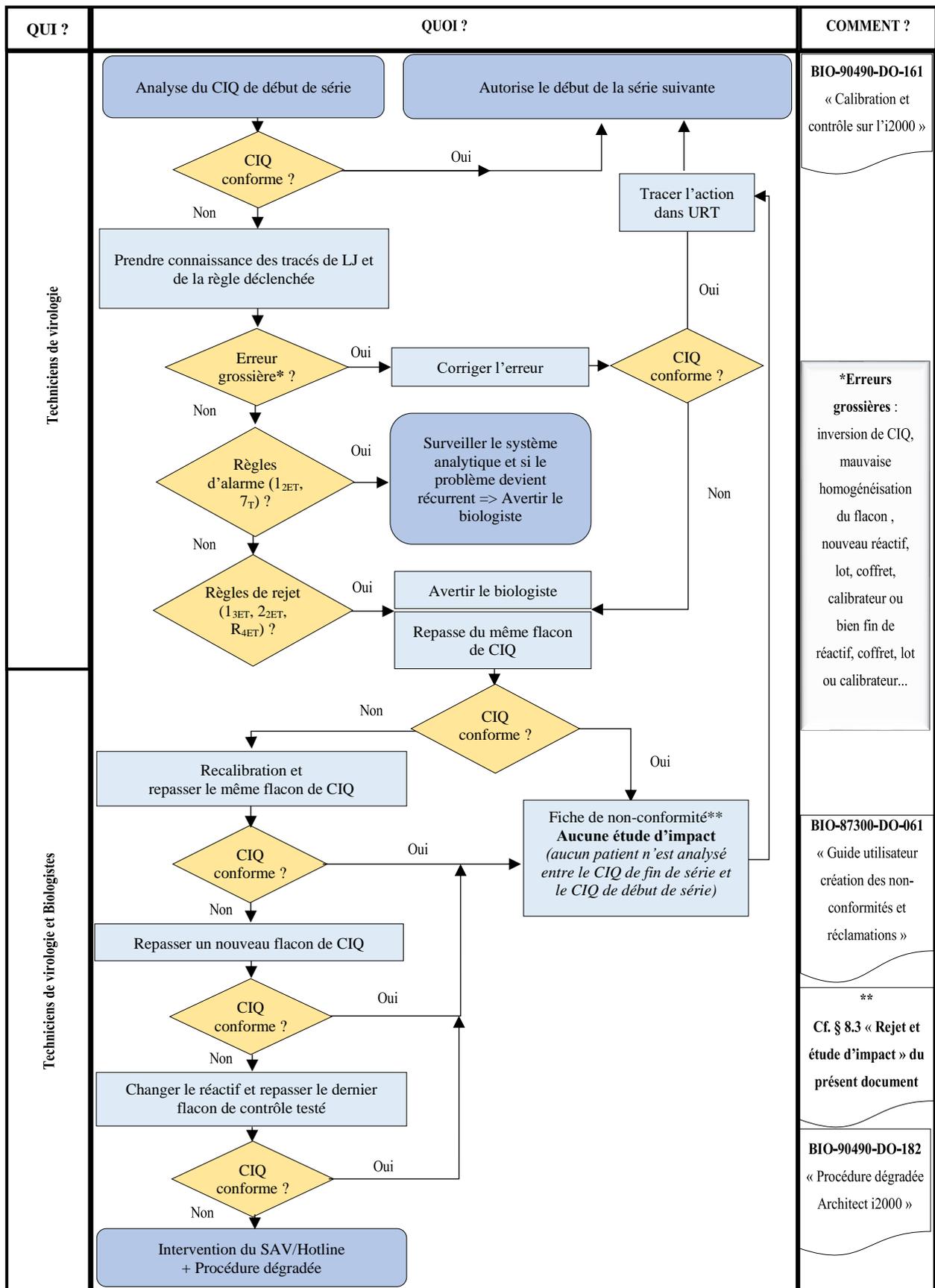


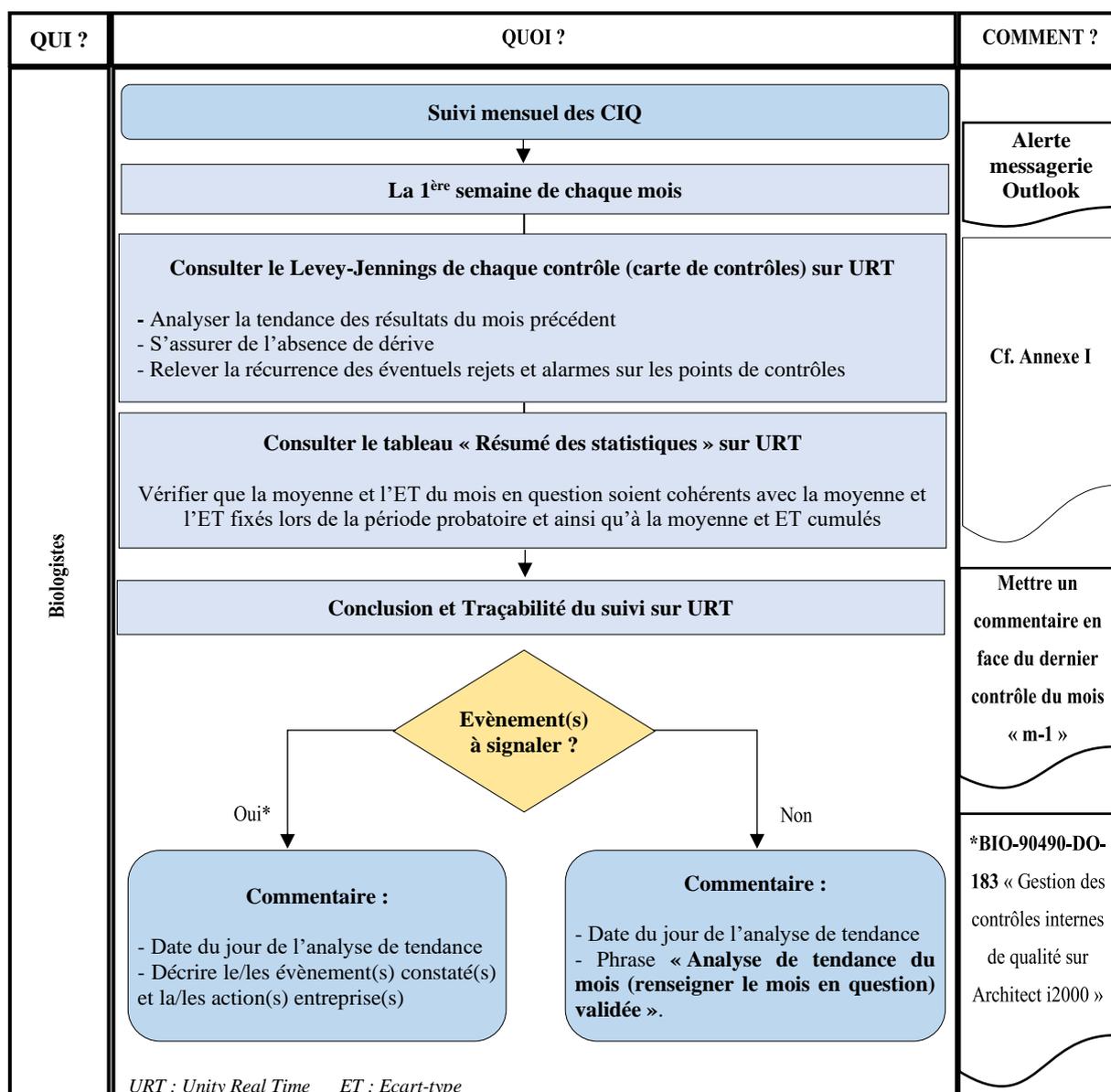
Figure 36 Algorithme de gestion des CIQ de début de série sur l'Architect i2000

### 2.3.2. Suivi à moyen et long terme des CIQ sur l'Architect i2000

Cette stratégie d'analyse des CIQ étant définie, nous avons ensuite proposé des modalités de suivi à moyen et à long terme des CIQ, conformément aux exigences présentes dans le document SH GTA 06 (170).

#### a) Suivi à moyen terme

La stratégie de gestion des CIQ à moyen terme est présentée à la **figure 37**. Nous l'avons élaborée en répondant aux questions de l'outil QQQQCP. Ainsi le biologiste (Qui ?) procédera au suivi des CIQ positifs et négatifs de l'ensemble des paramètres (Quoi ?) sur le logiciel URT (Où), la première semaine de chaque mois grâce à un rappel via la messagerie Outlook que nous avons programmée (Quand ?). Ce suivi est assuré par le biologiste en consultant sur le logiciel URT la courbe de Levey-Jennings correspondant aux résultats des CIQ, et le tableau des statistiques mensuelles. Les conclusions sont tracées dans le logiciel URT (Comment ?). Ce suivi permet de mettre en évidence des tendances ou des phénomènes de dérive et d'enclencher si besoin des mesures préventives (Pourquoi ?). Cette stratégie est devenue effective à partir du 2 mai 2019.



**Figure 37** Extrait du document BIO-90490-DO-184 (Suivi mensuel des CIQ – Calcul de l'incertitude de mesure sur Architect) montrant la stratégie établie pour le suivi à moyen terme des CIQ sur l'Architect i2000

### b) Suivi à long terme

La stratégie de suivi à long terme des CIQ est plus complexe à mettre en œuvre car elle doit tenir compte à la fois de l'ensemble des paramètres analysés sur l'Architect i2000 mais aussi du fait que nous utilisons des contrôles multiparamétriques. Ainsi nous avons entrepris avec la cellule Qualité un travail pour l'élaboration d'une nouvelle version d'un formulaire commun au PBH, afin de l'adapter à notre pratique en tenant compte de ces critères. Ce suivi à long terme va permettre de surveiller la qualité analytique de la méthode, par l'exploitation des données des CIQ (moyenne, écart-type, et CV) calculées tout au long de l'année, et d'utiliser ces données pour calculer, avec également les résultats des EEQ de la même année, l'incertitude de mesure. La marche à suivre est disponible dans le document opérationnel intitulé BIO-90490-DO-184 dans KaliLab et elle prendra effet au début de l'année 2020.

### 2.3.3. Gestion de la période probatoire sur l'Architect i2000

La période probatoire est une période de qualification d'un nouveau lot de contrôle permettant de définir sa moyenne (valeur cible) et son écart-type afin d'établir nos limites d'acceptabilité. Elle est effectuée en parallèle du lot de contrôle en cours d'utilisation assurant ainsi la conformité de la technique. Ainsi, le nouveau lot est analysé comme un échantillon patient.

Nous avons revu le document décrivant le déroulement de la gestion de la période probatoire en sérologie infectieuse (BIO-90490-DO-185) afin de clarifier certains points : l'issue de la période probatoire, et les modalités d'interprétation des résultats obtenus.

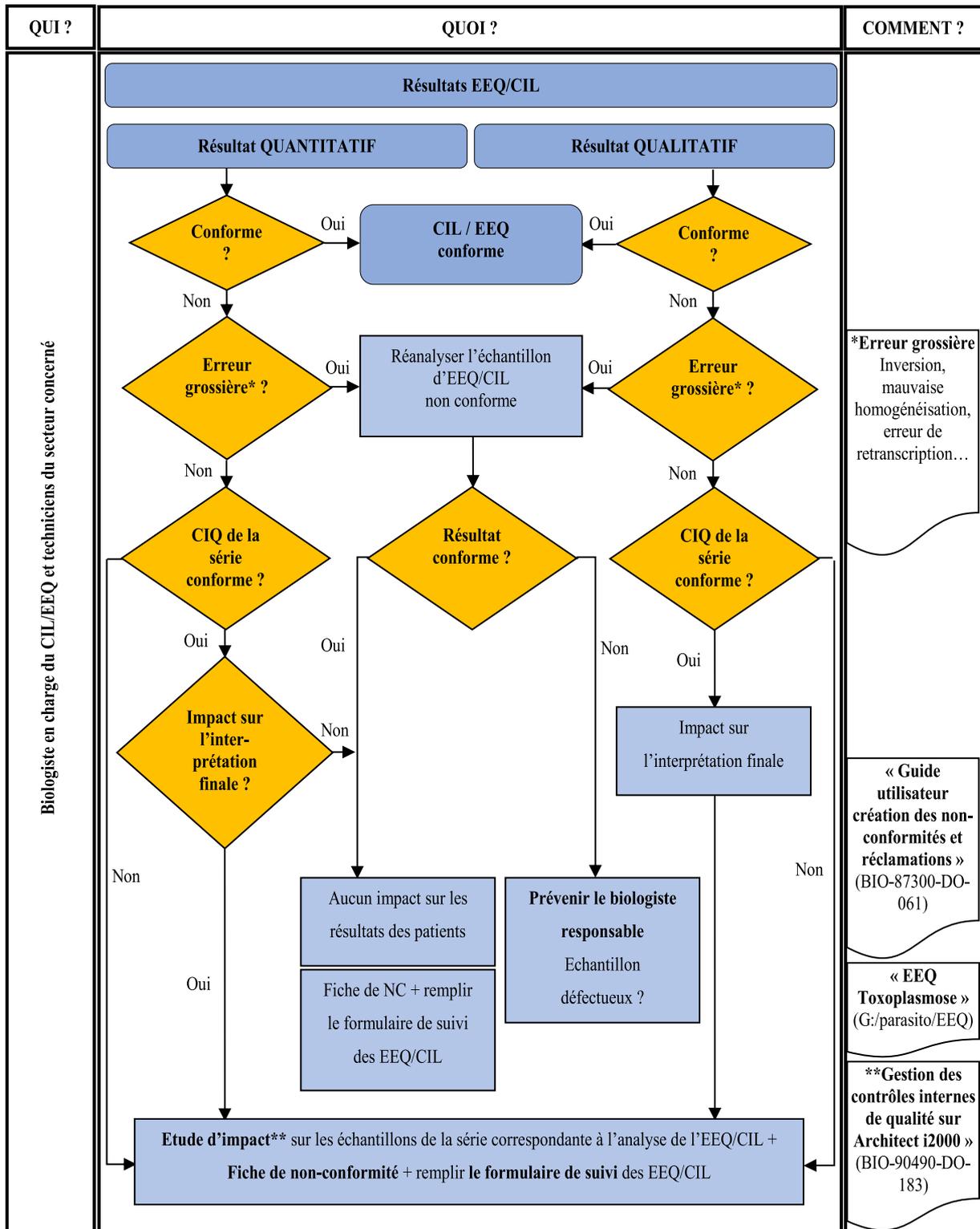
A la réception d'un nouveau lot de contrôle, le technicien de Virologie débute la période probatoire à la date indiquée dans le fichier de traçabilité disponible sur le serveur, et qu'il aura rempli préalablement à la réception de ce lot. Il doit dans le même temps, paramétrer ce nouveau lot dans le logiciel URT et sur l'automate conformément au document. Nous avons convenu que la période probatoire prenait fin après analyse de 10 points de contrôles obtenus sur des jours différents.

A cette issue, le biologiste procède au calcul des paramètres statistiques (moyenne et écart-type). Pour le CIQ positif, il enregistre dans URT la moyenne cumulée de ces 10 passages et le CV retenu constituant notre limite acceptable au-dessus de laquelle cela enclenchera une règle de rejet. Nous avons ainsi choisi de le fixer à 15 %. Quant au CIQ négatif, le biologiste renseigne également dans URT la moyenne cumulée des résultats obtenus lors de la période probatoire ainsi que l'écart-type cumulé de l'ancien lot. Nous avons jugé que l'utilisation du CV pour définir les limites d'acceptabilité du CIQ négatif était non applicable dans le cas des analyses de sérodiagnostic.

### 2.3.4. Gestion des EEQ et CIL en sérologie de la toxoplasmose

Le document « Gestion des EEQ et CIL en sérologie de la toxoplasmose » que nous avons rédigé et qui est référencé dans KaliLab sous l'appellation BIO-70180-DO-158 présente tous les éléments qui permettent la prise en charge des EEQ et CIL qui correspondent à l'activité de diagnostic de la toxoplasmose au sein de l'UF de Parasitologie - Mycologie. Il comporte ainsi la liste de ces EEQ et CIL, les modalités d'enregistrement, de réalisation et de validation des résultats de ces contrôles. Nous avons inséré dans ce document un logigramme qui présente la conduite à tenir selon que le résultat est conforme ou non aux résultats attendus (**Figure 38**).

De plus, lorsque nous avons débuté ce travail, il n'existait pas de contrôle externe de qualité pour le test d'agglutination au latex PASTOREX TOXO®. Nous avons donc mis en place, conformément aux exigences de la norme, un CIL en proposant une collaboration avec le laboratoire de microbiologie du CH Le Mans qui utilise aussi cette technique pour le sérodiagnostic de la toxoplasmose. Selon l'organisation qui a été validée par les 2 laboratoires, 6 sérums au total seront sélectionnés par chacun des participants et échangés chaque année pour ce CIL. Ils seront analysés par groupe de 3 sérums à 2 périodes différentes. La première session de ce CIL débute en septembre 2019.



A noter qu'un résultat sera considéré comme **non conforme** si le laboratoire obtient un **z-score de 3** pour les résultats quantitatifs du CTCB, une **note C ou D** pour les résultats qualitatifs du CTCB, et enfin la **mention "non validé"** pour les autres CIL (CNR toxoplasmose et CH Le Mans).

**Figure 38** Conduite à tenir pour l'interprétation des résultats des EEQ / CIL en sérologie de la toxoplasmose

### **2.3.5. Maintenance journalière de l'EUROBlot Master**

L'automate EUROBlot Master est mutualisé depuis début 2019 entre les 2 UF de Parasitologie - Mycologie et de Virologie. Cette mutualisation a mis à jour des différences dans la réalisation des opérations de MJ de l'automate selon les équipes techniques des 2 UF qui se référaient jusqu'alors aux protocoles de maintenance décrits dans 2 trousse de réactifs de fournisseurs différents, LDBIO Diagnostics pour les sérologies parasitaires et fongiques, et EUROIMMUN pour les sérologies virales. Afin d'harmoniser les opérations de maintenance, nous avons contacté le fournisseur et mis en place une solution unique de maintenance pour cet appareil, quel que soit le réactif utilisé. Nous l'avons rédigé et inséré dans le document intitulé « Maintenance de l'automate EUROBlot Master » et référencé BIO-70180-DO-110 dans KaliLab.

## **2.4. Phase postanalytique**

Dans la phase postanalytique, le travail que nous avons réalisé concerne 3 volets : la validation biologique des examens de sérodiagnostic de la toxoplasmose, l'habilitation des biologistes à cette validation et la gestion de la sérothèque.

### **2.4.1. Validation biologique des examens du sérodiagnostic de la toxoplasmose**

Dans un premier temps, nous avons rédigé dans un document opérationnel (référéncé BIO-70180-DO-114 dans KaliLab) sur les modalités de validation pour l'ensemble des examens sérologiques, mais aussi de biologie moléculaire, effectués pour le diagnostic de la toxoplasmose au sein de l'UF de Parasitologie - Mycologie. Dans ce document, après avoir présenté brièvement l'organisation générale de cette validation dans l'UF (rythme, biologistes concernés, vérification préalable des CIQ), nous avons décrit les étapes successives de la validation qui comprend la vérification des données administratives du patient, l'interprétation du dossier (en tenant compte des résultats des différentes étapes analytiques et des données clinico-biologiques disponibles), la validation informatique du dossier, l'édition et la transmission des résultats. Est également inclus à ce document le cas particulier de la validation du diagnostic biologique prénatal de la toxoplasmose sous la responsabilité de certains biologistes de l'UF spécifiquement habilités.

Puis une grande partie de notre travail dans cette phase postanalytique a été consacrée à formaliser la stratégie de mise en œuvre des différentes techniques sérologiques de la toxoplasmose ainsi que l'interprétation de l'ensemble du dossier sérologique une fois ces techniques réalisées.

Cette stratégie était déjà appliquée dans l'UF lorsque nous avons entamé ce travail mais n'avait pas encore fait l'objet d'une mise en forme dans un document d'assurance qualité intégrée dans le logiciel KaliLab. Lors de la rédaction de ces documents, nous avons tenu compte des recommandations de la HAS et du CNR de la toxoplasmose, des évolutions techniques et commerciales récentes tel que l'arrêt prochain de commercialisation de la technique Toxoscreen DA<sup>®</sup> par bioMérieux, et enfin du changement de la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale (NABM) intervenu début 2019.

Compte tenu du rôle de laboratoire expert exercé par l'UF de Parasitologie - Mycologie, elle intervient dans toutes les étapes du diagnostic de la toxoplasmose, qu'il s'agisse de la surveillance sérologique des femmes enceintes, du diagnostic prénatal, néonatal et postnatal de la TC, de la surveillance et du diagnostic des formes graves chez les patients immunodéprimés, ou encore du diagnostic des formes oculaires. Les dossiers pris en charge sont donc très divers et les stratégies de réalisation des techniques sont différentes selon ces contextes. Il était donc difficile de rassembler l'ensemble de la stratégie de diagnostic sérologique de la toxoplasmose dans un seul document, et pour gagner en lisibilité, nous avons donc fait le choix de la diviser en 3 parties correspondant respectivement aux 3 documents suivants, dont la référence dans KaliLab est citée entre parenthèses :

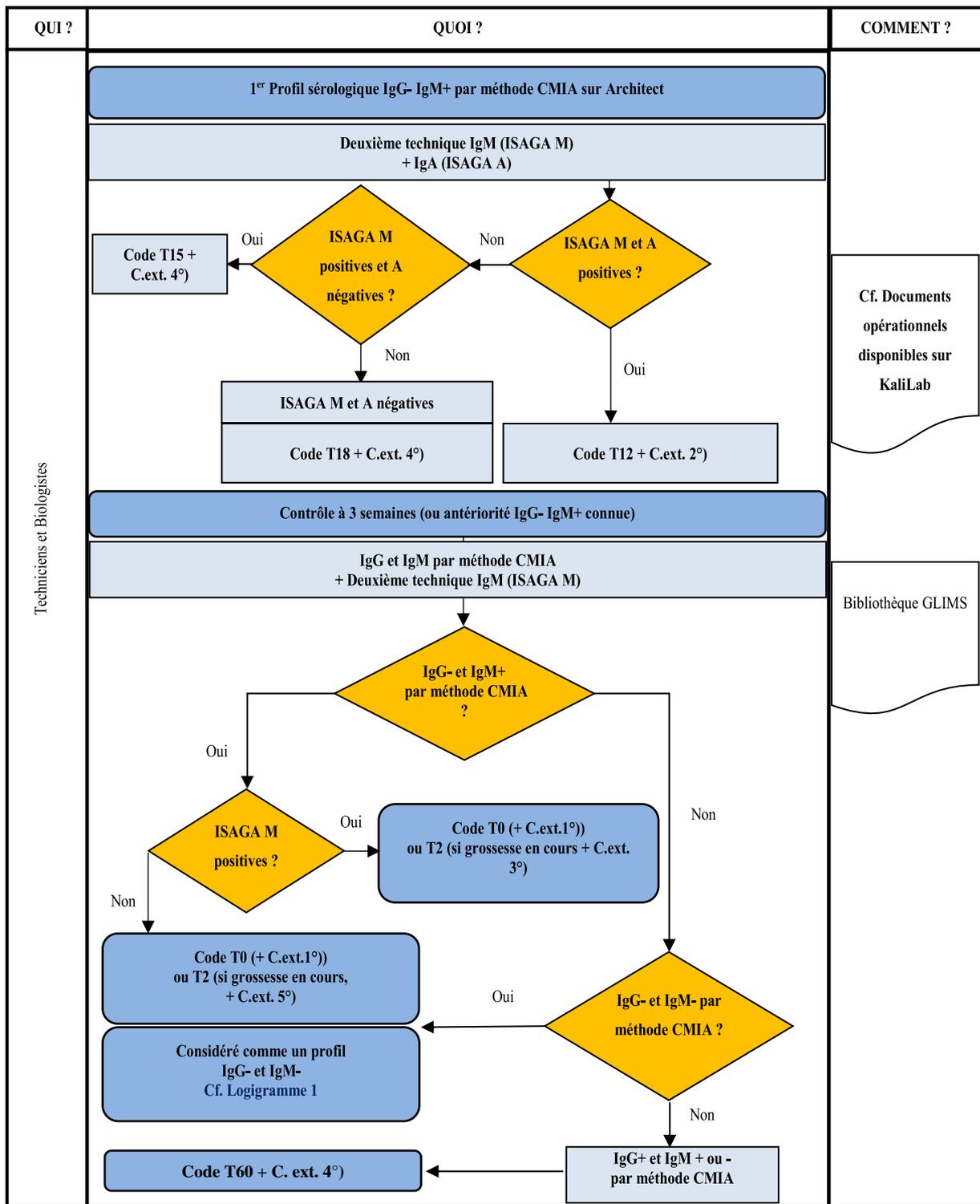
- Diagnostic de la toxoplasmose acquise chez l'immunocompétent : Stratégie et interprétation des résultats (BIO-70180-DO-161)
- Diagnostic de toxoplasmose congénitale : Stratégie et interprétation des résultats (BIO-70180-DO-159)
- Diagnostic de la toxoplasmose oculaire et chez l'immunodéprimé : Stratégie et interprétation des résultats (BIO-70180-DO-160).

A titre d'exemple, nous présentons dans la **figure 39**, un logigramme que nous avons élaboré et dans le **tableau 21**, les interprétations associées aux différentes situations de ce logigramme.

Le document BIO-70180-DO-161, qui décrit la stratégie et l'interprétation des examens de sérodiagnostic de la toxoplasmose est le plus complexe car il reprend les différents profils obtenus à l'issue de la phase de dépistage et détaille pour chacun d'eux la stratégie des techniques mises en œuvre et les interprétations proposées dans chaque cas. Pour l'exemple du profil sérologique associant un test IgG négatif et un test IgM positif par méthode CMIA sur l'Architect i2000 (**Figures 39 et Tableau 21**), le logigramme décrit la stratégie mise en œuvre dans cette situation afin de différencier une primo-infection toxoplasmique débutante d'une réaction non spécifique en IgM, avec les codes correspondant aux interprétations adaptées à chacun des cas.

Dans ce même document BIO-70180-DO-161, en ce qui concerne la stratégie face à un profil de dépistage présentant un taux limite ou faible en IgG et l'absence d'IgM, nous avons élaboré un logigramme qui tient compte du fait que la technique d'ADHS (Toxoscreen DA®; bioMérieux) ne sera plus commercialisée d'ici la fin de l'année. Nous avons donc anticipé cet arrêt de commercialisation en mettant en place dès maintenant une stratégie proposant une alternative à cette technique ADHS. Le test WB TOXO II IgG® déjà utilisé au sein de l'UF a été retenu pour cette indication. Il possède en effet d'excellentes performances comme test de confirmation du statut immunitaire en cas de taux limite ou faible en IgG (117,165) et est d'ailleurs la technique préconisée par la HAS et le CNR dans ce contexte (83,92).

Cette nouvelle stratégie a également fait évoluer les pratiques de l'UF contrainte désormais de réaliser un nombre plus élevé de tests WB TOXO II IgG®. En effet, la lecture de ce test nécessitant une comparaison des bandes obtenues pour les patients avec celles d'un contrôle positif, nous avons décidé d'inclure plusieurs contrôles positifs dans la série quand celle-ci est importante (1 contrôle pour 6 patients) afin d'optimiser la lecture des profils. Conjointement, la feuille de travail a été revue. Cette stratégie et la mise en œuvre de cette feuille ont pris effet à la mi-juillet 2019.



Le profil IgG - et IgM + correspond à un taux d'IgG < 1 UI/mL et un indice IgM ≥ 0,5 par méthode CMIA sur Architect. A l'initiative du biologiste, un test complémentaire TOXO II IgG® pourra être réalisé lorsque le taux d'IgG n'est pas strictement égal à zéro et < 1 UI/mL.

**Figure 39** Exemple d'un logigramme décrivant la stratégie entreprise au sein de l'UF de Parasitologie - Mycologie devant un profil sérologique toxoplasmique IgG - IgM+, issu du document BIO-70180-DO-161

### **Interprétation (codes de la bibliothèque GLIMS)**

**T0** : Absence d'immunité

**T2** : Absence d'immunité antitoxoplasmique. Poursuivre la surveillance sérologique mensuelle jusqu'à l'accouchement, et prévoir un contrôle sérologique post-*partum*, 4 semaines après l'accouchement. Respecter les mesures hygiéno-diététiques de prévention de la toxoplasmose pendant la grossesse.

**T12** : Profil sérologique évoquant une infection toxoplasmique débutante.

**T15** : Présence d'IgM isolées pouvant correspondre à une infection toxoplasmique débutante ou à une réaction faussement positive dans la détection des IgM. Sérologie à contrôler.

**T18** : Profil sérologique en faveur d'une réaction non spécifique dans la détection des IgM. Sérologie à contrôler

**T60** : Séroconversion toxoplasmique.

### **Commentaires externes (C.ext.) :**

**1a°)** Si femme en âge de procréer :

« A interpréter en fonction du contexte clinique et d'une éventuelle immunodépression. En cas de grossesse, réaliser une surveillance sérologique mensuelle jusqu'à l'accouchement, et prévoir un contrôle sérologique post-*partum*, 4 semaines après l'accouchement. Respecter les mesures hygiéno-diététiques de prévention de la toxoplasmose pendant la grossesse ou en cas d'immunodépression »

**1b°)** Si homme ou femme (en dehors de l'âge de procréer) :  
« A interpréter en fonction du contexte clinique et d'une éventuelle immunodépression. Suivi sérologique et respect des mesures hygiéno-diététiques de prévention de la toxoplasmose à adapter au statut immunitaire. »

**2°)** La présence simultanée d'IgM et d'IgA est très évocatrice d'un tout début d'infection. Un contrôle sérologique dans un délai de 2 à 3 semaines est indispensable pour confirmer le diagnostic par la mise en évidence d'une synthèse d'IgG en complément des 2 autres isotypes.

**3°)** La persistance d'IgM isolées, sans apparition d'un second isotype IgG ou IgA, ne permet pas de confirmer une primo-infection toxoplasmique débutante. Cette évolution sérologique est par contre en faveur d'une réaction non spécifique dans la détection des IgM, mais cette hypothèse doit impérativement être confirmée sur un nouveau prélèvement à prévoir aux environs du (date)

**4°)** Prévoir ce contrôle sérologique dans un délai de 2 à 3 semaines, soit à partir du (date).

**5°)** Ce contrôle sérologique confirme la réaction non-spécifique dans la détection des IgM par méthode CMIA.

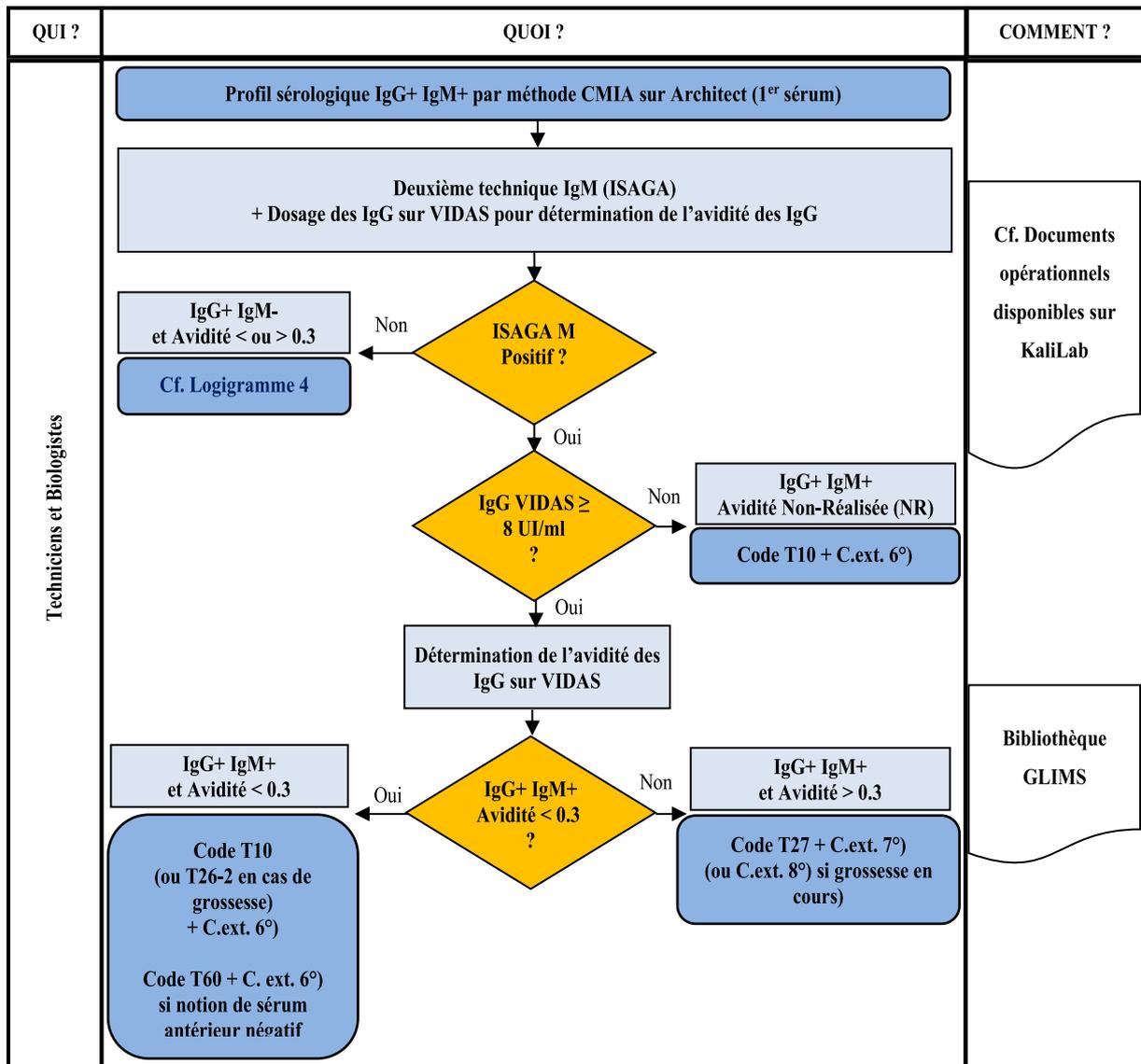
**Tableau 21** Commentaires d'interprétations associés au logigramme de la figure 39 décrivant la stratégie entreprise au sein de l'UF de Parasitologie – Mycologie devant un profil sérologique toxoplasmique IgG – IgM+

Dans l'élaboration de cette stratégie de sérodiagnostic, nous avons dû tenir compte également de la NABM qui a été modifiée début 2019 (**Annexe 11**). Cette nouvelle nomenclature fait dorénavant apparaître les techniques sérologiques d'expertise comme la détermination de l'avidité des IgG et les tests WB réalisés pour l'analyse des profils immunologiques comparés mère/enfant ou pour la confirmation d'un taux d'IgG équivoque. Elle prend ainsi mieux en compte l'activité d'expertise réalisée par certains laboratoires, selon les dernières recommandations de la HAS. Toutefois, avec la création de l'acte 1428, cette nouvelle nomenclature introduit en cas de résultats « équivoques ou positifs » en IgM lors du dépistage, la réalisation systématique d'un test de confirmation par une technique différente. Or, dans la stratégie de sérodiagnostic existante jusqu'alors dans l'UF de Parasitologie - Mycologie, cette seconde technique n'était pas réalisée systématiquement, car dans certains cas, elle n'apporte pas d'information supplémentaire utile pour interpréter l'ensemble du dossier sérologique.

C'est le cas, par exemple, face à un profil associant IgG et IgM par méthode de dépistage pour lequel la détermination de l'avidité des IgG est plus pertinente pour aider à interpréter le dossier.

Toutefois, pour être en conformité avec la nomenclature, nous avons introduit ce test de confirmation de manière systématique en adaptant la stratégie et les logigrammes à cette nouvelle réglementation (**Figures 40 et Tableau 22**). Le test d'immunocapture - agglutination Toxo-ISAGA® (bioMérieux) a été retenu dans l'UF comme test de confirmation des IgM.

L'ensemble de ce travail de structuration de la stratégie de sérodiagnostic à l'aide de logigrammes, s'est accompagné d'une refonte de la bibliothèque des interprétations disponibles dans GLIMS afin de les adapter à ces évolutions (**Figures 39 et 40**). Certaines n'étant plus adaptées ont ainsi été supprimées et d'autres ont fait l'objet de modifications. Des commentaires externes ont également été rédigés, et reliés aux interprétations dans les logigrammes (**Tableau 21 et 22**).



Le profil IgG+ IgM+ correspond à un taux d'IgG  $\geq 5$  UI/mL (ou à un taux limite, entre 1 et 5 UI/mL, et confirmé IgG+ par une technique complémentaire) associé à un indice IgM  $\geq 0,5$  par méthode CMIA sur l'Architect.

**Figure 40** Exemple d'un logigramme décrivant la stratégie entreprise au sein de l'UF de Parasitologie - Mycologie dans la mise en place du test Toxo-ISAGA® en systématique devant un profil IgG + IgM + sur un premier sérum, suite à la modification de la NABM

**Interprétation (codes de la bibliothèque GLIMS)**

**T10** : Profil sérologique pouvant correspondre à une infection toxoplasmique assez récente.

**T26-2** : Profil sérologique ne permettant pas d'exclure une infection toxoplasmique récente, de moins de 4 mois.

**T27** : Profil sérologique en faveur d'une infection toxoplasmique évoluant depuis plus de 4 mois. Notion à confirmer définitivement par un second prélèvement.

**T60** : Séroconversion toxoplasmique.

**Commentaires externes (C.ext.)**

**6°)** Prévoir un contrôle sérologique à partir du (date en respectant un délai de 2-3 semaines), afin de confirmer et de préciser cette datation de l'infection toxoplasmique.

**7°)** Prévoir ce contrôle à partir du (date en respectant un délai de 2-3 semaines) afin de confirmer le caractère ancien de l'immunité.

**8°)** Compte tenu de la DDR/DDG évaluée au (date) selon les informations communiquées, il s'agit probablement d'une infection toxoplasmique antérieure à la grossesse ou survenue au cours de grossesse. Prévoir ce contrôle sérologique à partir du (date en respectant un délai de 2-3 semaines) de façon à confirmer et à préciser définitivement cette datation de l'infection toxoplasmique.

*DDG : Date de Début de Grossesse ; DDR : Date des Dernières Règles*

**Tableau 22** Commentaires d'interprétations associés au logigramme de la figure 40 décrivant la stratégie entreprise au sein de l'UF de Parasitologie – Mycologie dans la mise en place du test Toxo-ISAGA® en systématique devant un profil IgG + IgM +

**2.4.2. Habilitation à la validation des examens du sérodiagnostic de la toxoplasmose**

L'habilitation initiale d'un biologiste pour la validation des examens du diagnostic biologique de la toxoplasmose, au sein de l'UF de Parasitologie – Mycologie, repose sur les acquis obtenus par au moins 3 ans d'ancienneté dans la participation à l'activité de diagnostic de la toxoplasmose.

Cette habilitation est adaptée pour un biologiste exerçant déjà dans l'UF de Parasitologie - Mycologie, mais pas pour un jeune biologiste débutant son activité dans l'UF ou pour un interne de biologie médicale. Pour ces situations, nous avons donc établi une feuille d'habilitation à la validation biologique des examens de la sérologie de la toxoplasmose disponible en **annexe 12**. Cette feuille est composée de 2 niveaux d'habilitation : le niveau A qui concerne la validation des sérologies de dépistage sur l'Architect i2000, et le niveau B pour l'habilitation à la validation des sérologies d'expertises. Chaque niveau comprend au même titre que l'habilitation technique, plusieurs étapes, une phase d'observation, de tutorat et d'évaluation. Cette dernière est accompagnée d'un questionnaire à choix multiples où une note minimale de 8 / 10 est exigée.

### **2.4.3. Gestion de la sérothèque**

La gestion de la sérothèque est un autre volet de la phase postanalytique que nous avons revu et formalisé après avoir d'abord vérifié que les pratiques dans l'UF étaient en conformité avec la législation actuelle. Nous avons ensuite rédigé ce document en décrivant les différentes étapes qui composent la gestion de la sérothèque.

Après avoir décrit les différentes modalités de préparation des aliquotes de sérum destinées à cette sérothèque, nous avons ensuite décrit le procédé d'enregistrement d'un sérum à mettre en sérothèque, et précisé les conditions de conservation de ces échantillons à court et à long terme, en nous appuyant sur les préconisations des fournisseurs et des sociétés savantes. Les échantillons de sérum sont ainsi conservés pendant 1 an à  $-22 \pm 4$  °C. Passé ce délai d'1 an, les échantillons sont conservés à  $-80$  °C.

## **2.5. Audit croisé**

L'objectif de l'audit croisé organisé avec le CH de Cholet a été d'évaluer l'ensemble du travail que nous avons déjà mis en œuvre dans le but d'accréditer les sérologies infectieuses sur l'Architect i2000. Les techniques d'expertises sérologiques de la toxoplasmose ne faisaient pas parties du périmètre d'évaluation des auditeurs. Ainsi une fois terminée l'évaluation sur site, s'est déroulée la réunion de clôture au cours de laquelle de nombreux points forts ont été soulevés. Par ailleurs, les évaluateurs n'ont constaté aucun écart. Toutefois, certains points ont fait l'objet d'axes d'amélioration qui nous permettront d'avancer dans notre démarche d'accréditation.

### **2.5.1. Les points forts relatifs aux exigences techniques (chapitre 5 de la norme NF EN ISO 15189)**

Un des premiers points forts relevé lors de cette réunion concerne la gestion des compétences du personnel qui a été appréciée par les auditeurs. Ils ont effectivement noté la présence d'habilitations et de maintiens tenus à jour dans KaliLab, notamment pour les techniciens et les internes de biologie médicale. De plus, ils ont constaté que l'ensemble des tâches que doit accomplir le technicien à son poste figuraient dans une fiche de poste.

Par ailleurs, les auditeurs ont noté que l'ensemble de la métrologie concernant l'Architect i2000 est bien maîtrisée et suivie régulièrement par les techniciens responsables. Cela concerne la cartographie des enceintes, les sondes de température de la pièce, la gestion des pipettes critiques. Les auditeurs ont également été satisfaits de la traçabilité sur l'automate, pour lequel il existait une fiche de vie tenue à jour et où sont notés toutes les interventions et maintenances.

Notre gestion documentaire qui est claire, précise et maîtrisée par l'ensemble des participants figure aussi dans les points forts. En effet, l'ensemble des documents qui ont été demandés ont pu être présentés et expliqués. Quant à la phase postanalytique, l'existence d'une sérothèque a été appréciée, tout comme l'existence d'une procédure de transmission des résultats accompagnée d'une convention de preuve lorsque cela est nécessaire.

Enfin, de manière plus générale, les interfaces informatiques (GLIMS, OneLink, KaliLab, URT) sont connues et maîtrisées par le personnel audité. Un point fort a été soulevé quant à l'existence de procédure dégradée pour ces logiciels.

#### **2.5.2. Les points forts relatifs au management (chapitre 4 de la norme NF EN ISO 15189)**

Pour ce chapitre, les principaux points forts concernent l'existence d'une évaluation des fournisseurs de produits, services, et du matériel par la cellule Qualité, la cellule Achat et les biologistes responsables.

La mise en place d'une prestation de conseils au sein de l'UF de Parasitologie - Mycologie formalisée sur une fiche référencée dans KaliLab, et la revue des examens sous-traités avant leur envoi par l'UF de Virologie font partis des points positifs mis en évidence par les auditeurs.

Les non-conformités sont bien tracées et clôturées par le biais de fiches archivées dans KaliLab.

Et enfin, nous avons eu un retour positif sur le suivi régulier de l'indicateur qualité mis en place pour le délai de rendu de résultat concernant la sérologie du VIH sur l'Architect i2000.

### 3. Discussion

Dans la démarche d'accréditation qui a débuté suite à la réforme de la biologie médicale de 2010, les LBM doivent mettre en place des dispositions pour répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189. Cette démarche qualité permet d'apporter un cadre aux pratiques des laboratoires par l'obtention d'une plus grande rigueur dans les techniques de travail, l'organisation, et l'homogénéisation des pratiques professionnelles permettant d'aboutir à un résultat de qualité.

Notre travail qui s'inscrit dans cette démarche globale entamée par le PBH du CHU d'Angers depuis 2013, a concerné plus particulièrement l'accréditation des techniques sérologiques de la toxoplasmose dans l'UF de Parasitologie - Mycologie. Cette UF possède une expérience importante et de longue date dans le diagnostic de la toxoplasmose, reconnue au niveau national, notamment par sa participation au CNR de la toxoplasmose. Positionnée ainsi aujourd'hui en tant que laboratoire expert dans ce domaine, l'accréditation de l'ensemble de l'activité liée à la toxoplasmose constitue un objectif majeur pour l'UF.

Tous les aspects de cette activité de diagnostic ont d'abord fait l'objet d'un état des lieux, ce qui nous a permis de connaître précisément ce qui avait déjà été mis en place sur le plan préanalytique, analytique et postanalytique, et par conséquent de lister l'ensemble des objectifs qui restaient à atteindre. Notre démarche a ainsi été calquée sur celle déjà appliquée dans d'autres LBM et qui s'appuie sur l'application du principe PDCA ou « roue de Deming » (171,172). La démarche de ces auteurs a en effet consisté à réaliser d'abord un état des lieux (P), puis une étape de rédaction des documents et l'élaboration de dossiers de vérification de méthodes (D), suivie d'une évaluation par des audits (C) et enfin des actions en vue d'une amélioration continue (A).

L'élaboration des dossiers de vérification de méthodes des techniques sérologiques de la toxoplasmose a été un des objectifs majeurs. Afin d'élaborer ces dossiers de vérification de méthodes, il nous a fallu en premier lieu définir le type de document SH FORM 43 à utiliser et les rubriques à renseigner dans chacun des documents. Il s'agissait là d'une première difficulté car en tant que laboratoire expert, l'UF de Parasitologie - Mycologie dispose d'un large panel de techniques très différentes pour réaliser le sérodiagnostic de la toxoplasmose. En effet, les techniques font appel à des méthodes automatisées pour la phase de dépistage relayées si besoin par des méthodes manuelles ou semi-automatisées pour les techniques d'expertise. Ainsi, selon la technique à accréditer, nous avons dû compléter des documents SH FORM 43 différents dans leur orientation et leur contenu.

D'ailleurs, concernant l'orientation de la démarche de vérification en fonction du caractère qualitatif ou quantitatif de la méthode, il n'a pas toujours été facile de classer la technique à vérifier selon ces critères. Or, le contenu et les rubriques à compléter dans un dossier de vérification méthodes sont très différents selon qu'il s'agit d'une méthode qualitative ou quantitative. Nous avons notamment rencontré cette difficulté pour les tests d'immunocapture - agglutination (Toxo-ISAGA® et Toxo-ISAGA IgA®). Devions-nous les considérer comme des techniques quantitatives ou qualitatives ? Cette question nous a conduit à interroger à ce sujet le fournisseur du réactif (bioMérieux) mais aussi des qualiciens dont des auditeurs COFRAC. Nous avons d'abord rappelé à nos interlocuteurs les modalités d'obtention des résultats par ces techniques ISAGA, qui correspondent à des scores calculés à partir d'une lecture visuelle des réactions dans les cupules. Au final, nous n'avons pas reçu strictement les mêmes réponses de la part des différentes personnes interrogées, mais globalement, il ressort que ces techniques doivent être considérées comme des tests qualitatifs. En effet, bien qu'une valeur chiffrée soit obtenue par addition de 3 scores dans les cupules, il n'y a pas une continuité de ces données chiffrées, contrairement aux valeurs obtenues, par exemple, lors du dosage des IgG antitoxoplasmiques sur l'automate Architect i2000.

En outre, nous avons rencontré une deuxième difficulté, pour la détermination du coefficient de variation (CV) de nos tests de répétabilité et de fidélité intermédiaire des techniques quantitatives pour le dosage des IgG et des IgM antitoxoplasmiques. Ce problème s'étend plus généralement aux sérologies infectieuses automatisées, pour lesquelles il n'y a pas de recommandations des sociétés savantes au sujet des limites d'acceptabilité. Dans la littérature, 2 approches existent pour la définition des limites acceptables des valeurs de CV (173). La première est une approche purement analytique, basée sur l'état de l'art (162). Mais ces recommandations ne concernent que les paramètres de Biochimie, les marqueurs tumoraux et certains dosages de médicaments. La deuxième, est une approche physiologique, prenant en compte les variations intra et inter-individuelles. L'exemple le plus connu correspond aux tables de RICOS (174), qui ont l'avantage par rapport à l'état de l'art, de mieux correspondre au contexte clinique. Toutefois, ces tables présentent de nombreux inconvénients : valeurs peu robustes (panels d'échantillons réduits), absence de prise en compte des différents niveaux de concentration. Et même si quantitativement, cela représente plus de 300 analytes, ces tables ne concernent que certaines disciplines de la biologie médicale comme la Biochimie, l'Hémostase, ou encore l'Immunologie, et elles n'ont pas été établies pour les sérologies infectieuses. Dans ce contexte, et pour ce qui concerne la démarche d'accréditation de ces sérologies, c'est à chaque biologiste d'expliquer sa démarche, et d'apporter les arguments qui l'ont conduit à fixer ses objectifs analytiques comme nous l'avons fait dans la rédaction des SH FORM 43 pour le sérodiagnostic de la toxoplasmose.

Nous avons été aidés en cela par les données et références présentes dans les notices des fournisseurs de réactifs, par l'expérience d'autres laboratoires dans le domaine des sérodiagnostics infectieux, et par les résultats d'une étude publiée par l'association des Laboratoires Accrédités (LABAC). Cette étude portant sur l'analyse d'échantillons et de CIQ de sérologies virales automatisées, a montré que les CV des échantillons positifs donnaient dans la majorité des cas un CV inférieur ou égal à 20 %, et que le suivi des CIQ négatifs n'apportait pas d'informations pertinentes et n'avait donc pas lieu d'être (168).

D'une manière générale pour ce qui concerne les sérologies infectieuses, les études et les données disponibles concernant les vérifications/validations de méthodes sont rares par rapport à celles déjà accessibles dans d'autres disciplines, telles que la Biochimie ou l'Hématologie. Un référentiel d'accréditation en microbiologie a néanmoins été rédigé par le groupe de travail « QUALité en MICrobiologie » (QUAMIC) (175). Mais ce référentiel, bien qu'il soit axé sur la microbiologie, ne traite pas des sérologies infectieuses. De même, l'Association française des enseignants et praticiens hospitaliers titulaires de parasitologie et mycologie médicales (ANOFEL), propose des trames de dossiers de vérification de méthodes accompagnées de références bibliographiques, mais là encore, le volet sérologique n'est pas très développé (52).

La rédaction des dossiers de vérification de méthodes a permis par ailleurs de mettre à jour certaines pratiques dans la démarche diagnostique qui avaient besoin d'être mieux maîtrisées, et nous nous sommes donc attachée à proposer des solutions pour les améliorer. L'exemple le plus marquant correspond à la gestion des CIQ sur l'automate Architect i2000. Lorsque nous avons entrepris ce travail, l'analyse des CIQ était certes déjà en place mais la gestion de ces CIQ n'était pas optimale.

En effet, le rythme d'analyse des CIQ était quotidien, mais trop limité pour assurer une complète maîtrise du processus analytique. La stratégie de gestion des CIQ que nous devions mettre en place devait répondre non seulement à des exigences d'ordre technique mais aussi à des problèmes liés aux ressources humaines. Sur le plan technique, il a fallu optimiser le rythme d'analyse des CIQ en fonction des séries d'analyses mais aussi en fonction des horaires de travail des techniciens.

La définition d'une « série » a été une problématique centrale dans cette démarche. Certains auteurs estiment qu'une série est la période pendant laquelle la justesse et la fidélité du système analytique sont considérées comme stables (169). D'autres la définissent de manière plus stricte comme étant une durée de fonctionnement de l'automate de 12 heures, ou un nombre de tests réalisés par l'analyseur de 50 (173). Dans le cas d'un automate fonctionnant en continu, elle correspondrait à l'ensemble des analyses effectuées entre 2 CIQ (173,176). Le COFRAC quant à lui, et selon les informations qui figurent dans le document SH REF 02, précise que la notion de série doit être définie par chaque laboratoire en fonction de son activité et des types d'examen réalisés (166).

Toutefois l'ensemble des auteurs, s'accordent pour dire qu'une série doit être encadrée par un contrôle de début et de fin de série (166,169,173). Ainsi, en prenant en compte l'ensemble de ces données, nous avons défini une série comme étant le nombre d'analyses réalisées entre les contrôles de début et de fin de série analysés respectivement après et avant la MJ.

Des difficultés supplémentaires sont apparues avec la mise en place de la stratégie d'analyse de ces CIQ sur les périodes de week-end et de jours fériés. Il fallait trouver une articulation avec l'équipe technique du PTA qui assurait jusqu'alors le relai pour l'utilisation de l'automate sur ces périodes de week-end et de jours fériés. Nous avons donc imaginé plusieurs scénarios de gestion des CIQ qui ont fait l'objet de concertations avec les biologistes et les techniciens afin de retenir la solution la plus adaptée à notre fonctionnement. Cette nouvelle stratégie de gestion des CIQ a l'avantage de résoudre certains problèmes antérieurs, notamment avec l'introduction de CIQ en début et fin de série, mais elle génère aussi de nouvelles pratiques qui devront être évaluées ultérieurement.

C'est le cas de l'étape des MJ du samedi et du dimanche matin qui ont dorénavant été supprimées. Même si nous avons pu vérifier dans le manuel utilisateur de l'Architect i2000 que la suppression de cette étape n'aurait pas un impact majeur sur le fonctionnement de l'automate, et donc indirectement sur les résultats des patients, il restera néanmoins à évaluer sur le moyen et le long terme l'efficacité de cette formule, peut-être par la mise en place d'un indicateur qualité à l'aide de l'outil QQQQCP. Ainsi, nous pourrions envisager pour cet indicateur que le technicien de Virologie en poste sur le PTA (Qui ?) recense le nombre de CIQ non conformes du mois précédent survenus uniquement le week-end (Quoi ?) sur le logiciel URT (Où ?) tous les mois (Quand ?). Cette information pourrait être retranscrite dans un tableau de suivi dans un fichier Excel. Ainsi, nous pourrions estimer le nombre de CIQ non conformes par rapport au nombre total de CIQ analysés (Comment ?). Par la suite, une analyse critique accompagnée d'une action corrective pourrait être réalisée tous les 3 mois par le biologiste, puis revue annuellement lors de la revue de Direction. Ainsi, nous pourrions prouver la robustesse de notre système analytique par l'absence d'impact suite à la suppression de cette MJ le week-end (Pourquoi ?).

Globalement, le suivi à long terme dans la gestion des CIQ sur l'Architect i2000 permettra d'ajuster si besoin la stratégie actuellement mise en place avec éventuellement des actions correctives ou préventives.

Toujours dans le domaine analytique, mais concernant cette fois les techniques d'expertises réalisées en seconde intention, il est apparu que l'UF ne disposait pas de contrôle de qualité externe pour le test d'agglutination au latex (PASTOREX TOXO®). Or à ce jour, ce test ne s'inscrit dans aucun des programmes commercialisés d'EEQ ou parmi les techniques qui font l'objet des CIL organisés par le CNR de la toxoplasmose. Rappelons que dans le cadre de l'accréditation, chaque laboratoire doit participer à des contrôles de qualité externes afin de vérifier l'exactitude des résultats qu'il rend (39). Dans une telle situation, le document SH GTA 06 propose 3 solutions (170): une comparaison avec d'autres laboratoires avec un échange d'échantillons, une analyse d'un matériau de référence de pureté connue, ou bien une comparaison avec une méthode de référence. Nous avons opté pour la première solution, avec la mise en place d'un CIL entre l'UF de Parasitologie - Mycologie du CHU d'Angers, et le laboratoire de microbiologie du CH Le Mans. Cette solution est apparue la plus pertinente compte tenu de la collaboration déjà existante entre les 2 laboratoires, notamment dans le domaine du diagnostic de la toxoplasmose, le CH Le Mans sous-traitant déjà ses expertises sérologiques ainsi que les analyses de diagnostic prénatal à l'UF de Parasitologie - Mycologie du CHU d'Angers. Il convient cependant de noter que ce CIL débute actuellement, dans le second semestre de 2019, et qu'il conviendra donc d'évaluer à la fois sa faisabilité et sa pertinence au terme de cette première session afin d'ajuster si besoin les modalités de ce CIL à l'avenir.

En marge de l'élaboration des dossiers de vérification de méthodes, nous avons également rédigé un certain nombre de Documents Opérationnels (DO) accompagnés parfois d'un FOrmulaire d'enregistrement (FO) utilisé par exemple pour retranscrire les résultats de la technique. Pour rédiger ces documents techniques, nous avons travaillé en collaboration avec les techniciens, en étant notamment vigilants à la rédaction afin que les textes et formulaires soient bien lisibles, compris par les utilisateurs de la technique, et adaptés à leur pratique quotidienne. De plus, nous avons dû veiller à prendre en compte les contraintes liées à la mutualisation de certains automates, afin de bien délimiter les responsabilités des techniciens appartenant à des UF différentes, pour ensuite harmoniser les pratiques. Pour vérifier l'efficacité de notre démarche, nous avons proposé ces documents à l'essai pendant 1 mois aux techniciens concernés. Au terme de ce mois d'essai, nous avons fait un bilan avec l'équipe technique et ajusté ces documents avant de les diffuser sur KaliLab.

Dans le cadre de la phase postanalytique, une partie importante de notre travail a été consacrée à rédiger les stratégies de diagnostic de la toxoplasmose déjà présentes dans l'UF mais qui n'avaient pas encore été formalisées et insérées dans KaliLab. A ce sujet, et contrairement aux LBM polyvalents qui effectuent le dépistage sérologique de la toxoplasmose par des techniques automatisées détectant uniquement les IgG et les IgM spécifiques, l'UF de Parasitologie - Mycologie dispose d'un panel de techniques sérologiques afin de réaliser une expertise sérologique complète permettant de répondre aux différents problèmes posés par le diagnostic de toxoplasmose.

Tout d'abord, il nous a fallu bien comprendre ces différentes techniques avec leurs caractéristiques, et leurs performances respectives. De plus, leur utilisation dans un ordre précis nécessite que soient expliqués dans les procédures, à l'aide de références bibliographiques, les éléments justifiant de leur positionnement dans ces stratégies. Cette partie de notre travail a été réalisée par une recherche bibliographique approfondie, la confrontation quotidienne avec les dossiers sérologiques complexes dans le cadre des expertises. Les échanges à ce sujet avec les biologistes de l'UF et la validation des dossiers d'expertises sérologiques, après obtention de l'habilitation correspondante, nous ont permis de nous familiariser assez rapidement à l'ensemble de l'activité pour comprendre et rédiger ces procédures.

Dans la phase postanalytique, nous avons également revu la gestion de la sérothèque. Nous avons d'abord vérifié que les échantillons étaient conservés après analyse selon les modalités de conservation préconisées par la législation en vigueur. Or, les recommandations figurant dans les documents de référence peuvent diverger. Cela concerne notamment la température de conservation des échantillons de sérum. En effet, le RÉMIC recommande dans le domaine des sérologies parasitaires une température de -30 °C pour la conservation des sérums pendant au moins 1 an (161). Or au sein de l'UF, les échantillons de sérum sont conservés dans des congélateurs à -20 °C. Néanmoins, selon une étude récente, à partir de plus de 240 échantillons de sérum conservés à -20 °C pendant 7 ans, il n'a été constaté aucune variation significative des résultats de dosage des IgG et IgM antitoxoplasmiques obtenus par technique ELISA sur l'automate VIDAS (bioMérieux) (177). Sur cette base, la température de  $-22 \pm 4$  °C a été retenue pour conserver les échantillons de sérum pendant la période minimale d'1 an, délai qui figure par ailleurs dans le texte réglementaire.

En lien avec le travail entrepris dans le cadre de cette démarche d'accréditation, nous avons organisé avec l'aide d'une technicienne référente de l'UF de Virologie, des formations destinées aux techniciennes de l'UF de Parasitologie - Mycologie pour l'utilisation des logiciels OneLink et URT. Le logiciel OneLink est principalement utilisé par le technicien de l'UF de Virologie qui a en charge l'Architect i2000 sur le PTA, mais il peut parfois être nécessaire pour une technicienne de l'UF de Parasitologie - Mycologie de l'utiliser pour repérer un échantillon, ou pour déterminer l'origine du problème lorsqu'un résultat tarde à remonter dans l'interface GLIMS. Quant à la formation au logiciel URT, cette démarche est tout à fait cohérente avec le fonctionnement actuel. La maîtrise de cet outil permet ainsi aux techniciennes de l'UF de Parasitologie - Mycologie de prendre connaissance des résultats des CIQ sur URT en amont de leur étape de confirmation dans GLIMS des résultats des dosages d'IgG et d'IgM antitoxoplasmiques sur l'Architect i2000.

Afin de clôturer et de valider l'ensemble du travail qui a déjà été réalisé dans cette démarche d'accréditation, il a été proposé d'organiser un audit croisé pour évaluer le travail entrepris de manière objective par des auditeurs venant d'un établissement extérieur. A l'issue de l'évaluation sur site réalisée début juillet par des auditeurs du CH de Cholet, aucun écart n'a été relevé. De nombreux points positifs ont été mis en évidence, et quelques axes d'amélioration ont été proposés en référence au chapitre 4 « exigences relatives au management » et chapitre 5 « exigences techniques » de la norme.

Pour ce qui concerne ces exigences techniques du chapitre 5, trois axes d'amélioration ont été donnés. Le premier concerne la fiche de vie de l'automate Architect i2000 dans laquelle devra être programmé le rappel pour la réalisation de la maintenance du fournisseur dans un but préventif.

Par ailleurs, pour le deuxième axe, les auditeurs nous ont demandé de clarifier au sein d'un de nos documents notre gestion des notices des calibrateurs de l'Architect i2000.

Enfin, le troisième axe d'amélioration correspond à une correction qu'il conviendra d'apporter sur le compte-rendu des résultats d'analyses de sérodiagnostic de la toxoplasmose communiqué au CH de Saumur de façon dématérialisée (format GRB). Il conviendra de rajouter sur ce compte-rendu les valeurs seuils et zones grises des tests Toxo IgG® et Toxo IgM® qui n'apparaissaient pas pour l'instant.

Pour ce qui concerne les exigences relatives au management, 2 axes d'amélioration ont été fixés par les auditeurs. Le premier concerne les organismes de formation qui devront faire l'objet d'une évaluation. Cet axe d'amélioration pourra être résolu par la cellule Qualité, en mettant en place un questionnaire ou une grille type à l'issue de chaque formation destinée au personnel du PBH. Ainsi, la cellule Qualité disposera d'informations permettant d'évaluer ces organismes, qui pourront ensuite faire l'objet d'un bilan annuel lors de la revue de Direction. Quant au deuxième axe qui concerne plus spécifiquement l'UF de Virologie, les auditeurs ont demandé que soit formalisé au sein d'un document, une revue des examens sous-traités.

Enfin, de manière générale, nous pouvons constater au travers de publications relatant les expériences de différents laboratoires dans cette démarche d'accréditation qu'à des degrés divers, les mêmes problématiques et les mêmes difficultés sont rencontrées (172,178). Elles concernent notamment la gestion des compétences du personnel, l'harmonisation des pratiques au sein de la gestion documentaire, la définition des limites acceptables pour les résultats des analyses, et notamment pour ce qui concerne les laboratoires spécialisés, l'élaboration des dossiers de vérification de méthodes des techniques manuelles. Pour pallier à ces problèmes, des groupes de travail se mettent en place afin d'accompagner les LBM dans leur démarche d'accréditation (52,175,179). Cette démarche qui demande un investissement permanent de l'ensemble du personnel des LBM depuis maintenant plusieurs années, peut être perçue comme une contrainte lourde, venant s'ajouter à une charge de travail déjà importante. Mais malgré ces difficultés, il faut garder à l'esprit les objectifs essentiels de tout ce travail qui doit garantir la fiabilité de l'ensemble des analyses de biologie médicale réalisées pour les patients.

## 4. Conclusion

Dans la démarche d'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 entreprise par le Plateau de Biologie Hospitalière du CHU d'Angers, l'UF de Parasitologie - Mycologie qui a déjà validé certaines étapes ces dernières années, a présenté en 2019 au COFRAC une demande d'accréditation des examens sérologiques de la toxoplasmose. Notre travail dans le cadre de cette thèse a consisté à mettre en place au sein de l'UF un ensemble de moyens et de mesures pour atteindre cet objectif.

Pour parvenir à l'accréditation de ces examens, nous avons dû prouver que l'ensemble de notre processus de prise en charge d'une demande de sérologie de la toxoplasmose, soit totalement maîtrisé jusqu'à la transmission du résultat au patient. Pour cela, l'analyse des risques de ce processus a été primordiale, nous permettant d'avoir une vision globale, par l'utilisation de la méthode des 5M, de l'ensemble des événements susceptibles d'interférer sur la qualité du résultat. Nous avons pu associer au moins un élément de maîtrise déjà en place pour chacun des points critiques de la phase préanalytique. Pour les phases analytique et postanalytique, il nous a été nécessaire de revoir ou d'élaborer certains moyens afin de maîtriser l'ensemble des risques.

Nous avons construit les différents dossiers de vérification de méthodes qui nous ont permis d'évaluer les performances analytiques des techniques utilisées dans l'UF pour le sérodiagnostic de la toxoplasmose. Ces dossiers ont ainsi été rédigés pour les 2 tests de dépistage effectués sur l'automate Architect i2000 ainsi que pour la plupart des techniques sérologiques manuelles utilisées comme techniques d'expertise. Seule la détermination de l'avidité des IgG sur l'automate VIDAS 3 n'a pas été vérifiée et pour ce qui concerne le volet sérologique de la toxoplasmose, il conviendra donc de réaliser cet ultime dossier de vérification de méthode avant l'échéance de fin 2020.

Lors de la rédaction de ces dossiers de vérification de méthodes, nous nous sommes aperçue que certaines pratiques avaient besoin d'être mieux maîtrisées, et nous nous sommes donc attachée à proposer des solutions d'amélioration. Pour la partie automatisée sur l'Architect i2000, une amélioration importante a consisté à mettre en place un système de gestion des Contrôles Internes de Qualité à court, moyen et long terme. Avec l'aide de l'UF de Virologie et en tenant compte des différentes contraintes liées à l'utilisation de l'automate, nous avons ainsi défini précisément ce qui constitue une série d'analyses, permettant alors d'adapter la gestion quotidienne des CIQ sur cet automate. Nous avons également rédigé les procédures permettant la gestion à moyen et à long terme de ces CIQ. Leur suivi sur une longue période permettra, si besoin, d'ajuster la stratégie actuellement mise en place avec éventuellement l'ajout d'actions correctives ou préventives.

Nous avons formalisé l'ensemble de cette gestion des CIQ dans des documents insérés dans le logiciel KaliLab. En parallèle de l'élaboration des dossiers de vérification de méthodes, nous avons également rédigé un certain nombre de documents opérationnels accompagnés parfois de formulaires. Pour certains documents, nous avons procédé à une période d'essai par l'équipe technique avant de les ajuster aux besoins des utilisateurs. Nous avons également rédigé les procédures dégradées des 2 automates utilisés dans le sérodiagnostic de la toxoplasmose. En fonction des évolutions de l'activité analytique, ces différents documents qui ont été diffusés dans KaliLab pourront faire l'objet d'ajustements ultérieurs.

Nous avons également consacré une partie importante de notre travail à rédiger les stratégies de diagnostic de la toxoplasmose. Ces stratégies étaient déjà en place dans l'UF depuis plusieurs années mais n'avaient pas encore été mises en forme pour les besoins de l'accréditation. Or, pour l'UF de Parasitologie - Mycologie qui exerce le rôle de laboratoire expert dans le diagnostic de la toxoplasmose, ces stratégies sont complexes reposant sur un panel de techniques sérologiques mises en œuvre graduellement et selon le contexte clinique. Il était donc très important pour l'UF de pouvoir disposer désormais de ces procédures qui ont été rédigées en utilisant des logigrammes afin de mieux visualiser les différentes démarches diagnostiques. Là encore, ces logigrammes pourront faire l'objet de modifications ultérieures tenant compte à la fois des évolutions techniques, et des recommandations officielles, notamment du CNR de la toxoplasmose.

Les résultats obtenus à l'issue de cette phase analytique sont validés par le biologiste qui doit interpréter précisément l'ensemble du bilan sérologique en fonction du contexte clinique du patient. Or, dans la situation d'un laboratoire expert confronté à des dossiers clinico-biologiques multiples et complexes, il paraissait assez difficile de rassembler dans un seul document toute cette phase de validation. C'est pourquoi après avoir rédigé un document général décrivant les modalités de validation des examens de la toxoplasmose, nous avons choisi de mettre en place plusieurs documents correspondant au diagnostic de la toxoplasmose chez un patient immunocompétent dont la femme enceinte, au diagnostic chez un patient immunodéprimé, et enfin au diagnostic anténatal et postnatal de la toxoplasmose congénitale. Pour ne pas multiplier les documents et alourdir cette étape, les commentaires proposés pour interpréter les dossiers ont ainsi été adossés aux logigrammes présentant les différents profils rencontrés à l'issue du bilan sérologique. Si l'ensemble est assez exhaustif, toute cette étape de validation du sérodiagnostic de la toxoplasmose n'est pas aisée du fait de la multiplicité des profils sérologiques et des contextes cliniques. Il conviendra donc d'évaluer la praticabilité de ces documents une fois que les biologistes de l'UF auront pu se familiariser avec ces documents.

L'audit croisé qui a été organisé début juillet 2019 est venu valider le travail déjà réalisé puisqu'aucun écart n'a été relevé par les auditeurs du CH de Cholet. Mais si de nombreux éléments positifs ont été soulignés, il reste néanmoins à améliorer certains points concernant le management et quelques aspects techniques.

Au-delà de ce travail axé sur l'accréditation de la sérologie de la toxoplasmose, la démarche que nous avons suivie pourra être réutilisée pour accréditer les autres paramètres inclus dans cette même ligne de portée BM MG01. Pour ce qui concerne le diagnostic de la toxoplasmose, il restera également à accréditer la technique de PCR qui s'inscrit dans une autre ligne de portée BM PM04.

D'une manière générale, la démarche d'accréditation au sein d'un LBM nécessite la mobilisation de nombreuses ressources tant sur le plan humain que sur le plan matériel. Elle est souvent perçue comme une contrainte supplémentaire dans l'activité quotidienne déjà chargée du biologiste ou du technicien. Néanmoins, il convient de rappeler que l'objectif premier de l'accréditation des LBM est de pouvoir fournir un résultat d'analyse fiable et adapté à la demande du prescripteur. Ainsi, nous avons pu constater au cours de ce travail, l'importance de la collaboration, de l'implication et de la motivation de l'ensemble du personnel pour parvenir à atteindre ces objectifs.

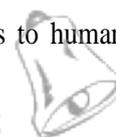
## Bibliographie

1. Ammar H. Historique de la qualité [Internet]. [cité 19 mai 2019]. Disponible sur: <http://plusconseil.net/content/wp-content/uploads/2010/04/HistoriqueQualite.pdf>
2. Chardonnet A, Thibaudon D. Le guide du PDCA de Deming. Editions d'Organisation; 2002. 400 p.
3. Martinez F. Les principes généraux de la qualité. Actualité et dossier en santé publique. 2001;(35):18-23.
4. Juran J, Blanton Godfrey A. Juran's Quality Handbook. McGraw-Hill Professional; 2000. 1872 p.
5. Roesslinger F, Siegel D. Partie I. Le management de la qualité. In: Management stratégique et management de la qualité - Les apports de la version 2015 de la norme NF EN ISO 9001. Association française de normalisation. 2015. p. 1-10.
6. Feigenbaum A. Total Quality Control. McGraw-Hill Professional; 2004. 896 p.
7. Ishikawa K. La gestion de la qualité: Outils et applications pratiques. Dunod; 1984. 242 p.
8. Association Trois-Dimensions Consulting. Trois-Dimensions Consulting [Internet]. [cité 17 août 2019]. Disponible sur: <https://3dc.asso-web.com/>
9. ISO. Il était une fois l'ISO [Internet]. [cité 26 mai 2019]. Disponible sur: <http://www.iso.org/cms/render/live/fr/sites/isoorg/home/about-us/the-iso-story.html>
10. Comité Européen de Normalisation (CEN). European Committee for Standardization [Internet]. [cité 26 mai 2019]. Disponible sur: <https://www.cen.eu/Pages/default.aspx>
11. Association Française de Normalisation (AFNOR). La normalisation en France [Internet]. [cité 26 mai 2019]. Disponible sur: <https://normalisation.afnor.org/la-normalisation-en-france/>
12. ISO. ISO 9000:2015 (fr) Systèmes de management de la qualité - Principes essentiels et vocabulaire [Internet]. [cité 26 mai 2019]. Disponible sur: <https://www.iso.org/obp/ui/fr/#iso:std:iso:9000:ed-4:v2:fr>
13. ISO. ISO 9001:2015 (fr) Systèmes de management de la qualité - Exigences [Internet]. [cité 26 mai 2019]. Disponible sur: <https://www.iso.org/obp/ui/fr/#iso:std:iso:9001:ed-5:v2:fr>
14. ISO. ISO 9004:2018 (fr) Management de la qualité - Qualité d'un organisme - Lignes directrices pour obtenir des performances durables [Internet]. [cité 26 mai 2019]. Disponible sur: <https://www.iso.org/obp/ui/fr/#iso:std:iso:9004:ed-4:v1:fr>
15. République française. Loi n° 75-626 du 11 juillet 1975 relative aux laboratoires d'analyses de biologie médicale et à leurs directeurs et directeurs adjoints [Internet]. Journal Officiel de la République Française. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000522105>
16. République française. Décret n° 94-1049 du 2 décembre 1994 relatif au contrôle de qualité des analyses de biologie médicale prévu par l'article L. 761-14 du code de la santé publique [Internet]. Journal Officiel de la République Française. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000185617>

17. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). Contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale (CNQ) [Internet]. [cité 27 mai 2019]. Disponible sur: [https://www.anism.sante.fr/Activites/Contrôle-national-de-qualite-des-analyses-de-biologie-medicale-CNQ/Qu-est-ce-que-le-contrôle-national-de-qualite/\(offset\)/1](https://www.anism.sante.fr/Activites/Contrôle-national-de-qualite-des-analyses-de-biologie-medicale-CNQ/Qu-est-ce-que-le-contrôle-national-de-qualite/(offset)/1)
18. Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE). ENV/MC/CHEM(98)17 Série sur les principes de Bonnes Pratiques de Laboratoire et vérification du respect de ces principes [Internet]. [cité 27 mai 2019]. Disponible sur: <http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/mc/chem%2898%2917&doClanguage=fr>
19. Comité Français d'Accréditation (COFRAC). Évaluer les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) [Internet]. [cité 5 juin 2019]. Disponible sur: <https://www.cofrac.fr/nos-services/evaluer-les-bonnes-pratiques-de-laboratoires-bpl/>
20. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). Les principes de bonnes pratiques de laboratoire [Internet]. [cité 5 juin 2019]. Disponible sur: [https://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/4bb32bfc26c1a77e3a3b1bf6f072c627.pdf](https://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/4bb32bfc26c1a77e3a3b1bf6f072c627.pdf)
21. Comité Français d'Accréditation (COFRAC). Règlement pour l'évaluation de la conformité aux principes de Bonnes Pratiques de Laboratoire LAB BPL REF 05 - Révision 03 [Internet]. [cité 5 juin 2019]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/LAB-BPL-REF-05>
22. Tronel L. Normes de référence pour l'évaluation de la conformité [Internet]. [cité 27 mai 2019]. Disponible sur: <http://www.anales.org/ri/2002/446/tronel044-048.pdf>
23. République française. Loi n° 91-748 du 31 juillet 1991 portant réforme hospitalière [Internet]. Journal Officiel de la République Française. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000720668&categorieLien=id>
24. République française. Ordonnance n° 96-346 du 24 avril 1996 portant réforme de l'hospitalisation publique et privée [Internet]. Journal Officiel de la République Française. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000742206&categorieLien=id>
25. Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé (ANAES). Manuel d'accréditation des établissements de santé: deuxième procédure d'accréditation Septembre 2004 [Internet]. [cité 26 mai 2019]. Disponible sur: <https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/accréditation.pdf>
26. Haute Autorité de Santé (HAS). Manuel de certification des établissements de santé V2010 : Direction de l'amélioration de la qualité et de la sécurité des soins [Internet]. [cité 27 mai 2019]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2014-03/manuel\\_v2010\\_janvier2014.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2014-03/manuel_v2010_janvier2014.pdf)
27. Haute Autorité de Santé (HAS). La lettre d'information de la Haute Autorité de Santé - Certification - Les établissements de santé passent à la vitesse supérieure [Internet]. [cité 27 mai 2019]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/lettre\\_has\\_n\\_5.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/lettre_has_n_5.pdf)
28. République française. Arrêté du 2 novembre 1994 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale [Internet]. Journal Officiel de la République Française. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000184973&categorieLien=id>

29. République française. Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale [Internet]. Journal Officiel de la République Française. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000580061>
30. République française. Arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale [Internet]. Journal Officiel de la République Française. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000778935&categorieLien=id>
31. Rogowski J, Annaix V. Norme NF EN ISO 15189: analyse comparative avec le GBEA et mise en place du nouveau référentiel. *Ann Biol Clin.* 2010;68(3):367-77.
32. Lalande F, Yeni I, Laconde C. La biologie médicale libérale en France : bilan et perspectives [Internet]. [cité 18 mai 2019]. Disponible sur: [https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/rapport\\_IGAS\\_2006.pdf](https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/rapport_IGAS_2006.pdf)
33. Ballereau M. Rapport pour un projet de réforme de la biologie médicale [Internet]. [cité 28 avr 2019]. Disponible sur: [https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport\\_pour\\_la\\_biologie\\_medicale.pdf](https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_pour_la_biologie_medicale.pdf)
34. République française. Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale [Internet]. Journal Officiel de la République Française. Disponible sur: [https://www.legifrance.gouv.fr/jo\\_pdf.do?id=JORFTEXT000021683301](https://www.legifrance.gouv.fr/jo_pdf.do?id=JORFTEXT000021683301)
35. République française. Rapport au Président de la République relatif à l'ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale [Internet]. Journal Officiel de la République Française. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000021683276&categorieLien=id>
36. République française. Loi n° 2013-442 du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale [Internet]. Journal Officiel de la République Française. Disponible sur: [https://www.legifrance.gouv.fr/jo\\_pdf.do?id=JORFTEXT000027478077](https://www.legifrance.gouv.fr/jo_pdf.do?id=JORFTEXT000027478077)
37. Comité Français d'Accréditation (COFRAC). Les laboratoires de biologie médicale poursuivent leur démarche d'accréditation [Internet]. [cité 3 juin 2019]. Disponible sur: <https://www.cofrac.fr/qui-sommes-nous/toutes-nos-actualites/detail-dactualite/news/detail/News/les-laboratoires-de-biologie-medecale-poursuivent-leur-demarche-d-accreditation/>
38. Comité Français d'Accréditation (COFRAC). Règlement d'accréditation SH REF 05 - Révision 11 [Internet]. [cité 2 juin 2019]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-REF-05>
39. Association Française de Normalisation (AFNOR). Norme NF EN ISO 15189 (décembre 2012): laboratoires de biologie médicale. Exigences concernant la qualité et la compétence. AFNOR; 2012. 52 p.
40. Comité Français d'Accréditation (COFRAC). Portées-types d'accréditation SH INF 50 - Révision 06 [Internet]. [cité 2 juin 2019]. Disponible sur: [https://www.cofrac.fr/fileadmin/SH-INF-50\\_rev\\_06.pdf](https://www.cofrac.fr/fileadmin/SH-INF-50_rev_06.pdf)
41. Comité Français d'Accréditation (COFRAC). Présentation générale du COFRAC [Internet]. [cité 2 juin 2019]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/fr/cofrac>
42. Comité Français d'Accréditation (COFRAC). L'accréditation vue par les laboratoires de biologie médicale [Internet]. [cité 2 juin 2019]. Disponible sur: [https://www.cofrac.fr/fileadmin/user\\_upload/competences\\_75HS\\_0118.pdf](https://www.cofrac.fr/fileadmin/user_upload/competences_75HS_0118.pdf)

43. Comité Français d'Accréditation (COFRAC). Accueil | COFRAC - Comité français d'accréditation [Internet]. [cité 29 juin 2019]. Disponible sur: <https://www.cofrac.fr/>
44. Comité Français d'Accréditation (COFRAC). Expression et évaluation des portées d'accréditation SH REF 08 - Révision 05 [Internet]. [cité 2 juin 2019]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-REF-08>
45. Comité Français d'Accréditation (COFRAC). SH News #14 - La newsletter de la section Santé Humaine du COFRAC [Internet]. [cité 3 juin 2019]. Disponible sur: <http://pf57.r.a.d.sendibm1.com/19f53p7hgg3jf.html>
46. Comité Français d'Accréditation (COFRAC). SH News #17 - La newsletter de la section Santé Humaine du COFRAC [Internet]. [cité 3 juin 2019]. Disponible sur: [http://2140v.r.a.d.sendibm1.com/mk/mr/8cXIpptQee2h-NUINRgKTLrJmnYdlRVh1VdLXhCONf2FFIj7\\_WqhT\\_LN0zDDKRQ8v9osTF99NOZ\\_W-mc-JEwoecK-ASeJUz9rpx7NodFMu153M](http://2140v.r.a.d.sendibm1.com/mk/mr/8cXIpptQee2h-NUINRgKTLrJmnYdlRVh1VdLXhCONf2FFIj7_WqhT_LN0zDDKRQ8v9osTF99NOZ_W-mc-JEwoecK-ASeJUz9rpx7NodFMu153M)
47. Comité Français d'Accréditation (COFRAC). Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale SH GTA 04 - Révision 01 [Internet]. [cité 3 juin 2019]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
48. République française. Direction générale des entreprises: Libre circulation des marchandises en Europe / Free movement of goods in Europe [Internet]. [cité 10 juill 2019]. Disponible sur: <https://www.entreprises.gouv.fr/libre-circulation-marchandises/marquage-CE>
49. Société Française de Microbiologie (SFM). TOME I. Référentiel en Microbiologie Médicale (RÉMIC). SFM. 2018. 476 p.
50. Société Française de Microbiologie (SFM). TOME II. Référentiel en Microbiologie Médicale (RÉMIC). SFM. 2018. 477-966 p.
51. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL). Parasitologie et mycologie médicales - Guide des analyses et pratiques diagnostiques. Elsevier Masson; 2017. 497 p.
52. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL). Association française des enseignants et praticiens hospitaliers titulaires de parasitologie et mycologie médicales: Validation des méthodes [Internet]. [cité 13 août 2019]. Disponible sur: <https://anofel.net/hopital/validation-des-methodes/#para-myc>
53. Davenel S, Galaine J, Guelet B, Marteil S, Robert-Gangneux F. La toxoplasmose congénitale en France en 2009. J Pharm Clin. 2010;29(1):5-30.
54. Robert-Gangneux F, Darde ML. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev. 2012;25(2):264-96.
55. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Taxonomy Browser - *Toxoplasma gondii* [Internet]. [cité 7 avr 2019]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5811&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
56. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000;30(12-13):1217-58.



57. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(2):267-99.
58. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8:634-40.
59. Derouin F, Bultel C, Roze S. Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation - Rapport du groupe de travail « *Toxoplasma gondii* » de l'Afssa [Internet]. [cité 23 avr 2019]. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC-Ra-Toxoplasmose.pdf>
60. Pereira KS, Franco RMB, Leal DAG. Chap 1. Transmission of Toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) by Foods. In: *Advances in Food and Nutrition Research.* Elsevier Masson; 2010. p. 1-19.
61. Belluco S, Simonato G, Mancin M, Pietrobelli M, Ricci A. *Toxoplasma gondii* infection and food consumption: A systematic review and meta-analysis of case-controlled studies. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018;58(18):3085-96.
62. Belluco S, Mancin M, Conficoni D, Simonato G, Pietrobelli M, Ricci A. Investigating the Determinants of *Toxoplasma gondii* Prevalence in Meat: A Systematic Review and Meta-Regression. *PLoS ONE.* 2015;11(4):1-24.
63. Lundén A, Ugglå A. Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. *Int J Food Microbiol.* 1992;15(3-4):357-63.
64. El-Nawawi FA, Tawfik MA, Shaapan RM. Methods for Inactivation of *Toxoplasma gondii* Cysts in Meat and Tissues of Experimentally Infected Sheep. *Foodborne Pathog Dis.* 2008;5(5):687-90.
65. Dard C, Marty P, Brenier-Pinchart MP, Garnaud C, Fricker-Hidalgo H, Pelloux H, et al. Management of toxoplasmosis in transplant recipients: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2018;16(6):447-60.
66. Derouin F, Pelloux H. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(12):1089-101.
67. Robert-Gangneux F, Meroni V, Dupont D, Botterel F, Garcia JMA, Brenier-Pinchart MP, et al. Toxoplasmosis in Transplant Recipients, Europe, 2010–2014. *Emerging Infect Dis.* 2018;24(8):1497-504.
68. Robert-Gangneux F, Murat JB, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Gangneux JP, Pelloux H. The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis ? *Trends Parasitol.* 2011;27(12):530-6.
69. Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *The Lancet.* 1999;353(9167):1829-33.
70. Thiébaud R, Leproust S, Chêne G, Gilbert R. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. *The Lancet.* 2007;369(9556):115-22.
71. Ancelle T, Goulet V, Tirard-Fleury V, Baril L, du Mazaubrun C, Thulliez P, et al. La Toxoplasmose chez la femme enceinte en France en 1995. Résultats d'une enquête nationale périnatale [Internet]. [cité 23 avr 2019]. Disponible sur: [http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/1996/9651/beh\\_51\\_1996.pdf](http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/1996/9651/beh_51_1996.pdf)
72. Berger F, Goulet V, Le Strat Y, Desenclos JC. Toxoplasmose chez les femmes enceintes en France : évolution de la séroprévalence et de l'incidence et facteurs associés, 1995-2003 [Internet]. [cité 23 avr 2019]. Disponible sur: [http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2008/14\\_15/beh\\_14\\_15\\_2008.pdf](http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2008/14_15/beh_14_15_2008.pdf)

73. Centre National de Référence de la Toxoplasmose. Rapport annuel d'activités du Centre National de Référence de la Toxoplasmose [Internet]. [cité 23 avr 2019]. Disponible sur: <http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/wp-content/uploads/2019/03/Rapport-CNR-Toxoplasmose-2018-18042018-Final.pdf>
74. Tourdjman M, Tchéandjieu C, De Valk H, Goulet V, Le Strat Y. Toxoplasmose chez les femmes enceintes en France : Evolution de la séroprévalence et des facteurs associés entre 1995 et 2010, à partir des Enquêtes Nationales Périnatales [Internet]. [cité 23 avr 2019]. Disponible sur: [http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2015/15-16/pdf/2015\\_15-16\\_5.pdf](http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2015/15-16/pdf/2015_15-16_5.pdf)
75. Centre National de Référence de la Toxoplasmose. Surveillance de la Toxoplasmose [Internet]. [cité 24 avr 2019]. Disponible sur: [http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/?page\\_id=246](http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/?page_id=246)
76. Centre National de Référence de la Toxoplasmose. Surveillance de la Toxoplasmose - Année 2017 [Internet]. [cité 24 avr 2019]. Disponible sur: <http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/wp-content/uploads/2019/04/Diagnostic-de-la-toxoplasmose-2017-n153-.pdf>
77. Baril L, Ancelle T, Thulliez P, Goulet V, Tirard V, Carme B. Facteurs de risque d'acquisition de la toxoplasmose chez les femmes enceintes en 1995 (France) [Internet]. [cité 24 avr 2019]. Disponible sur: [http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/1996/9616/beh\\_16\\_1996.pdf](http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/1996/9616/beh_16_1996.pdf)
78. Haute Autorité de Santé (HAS). Diagnostic biologique de la toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent (dont la femme enceinte), la toxoplasmose congénitale (diagnostic pré- et postnatal) et la toxoplasmose oculaire [Internet]. [cité 24 avr 2019]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-02/argumentaire\\_toxoplasmose\\_me\\_to.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-02/argumentaire_toxoplasmose_me_to.pdf)
79. Haute Autorité de Santé (HAS). Surveillance sérologique et prévention de la toxoplasmose et de la rubéole au cours de la grossesse et dépistage prénatal de l'hépatite B – Pertinence des modalités de réalisation [Internet]. [cité 24 avr 2019]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_893585/fr/surveillance-serologique-et-prevention-de-la-toxoplasmose-et-de-la-rubeole-au-cours-de-la-grossesse-et-depistage-prenatal-de-l-hepatite-b-pertinence-des-modalites-de-realisation](https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_893585/fr/surveillance-serologique-et-prevention-de-la-toxoplasmose-et-de-la-rubeole-au-cours-de-la-grossesse-et-depistage-prenatal-de-l-hepatite-b-pertinence-des-modalites-de-realisation)
80. Centre National de Référence de la Toxoplasmose. Rapport annuel d'activités du Centre National de Référence de la Toxoplasmose [Internet]. [cité 23 avr 2019]. Disponible sur: <http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/wp-content/uploads/2019/07/CNR-RAPPORT-2019-010419.pdf>
81. Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, Bessières M, Thulliez P, Filisetti D, et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* Isolates Associated with Human Congenital Toxoplasmosis, and Correlation with Clinical Findings. *J Infect Dis.* 2002;186(5):684-9.
82. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease. *J Infect Dis.* 1995;172(6):1561-6.
83. Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, et al. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection : Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;84(1):22-33.
84. Dardé M, Villard, O, Villena I. Chap 110. Toxoplasmose. In: TOME II Référentiel en microbiologie médicale (RÉMIC). SFM; 2018. p. 877-88.
85. Montoya J, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *The Lancet.* 2004;363(9425):1965-76.

86. Sauer A, Villard O, Bourcier T, Speeg-Schatz C, Candolfi E. Toxoplasmose oculaire: de la physiopathologie au diagnostic microbiologique. *J Fr Ophtalmol*. 2013;36(1):76-81.
87. Khan K, Khan W. Congenital toxoplasmosis: An overview of the neurological and ocular manifestations. *Parasitol Int*. 2018;67(6):715-21.
88. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL). eAnofel [Internet]. [cité 8 mai 2019]. Disponible sur: [http://www.eanofel.fr/4daction/w3\\_CatVisu/en/Articles.html?wCatIDAdmin=6#&panel1-1](http://www.eanofel.fr/4daction/w3_CatVisu/en/Articles.html?wCatIDAdmin=6#&panel1-1)
89. Berrébi A, Assouline C, Bessières MH, Lathière M, Cassaing S, Minville V, et al. Long-term outcome of children with congenital toxoplasmosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;203(6):552.e1-552.e6.
90. Haute Autorité de Santé (HAS). Diagnostic biologique de la toxoplasmose chez les patients immunodéprimés - Patients infectés par le VIH, greffés de cellules souches hématopoïétiques et transplantés d'organe [Internet]. [cité 24 avr 2019]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-05/dir108/argumentaire\\_toxoplasmose\\_id.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-05/dir108/argumentaire_toxoplasmose_id.pdf)
91. Campus de Parasitologie-Mycologie - Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL). Toxoplasmose [Internet]. [cité 13 juill 2019]. Disponible sur: <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/toxoplasmose/site/html/6.html>
92. République française. Avis du 1er février 2017 du collège de la Haute Autorité de Santé relatif à la modification de la liste des actes et prestations mentionnée à l'article L. 162-1-7 du code de la sécurité sociale portant sur l'actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic biologique de la toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent (dont la femme enceinte), de la toxoplasmose congénitale (diagnostic pré- et postnatal) et de la toxoplasmose oculaire [Internet]. *Journal Officiel de la République Française*. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2017-02/ac\\_2017\\_00012\\_modif\\_liste\\_actes\\_toxoplasmose\\_oculaire.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2017-02/ac_2017_00012_modif_liste_actes_toxoplasmose_oculaire.pdf)
93. République française. Avis du 24 mai 2017 du collège de la Haute Autorité de Santé relatif à la modification de la liste des actes et prestations mentionnée à l'article L. 162-1-7 du code de la sécurité sociale portant sur l'actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic biologique de la toxoplasmose chez les patients immunodéprimés, en particulier les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine, greffés de cellules souches hématopoïétiques et transplantés d'organe [Internet]. *Journal Officiel de la République Française*. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2017-05/dir108/ac\\_2017\\_0058\\_toxoplasmose\\_id.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2017-05/dir108/ac_2017_0058_toxoplasmose_id.pdf)
94. Dard C, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Pelloux H. Relevance of and New Developments in Serology for Toxoplasmosis. *Trends Parasitol*. 2016;32(6):492-506.
95. Villard O, Jung-Étienne J, Cimon B, Franck J, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, et al. Sérodiagnostic de la toxoplasmose en 2010 : conduite à tenir et interprétation en fonction des profils sérologiques obtenus par les méthodes de dépistage. *Feuill Biol*. 2011;52(298):43-9.
96. Bessières MH, Cassaing S, Fillaux J, Berrebi A. Toxoplasmose et grossesse. *Revue Francophone des Laboratoires (RFL)*. 2008;(402):39-50.
97. Bessières MH, Roques C, Berrebi A, Barre V, Cazaux M, Seguela JP. IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis. *J Clin Pathol*. 1992;45(7):605-8.

98. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale [Internet]. [cité 10 août 2019]. Disponible sur: [https://www.anism.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/58d4545107044f9f280ab180499b5b00.pdf](https://www.anism.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/58d4545107044f9f280ab180499b5b00.pdf)
99. Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. *Scand J Infect Dis*. 2012;44(11):805-14.
100. Prusa AR, Hayde M, Unterasinger L, Pollak A, Herkner KR, Kasper DC. Evaluation of the Roche Elecsys Toxo IgG and IgM electrochemiluminescence immunoassay for the detection of gestational *Toxoplasma* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;68(4):352-7.
101. Sickinger E, Gay-Andrieu F, Jonas G, Schultess J, Stieler M, Smith D, et al. Performance characteristics of the new ARCHITECT Toxo IgG and Toxo IgG Avidity assays. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;62(3):235-44.
102. Sickinger E, Braun HB, Praast G, Stieler M, Gundlach C, Birkenbach C, et al. Evaluation of the Abbott ARCHITECT Toxo IgM assay. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;64(3):275-82.
103. Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, et al. Help in the Choice of Automated or Semiautomated Immunoassays for Serological Diagnosis of Toxoplasmosis: Evaluation of Nine Immunoassays by the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2016;54(12):3034-42.
104. Armengol C, Cassaing S, Roques-Malecaze C, Chauvin P, Iriart X, Berry A, et al. Time before anti-*Toxoplasma* IgG seroconversion detection by 7 commercial assays in French pregnant women. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;87(2):103-7.
105. Holec-Gaşior L. *Toxoplasma gondii* Recombinant Antigens as Tools for Serodiagnosis of Human Toxoplasmosis: Current Status of Studies. *Clin Vaccine Immunol*. 2013;20(9):1343-51.
106. Reiter-Owona I, Petersen E, Joynson D, Aspöck H, Darde ML, Disko R, et al. The past and present role of the Sabin - Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Bull World Health Organ*. 1999;77(11):929-35.
107. Murat JB, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Pelloux H. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013;11(9):943-56.
108. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL). Chap 10. Techniques d'immunofluorescence. In: *Parasitologie et mycologie médicales - Guide des analyses et pratiques diagnostiques*. Elsevier Masson; 2017. p. 183-5.
109. Araujo FG, Barnett EV, Gentry LO, Remington JS. False-Positive Anti-*Toxoplasma* Fluorescent-Antibody Tests in Patients with Antinuclear Antibodies. *Appl Microbiol*. 1971;22(3):270-5.
110. Hyde B, Barnett EV, Remington JS. Method for Differentiation of Nonspecific from Specific *Toxoplasma* IgM Fluorescent Antibodies in Patients with Rheumatoid Factor. *Exp Biol Med*. 1975;148(4):1184-8.
111. Desmonts G, Remington JS. Direct Agglutination Test for Diagnosis of *Toxoplasma* Infection: Method for Increasing Sensitivity and Specificity. *J Clin Microbiol*. 1980;11(6):7.

112. Villard O, Cimon B, Franck J, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, et al. Evaluation of the usefulness of six commercial agglutination assays for serologic diagnosis of toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73(3):231-5.
113. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL). Chap 8. Techniques d'agglutination. In: *Parasitologie et mycologie médicales - Guide des analyses et pratiques diagnostiques.* Elsevier Masson; 2017. p. 171-4.
114. Pinon JM, Chemla C, Villena I, Foudrinier F, Aubert D, Puygauthier-Toubas D, et al. Early Neonatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Value of Comparative Enzyme-Linked Immunofiltration Assay Immunological Profiles and Anti-*Toxoplasma gondii* Immunoglobulin M (IgM) or IgA Immunocapture and Implications for Postnatal Therapeutic Strategies. *J Clin Microbiol.* 1996;34(3):579-83.
115. Gras L, Gilbert R, Wallon M, Peyron F, Cortina-Borja M. Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies. *Epidemiol Infect.* 2004;132(3):541-8.
116. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL). Chap 11. Techniques de Western blot. In: *Parasitologie et mycologie médicales - Guide des analyses et pratiques diagnostiques.* Elsevier Masson; 2017. p. 187-92.
117. Franck J, Garin YJF, Dumon H. LDBio-Toxo II Immunoglobulin G Western Blot Confirmatory Test for Anti-Toxoplasma Antibody Detection. *J Clin Microbiol.* 2008;46(7):2334-8.
118. Rilling V, Dietz K, Krczal D, Enders G. Evaluation of a Commercial IgG/IgM Western Blot Assay for Early Postnatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003;22(3):174-80.
119. Robert-Gangneux F, Commere V, Tourte-Schaefer C, Dupouy-Camet J. Performance of a Western Blot Assay to Compare Mother and Newborn Anti-Toxoplasma Antibodies for the Early Neonatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999;18(9):648-54.
120. Pinon JM, Dumon H, Chemla C, Franck J, Petersen E, Lebech M, et al. Strategy for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Evaluation of Methods Comparing Mothers and Newborns and Standard Methods for Postnatal Detection of Immunoglobulin G, M, and A Antibodies. *J Clin Microbiol.* 2001;39(6):2267-71.
121. LDBIO Diagnostics. TOXOPLASMA Western blot IgG IgM - Technique d'immunoblot pour usage diagnostique in vitro - Notice d'utilisation. LDBIO Diagnostics. 2018. 24 p.
122. LDBIO Diagnostics. LDBIO TOXO II IgG CONFIRMATION - Technique d'immunoblot pour usage diagnostique in vitro - Notice d'utilisation. LDBIO Diagnostics. 2018. 24 p.
123. Villard O, Filisetti D, Roch Deries F, Garweg J, Flament J, Candolfi E. Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Immunoblotting, and PCR for Diagnosis of Toxoplasmic Chorioretinitis. *J Clin Microbiol.* 2003;41(8):3537-41.
124. Fekkar A, Bodaghi B, Touafek F, Le Hoang P, Mazier D, Paris L. Comparison of Immunoblotting, Calculation of the Goldmann-Witmer Coefficient, and Real-Time PCR Using Aqueous Humor Samples for Diagnosis of Ocular Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2008;46(6):1965-7.

125. Villard O, Breit L, Cimon B, Franck J, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, et al. Comparison of Four Commercially Available Avidity Tests for *Toxoplasma gondii*-Specific IgG Antibodies. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(2):197-204.
126. Murat JB, L'Ollivier C, Fricker Hidalgo H, Franck J, Pelloux H, Piarroux R. Evaluation of the New Elecsys Toxo IgG Avidity Assay for Toxoplasmosis and New Insights into the Interpretation of Avidity Results. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19(11):1838-43.
127. Sensini A, Pascoli S, Marchetti D, Castronari R, Marangi M, Sbaraglia G, et al. IgG avidity in the serodiagnosis of acute *Toxoplasma gondii* infection: a multicenter study. *Clin Microbiol Infect.* 1996;2(1):25-9.
128. Pelloux H, Brun E, Vernet G, Marcillat S, Jolivet M, Guergour D, et al. Determination of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin G avidity: adaptation to the vidas system (bioMérieux). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998;32(2):69-73.
129. Pinon JM, Toubas D, Marx C, Mougeot G, Bonnin A, Bonhomme A, et al. Detection of Specific Immunoglobulin E in Patients with Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 1990;28(8):1739-43.
130. Murat JB, Souvignet A, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Bost-Bru C, Pelloux H, et al. Assessment of the IgA Immunosorbent Agglutination Assay for the Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis on a Series of 145 Toxoplasmic Seroconversions. *Clin Vaccine Immunol.* 2015;22(4):456-8.
131. Centre National de Référence de la Toxoplasmose. Centre National de Référence sur la Toxoplasmose – CHU de Reims [Internet]. [cité 29 juin 2019]. Disponible sur: <http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/>
132. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL). Chap 14. Techniques de PCR en point final et en temps réel. In: *Parasitologie et mycologie médicales - Guide des analyses et pratiques diagnostiques.* Elsevier Masson; 2017. p. 205-7.
133. Roux G, Varlet-Marie E, Bastien P, Sterkers Y. Evolution of Toxoplasma - PCR methods and practices: a French national survey and proposal for technical guidelines. *Int J Parasitol.* 2018;48(9-10):701-7.
134. Sterkers Y, Varlet-Marie E, Marty P, Bastien P, ANOFEL Toxoplasma-PCR Quality Control Group. Diversity and evolution of methods and practices for the molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis in France: a 4-year survey. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(10):1594-602.
135. Filisetti D, Sterkers Y, Brenier-Pinchart MP, Cassaing S, Dalle F, Delhaes L, et al. Multicentric Comparative Assessment of the Bio-Evolution *Toxoplasma gondii* Detection Kit with Eight Laboratory-Developed PCR Assays for Molecular Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2015;53(1):29-34.
136. Belaz S, Gangneux JP, Dupretz P, Guiguen C, Robert-Gangneux F. A 10-Year Retrospective Comparison of Two Target Sequences, REP-529 and B1, for *Toxoplasma gondii* Detection by Quantitative PCR. *J Clin Microbiol.* 2015;53(4):1294-300.
137. Kieffer F, Wallon M. Chap 112. Congenital toxoplasmosis. In: *Handbook of Clinical Neurology.* Elsevier Masson; 2013. p. 1099-101.

138. Wallon M, Franck J, Thulliez P, Huissoud C, Peyron F, Garcia-Meric P, et al. Accuracy of Real-Time Polymerase Chain Reaction for *Toxoplasma gondii* in Amniotic Fluid. *Obstet Gynecol.* 2010;115(4):727-33.
139. Sterkers Y, Pratlong F, Albaba S, Loubersac J, Picot MC, Pretet V, et al. Novel Interpretation of Molecular Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis According to Gestational Age at the Time of Maternal Infection. *J Clin Microbiol.* 2012;50(12):3944-51.
140. Robert-Gangneux F, Belaz S. Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis.* 2016;29(4):330-9.
141. Flori P, Chene G, Varlet MN, Sung RTM. *Toxoplasma gondii* serology in pregnant woman: characteristics and pitfalls. *Ann Biol Clin.* 2009;67(2):125-33.
142. Liesenfeld O, Montoya JG, Tathineni NJ, Davis M, Brown BW, Cobb KL, et al. Confirmatory serologic testing for acute toxoplasmosis and rate of induced abortions among women reported to have positive Toxoplasma immunoglobulin M antibody titers. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184(2):140-5.
143. Cimon B, Biquard F. Chap 34. Toxoplasmose. In: *Le Diagnostic prénatal en pratique.* Elsevier Masson; 2011. p. 351-60.
144. Filisetti D, Brenier-Pinchart MP, Sterkers Y, Villena I, Bastien P. Recommandations destinées aux professionnels de santé concernant le diagnostic par biologie moléculaire de la toxoplasmose congénitale [Internet]. [cité 2 juill 2019]. Disponible sur: <http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/wp-content/uploads/2012/06/Recommandations-Diagnostic-TC-biomol-janvier-2012.pdf>
145. Talabani H, Asseraf M, Yera H, Delair E, Ancelle T, Thulliez P, et al. Contributions of Immunoblotting, Real-Time PCR, and the Goldmann-Witmer Coefficient to Diagnosis of Atypical Toxoplasmic Retinochoroiditis. *J Clin Microbiol.* 2009;47(7):2131-5.
146. Ministère des solidarités et de la santé. Base de données publique des médicaments: ROVAMYCINE 3 MILLIONS UI, comprimé pelliculé [Internet]. [cité 14 juill 2019]. Disponible sur: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/extrait.php?specid=67535280>
147. Société Française de Néonatalogie. Toxoplasmose maternelle et congénitale : conduite diagnostique et thérapeutique [Internet]. [cité 8 juill 2019]. Disponible sur: <http://www.societe-francaise-neonatalogie.fr/wp-content/uploads/2017/01/PLM-toxo-CAT-janvier2017.pdf>
148. Ministère des solidarités et de la santé. Base de données publique des médicaments: MALOCIDE 50 mg, comprimé [Internet]. [cité 13 juill 2019]. Disponible sur: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/extrait.php?specid=67961885>
149. Ministère des solidarités et de la santé. Base de données publique des médicaments: ADIAZINE 500 mg, comprimé [Internet]. [cité 13 juill 2019]. Disponible sur: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/extrait.php?specid=66265330>
150. Ministère des solidarités et de la santé. Base de données publique des médicaments: LEDERFOLINE 25 mg, comprimé [Internet]. [cité 13 juill 2019]. Disponible sur: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/extrait.php?specid=66634770>
151. Montoya JG. Systematic screening and treatment of toxoplasmosis during pregnancy: is the glass half full or half empty? *Am J Obstet Gynecol.* 2018;219(4):315-9.

152. Moncada PA, Montoya JG. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10(7):815-28.
153. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS). Répertoire public des essais cliniques autorisés - Informations sur l'essai (en français) Étude TOSCANE [Internet]. [cité 8 juill 2019]. Disponible sur: [https://www.orpha.net/data/eth/FR/2009-016528-30\\_DESC.pdf](https://www.orpha.net/data/eth/FR/2009-016528-30_DESC.pdf)
154. Fortier B, Coignard-Chatain C, Dao A, Rouland V, Valat AS, Vinatier D, et al. Étude des poussées cliniques évolutives et des rebonds sérologiques d'enfants atteints de toxoplasmose congénitale et suivis durant les 2 premières années de vie. *Archives de Pédiatrie.* 1997;4(10):940-6.
155. Couvreur J. Toxoplasmose congénitale. Prise en charge et devenir. *Med Mal Infect.* 1993;23(1):176-82.
156. Butler NJ, Furtado JM, Winthrop KL, Smith JR. Ocular toxoplasmosis II: clinical features, pathology and management: Ocular toxoplasmosis. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2013;41(1):95-108.
157. Boboccea L, Spiridon S, Petrescu L, Gheorghe C, Purcarea V, Carol D, et al. The management of external marketing communication instruments in health care services. *J Med Life.* 2016;9(2):137-40.
158. Philippe Vaesken. Performance de projet et tableaux de bord - Qu'est-ce qu'un tableau de bord ? [Internet]. [cité 9 juin 2019]. Disponible sur: [http://bricks.univ-lille1.fr/M26/cours/co/chap4\\_01.html](http://bricks.univ-lille1.fr/M26/cours/co/chap4_01.html)
159. Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé (ANAES). Méthodes et Outils des démarches qualité pour les établissements de santé [Internet]. [cité 19 août 2019]. Disponible sur: <https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/methodes.pdf>
160. Ordre National des Pharmaciens. Démarche d'accréditation [Internet]. [cité 11 juill 2019]. Disponible sur: <http://www.ordre.pharmacien.fr/Les-pharmaciens/Secteurs-d-activite/Biologie/Demarche-d-accreditation>
161. Andreoletti L, Henquell C, Laudat P. Chap 118. Modalités de conservation des souches, sérums et échantillons biologiques à visée microbiologique. In: TOME II Référentiel en microbiologie médicale (RÉMIC). SFM; 2018. p. 953-9.
162. Vassault A, Grafmeyer D, De Graeve J, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. *Ann Biol Clin.* 1999;57(6):685-95.
163. Gay-Andrieu F, Fricker-Hidalgo H, Sickinger E, Espern A, Brenier-Pinchart MP, Braun HB, et al. Comparative evaluation of the ARCHITECT Toxo IgG, IgM, and IgG Avidity assays for anti-Toxoplasma antibodies detection in pregnant women sera. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;65(3):279-87.
164. Murat JB, Dard C, Fricker Hidalgo H, Dardé ML, Brenier-Pinchart M, Pelloux H. Comparison of the Vidas System and Two Recent Fully Automated Assays for Diagnosis and Follow-Up of Toxoplasmosis in Pregnant Women and Newborns. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(8):1203-12.
165. Jost C, Touafek F, Fekkar A, Courtin R, Ribeiro M, Mazier D, et al. Utility of Immunoblotting for Early Diagnosis of Toxoplasmosis Seroconversion in Pregnant Women. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(11):1908-12.

166. Comité Français d'Accréditation (COFRAC). Exigences pour l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 SH REF 02 - Révision 05 [Internet]. [cité 18 mai 2019]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-REF-02>
167. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin Chem*. 1981;27(3):493-501.
168. Le Vacon F. Le contrôle de qualité en sérologie ou comment garantir la qualité d'un résultat d'analyse semi-quantitative ? *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. 2007;22(6):391-7.
169. Giroud C, Arnaud J, Adjidé V, Vassault A. Contrôle interne de qualité. *Ann Biol Clin*. 2010;68(1):203-22.
170. Comité Français d'Accréditation (COFRAC). Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale SH GTA 06 - Révision 00 [Internet]. [cité 3 juin 2019]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-06>
171. Klein J. L'accréditation en bactériologie. *Revue Francophone des Laboratoires (RFL)*. 2011;41(436):39-50.
172. Marion S. Une expérience pratique d'accréditation en hématologie. *Revue Francophone des Laboratoires (RFL)*. 2010;40(419):45-51.
173. Giannoli J, Anton S. Propositions de recommandations pour l'utilisation pratique des contrôles internes de qualité (CIQ) dans un laboratoire de biologie médicale. *Ann Biol Clin*. 2011;69(4):489-98.
174. Ricos C, Cava F, Garcia-Lario J, Hernandez A, Jimenez C, Minchinela J, et al. Desirable Biological Variation Database specifications - Westgard [Internet]. [cité 3 août 2019]. Disponible sur: <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>
175. Société Française de Microbiologie (SFM). Comité Qualité (QUAMIC) de la Société Française de Microbiologie. SFM; 2016. 336 p.
176. Giannoli J, Albarede S, Avellan T, Bouilloux J, Cartier R, Cohen R, et al. Recommandations pour la mise en place et le suivi des contrôles de qualité dans les laboratoires de biologie médicale [Internet]. Disponible sur: [https://www.labac.eu/pdf/consensus-CIQ\\_EEQ\\_IM.pdf](https://www.labac.eu/pdf/consensus-CIQ_EEQ_IM.pdf)
177. Dard C, Bailly S, Drouet T, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart M, Pelloux H. Long-term sera storage does not significantly modify the interpretation of toxoplasmosis serologies. *J Microbiol Methods*. 2017;134:38-45.
178. Laudat P, Galinier J, Cattoen C, Ferroni A, Lamy B, Courcol R, et al. L'accréditation en bactériologie: enjeux, difficultés et particularités. *Revue Francophone des Laboratoires (RFL)*. 2014(461):25-30.
179. Groupe Français d'études sur l'Hémostase et la Thrombose (GFHT). Groupe d'étude sur l'hémostase et la thrombose [Internet]. [cité 4 août 2019]. Disponible sur: <http://site.geht.org/>

## Table des illustrations

<b>Figure 1</b> Roue de Deming (cycle PDCA) et amélioration continue (2) .....	19
<b>Figure 2</b> Diagramme causes - effet (Ishikawa) (8) .....	20
<b>Figure 3</b> La normalisation en France (11) .....	21
<b>Figure 4</b> Répartition régionale des LBM engagés dans le processus d'accréditation au 1 <sup>er</sup> juin 2019 (37) .....	28
<b>Figure 5</b> Cycle de vie d'une accréditation (38) .....	32
<b>Figure 6</b> Exemple de la cartographie des processus du PBH du CHU d'Angers.....	33
<b>Figure 7</b> Tachyzoïtes de <i>T. gondii</i> (flèches) (57).....	37
<b>Figure 8</b> Structure interne d'un tachyzoïte (à gauche) et d'un bradyzoïte (à droite) de <i>T. gondii</i> (57) ...	37
<b>Figure 9</b> Kyste intracellulaire de <i>T. gondii</i> composé de plusieurs bradyzoïtes (flèches) (57) .....	38
<b>Figure 10</b> Oocyste non sporulé (A) et oocyste sporulé (B) composé de 2 sporocystes contenant 4 sporozoïtes (flèches) de <i>T. gondii</i> (57) .....	39
<b>Figure 11</b> Cycle parasitaire de <i>T. gondii</i> (59) .....	40
<b>Figure 12</b> Sources et modes de contamination à <i>T. gondii</i> (59) .....	41
<b>Figure 13</b> Risque de transmission materno-fœtale de <i>T. gondii</i> en fonction de l'âge gestationnel lors de la séroconversion maternelle (70).....	42
<b>Figure 14</b> Risque de survenue des manifestations cliniques chez un enfant infecté par <i>T. gondii</i> en fonction de l'âge gestationnel lors de la séroconversion maternelle (70) .....	43
<b>Figure 15</b> Distribution régionale en France du nombre de TC pour 1000 naissances en 2017 (76) .....	45
<b>Figure 16</b> Toxoplasmose - Chorioretinite active (88) .....	48
<b>Figure 17</b> Toxoplasmose cérébrale (88) .....	49
<b>Figure 18</b> Cinétique des anticorps antitoxoplasmiques suite à une primo-infection par <i>T. gondii</i> (94) ...	51
<b>Figure 19</b> Principe CMIA dans la détection des IgG antitoxoplasmiques sur l'automate Architect (Abbott Diagnostics) .....	53
<b>Figure 20</b> Principe CMIA dans la détection des IgM antitoxoplasmiques sur l'automate Architect (Abbott Diagnostics) .....	53
<b>Figure 21</b> Représentation schématique du principe de la technique ISAGA dans la détection des IgM antitoxoplasmiques (113) .....	57
<b>Figure 22</b> Exemples de profils sérologiques obtenus par technique WB (121,122) .....	59
<b>Figure 23</b> Organigramme du CNR de la toxoplasmose (80) .....	63
<b>Figure 24</b> Cinétique des anticorps antitoxoplasmiques après contamination par <i>T. gondii</i> (141) .....	64
<b>Figure 25</b> Algorithme dans le choix des techniques pour le diagnostic d'une TO (83) .....	69
<b>Figure 26</b> Proposition d'un algorithme dans la conduite à tenir dans le cadre d'un suivi de grossesse pour la toxoplasmose (151) .....	72
<b>Figure 27</b> Droite de régression des moindres rectangles pour le test Toxo IgG® sur l'Architect i2000 ...	98
<b>Figure 28</b> Graphique de Bland et Altman du test Toxo IgG® sur l'Architect i2000.....	99

<b>Figure 29</b> Évaluation de la variabilité interopérateurs du test TOXO II IgG® sur l'EUROBlot Master .....	101
<b>Figure 30</b> Étude du risque de contamination pour le test Toxo II IgG® sur l'EUROBlot Master .....	102
<b>Figure 31</b> Procédure dégradée de l'automate Architect i2000 (BIO-90490-DO-182).....	105
<b>Figure 32</b> Stratégie actuelle pour l'analyse de nos CIQ sur l'Architect i2000.....	107
<b>Figure 33</b> Stratégie 4 - Gestion des CIQ sur l'Architect i2000 .....	109
<b>Figure 34</b> Évaluation du nombre d'échantillons analysés sur l'Architect i2000, le week-end par rapport à un jour de semaine .....	109
<b>Figure 35</b> Algorithme de gestion des CIQ de fin de série sur l'Architect i2000 .....	110
<b>Figure 36</b> Algorithme de gestion des CIQ de début de série sur l'Architect i2000 .....	111
<b>Figure 37</b> Extrait du document BIO-90490-DO-184 (Suivi mensuel des CIQ – Calcul de l'incertitude de mesure sur Architect) montrant la stratégie établie pour le suivi à moyen terme des CIQ sur l'Architect i2000 .....	113
<b>Figure 38</b> Conduite à tenir pour l'interprétation des résultats des EEQ / CIL en sérologie de la toxoplasmose .....	115
<b>Figure 39</b> Exemple d'un logigramme décrivant la stratégie entreprise au sein de l'UF de Parasitologie – Mycologie devant un profil sérologique toxoplasmique IgG – IgM+, issu du document BIO-70180-DO-161 .....	119
<b>Figure 40</b> Exemple d'un logigramme décrivant la stratégie entreprise au sein de l'UF de Parasitologie – Mycologie dans la mise en place du test Toxo-ISAGA® en systématique devant un profil IgG + IgM + sur un premier sérum, suite à la modification de la NABM.....	122

## Table des tableaux

<b>Tableau 1</b> Exemple de la ligne de portée-type BM MG01 issu du SH INF 50 (40) .....	30
<b>Tableau 2</b> Résumé des performances à évaluer lors d'une vérification/validation d'une méthode quantitative ou qualitative (47) .....	35
<b>Tableau 3</b> Historique des connaissances de <i>T. gondii</i> (53,56) .....	36
<b>Tableau 4</b> Évolution de la séroprévalence toxoplasmique en France de 1960 à 2016 (73,74) .....	44
<b>Tableau 5</b> Comparaison des taux quantitatifs exprimés en UI/mL d'IgG antitoxoplasmiques lors de l'utilisation de 9 tests analysés dans des panels de routine (103) .....	55
<b>Tableau 6</b> Les 4 étapes du cycle PDCA pour l'élaboration de notre plan d'action .....	77
<b>Tableau 7</b> Agencement de notre tableau de bord pour la gestion documentaire.....	78
<b>Tableau 8</b> Les questions de l'outil QQOQCCP (159) .....	79
<b>Tableau 9</b> Évolution de la démarche d'accréditation de 2013 à 2018 au PBH du CHU d'Angers.....	80
<b>Tableau 10</b> Intervalles de mesures obtenus suite à l'application de la règle $\pm 2$ écarts-types à la valeur obtenue lors de l'étude de la fidélité intermédiaire des IgG et IgM antitoxoplasmiques .....	86
<b>Tableau 11</b> Modalités de réalisation du test de variabilité interopérateurs du test au latex et des techniques d'immunocapture - agglutination .....	88
<b>Tableau 12</b> Modalités de l'évaluation de l'exactitude des tests qualitatifs .....	88
<b>Tableau 13</b> Extrait de la maîtrise des risques du test Toxo IgG <sup>®</sup> illustrant la phase préanalytique d'un des 5 M « Matières » .....	93
<b>Tableau 14</b> Résultats des CV obtenus pour l'étude de la répétabilité, calculés à partir de la moyenne et de l'écart-type des CIQ positifs et négatifs du test Toxo IgG <sup>®</sup> sur l'Architect i2000 .....	94
<b>Tableau 15</b> Résultats des CV obtenus pour l'étude de la fidélité intermédiaire calculés à partir de la moyenne et de l'écart-type des CIQ positifs et négatifs du test Toxo IgG <sup>®</sup> sur l'Architect i2000.....	95
<b>Tableau 16</b> Évaluation de l'exactitude du test Toxo IgG <sup>®</sup> sur l'Architect i2000 .....	96
<b>Tableau 17</b> Évaluation de l'incertitude de mesure du test Toxo IgG <sup>®</sup> sur l'Architect i2000 .....	97
<b>Tableau 18</b> Étude de comparaison de méthode du test Toxo IgG <sup>®</sup> entre l'ancien (X) et le nouvel (Y) Architect i2000 .....	98
<b>Tableau 19</b> Sensibilité et spécificité issues des données de la littérature pour le test Toxo IgG <sup>®</sup> sur l'Architect i2000.....	100
<b>Tableau 20</b> Évaluation de l'exactitude du test TOXO II IgG <sup>®</sup> utilisé au sein de l'UF par comparaison des résultats attendus à ceux rendus par les laboratoires participants (groupe de pairs) .....	102
<b>Tableau 21</b> Commentaires d'interprétations associés au logigramme de la figure 39 décrivant la stratégie entreprise au sein de l'UF de Parasitologie - Mycologie devant un profil sérologique toxoplasmique IgG - IgM+.....	120
<b>Tableau 22</b> Commentaires d'interprétations associés au logigramme de la figure 40 décrivant la stratégie entreprise au sein de l'UF de Parasitologie - Mycologie dans la mise en place du test Toxo-ISAGA <sup>®</sup> en systématique devant un profil IgG + IgM + .....	123

# Table des matières

.....	1
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>14</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>17</b>
<b>ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>18</b>
<b>1. Démarche d'accréditation au Laboratoire de Biologie Médicale</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1. Historique du concept de qualité</b> .....	<b>19</b>
1.1.1. Naissance de l'assurance qualité.....	19
1.1.2. Management qualité et « qualité totale ».....	20
1.1.3. Référentiels et normes ISO .....	21
<b>1.2. Qualité dans les Laboratoires de Biologie Médicale</b> .....	<b>22</b>
1.2.1. Contexte normatif et évolution .....	22
a) Premières exigences réglementaires : loi n° 75-626 du 11 juillet 1975 .....	22
b) Instauration d'un Contrôle National de Qualité (CNQ) .....	22
c) Concept des Bonnes Pratiques du Laboratoire (BPL) .....	23
d) Notions d'accréditation et de certification dans la réforme hospitalière des années 1990 .....	23
e) Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale (GBEA).....	24
f) Années 2000 : état des lieux de la qualité dans les Laboratoires de Biologie Médicale et projet de réforme.....	25
g) Réforme de la biologie médicale de 2010 .....	27
1.2.2. Accréditation des Laboratoires de Biologie Médicale .....	29
a) Définition de l'accréditation .....	29
b) Organisme accréditeur .....	29
c) Portée d'accréditation .....	29
d) Processus d'accréditation des Laboratoires de Biologie Médicale.....	31
e) Déroulement de l'audit .....	31
<b>1.3. Norme NF EN ISO 15189 et application en sérologie infectieuse</b> .....	<b>32</b>
1.3.1. Norme NF EN ISO 15189 .....	32
1.3.2. Application en sérologie infectieuse.....	33
<b>2. La toxoplasmose</b> .....	<b>36</b>
<b>2.1. Le parasite</b> .....	<b>36</b>
2.1.1. Structure du parasite .....	37
a) Tachyzoïte.....	37
b) Bradyzoïte.....	38
c) Oocyste.....	38
2.1.2. Cycle parasitaire .....	39
a) Cycle sexué chez l'hôte définitif .....	39
b) Cycle asexué chez les hôtes intermédiaires .....	39
<b>2.2. Épidémiologie</b> .....	<b>40</b>
2.2.1. Mode de contamination .....	40
a) Transmission par l'ingestion d'oocystes .....	41
b) Transmission par l'ingestion de kystes.....	41
c) Transmission par le biais des tachyzoïtes .....	42
2.2.2. Fréquence .....	44
a) Séroprévalence de la toxoplasmose .....	44
b) Fréquence de la toxoplasmose congénitale .....	44
2.2.3. Prévention primaire – Règles hygiéno-diététiques .....	45
2.2.4. Génotypes.....	46
<b>2.3. Aspects cliniques</b> .....	<b>46</b>
2.3.1. Toxoplasmose chez le patient immunocompétent .....	47
2.3.2. Toxoplasmose congénitale .....	47
2.3.3. Toxoplasmose chez le patient immunodéprimé .....	48
<b>2.4. Diagnostic biologique de la toxoplasmose</b> .....	<b>49</b>

2.4.1.	Diagnostic sérologique.....	50
a)	Cinétique des anticorps antitoxoplasmiques .....	50
b)	Techniques sérologiques de première intention .....	51
c)	Techniques de seconde intention .....	55
2.4.2.	Diagnostic direct .....	61
2.4.3.	Stratégie diagnostique.....	62
a)	Rôle du CNR dans l'évolution des pratiques de diagnostic de la toxoplasmose .....	62
b)	Recommandations et stratégie diagnostique selon le contexte clinique .....	64
<b>2.5.</b>	<b>Prise en charge thérapeutique.....</b>	<b>70</b>
2.5.1.	Traitement chez un patient immunocompétent .....	70
2.5.2.	Traitement chez la femme enceinte .....	70
2.5.3.	Traitement chez l'enfant .....	72
2.5.4.	Traitement chez un patient immunodéprimé .....	73
2.5.5.	Traitement de la toxoplasmose oculaire.....	74
	<b>ÉTUDE PERSONNELLE.....</b>	<b>75</b>
<b>1.</b>	<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>76</b>
<b>1.1.</b>	<b>Outils et moyens utilisés .....</b>	<b>76</b>
1.1.1.	Documents du COFRAC .....	76
a)	Documents de RÉFérence (REF).....	76
b)	Guides Techniques d'Accréditation (GTA).....	76
c)	Documents d'INFormation (INF) .....	77
d)	FORMulaires (FORM).....	77
1.1.2.	Outils de la qualité .....	77
a)	Cycle PDCA (roue de Deming) .....	77
b)	Diagramme de Gantt .....	77
c)	Tableau de bord et gestion documentaire .....	78
d)	Analyse des Modes de Défaillance de leurs Effets et de leur Criticité (AMDEC) .....	78
e)	Méthode Qui ? Quoi ? Où ? Quand ? Comment ? Combien ? Pourquoi ? (QQOQCCP).....	79
f)	Réunions .....	79
<b>1.2.</b>	<b>Démarche mise en œuvre dans le diagnostic de la toxoplasmose au sein de l'UF de Parasitologie - Mycologie.....</b>	<b>79</b>
1.2.1.	Positionnement de l'UF au sein du Plateau de Biologie Hospitalière et état des lieux de l'accréditation des examens .....	79
a)	Présentation de l'UF de Parasitologie - Mycologie.....	79
b)	Démarche d'accréditation.....	80
1.2.2.	Circuit de prise en charge d'une analyse de toxoplasmose.....	81
a)	Phase préanalytique .....	81
b)	Phase analytique.....	81
c)	Gestion des calibrations, des maintenances et des contrôles.....	82
d)	Phase postanalytique.....	83
1.2.3.	Stratégie d'utilisation des techniques sérologiques au sein de l'UF .....	83
<b>1.3.</b>	<b>Dossiers de vérification de méthodes .....</b>	<b>85</b>
1.3.1.	Dossiers de vérification de méthodes d'une technique quantitative.....	85
a)	Tests faisant l'objet d'un essai sur site .....	85
b)	Tests faisant l'objet d'une étude bibliographique .....	87
1.3.2.	Dossiers de vérification de méthodes d'une technique qualitative.....	87
a)	Tests faisant l'objet d'un essai sur site .....	87
b)	Tests faisant l'objet d'une étude bibliographique .....	89
<b>1.4.</b>	<b>Audit croisé.....</b>	<b>89</b>
1.4.1.	Préparation à l'audit croisé.....	89
1.4.2.	Déroulement de l'audit croisé .....	90
a)	Réunion d'ouverture .....	90
b)	Évaluation sur site.....	90
c)	Synthèse des auditeurs et réunion de clôture .....	90
<b>2.</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>91</b>
<b>2.1.</b>	<b>Phase préanalytique .....</b>	<b>91</b>

<b>2.2.</b>	<b>Phase analytique .....</b>	<b>94</b>
2.2.1.	Dossiers de vérification de méthodes des tests quantitatifs (SH FORM 43) .....	94
	a) Tests qui ont fait l'objet d'un essai sur site .....	94
	b) Tests qui ont fait l'objet d'une étude bibliographique .....	99
2.2.2.	Dossiers de vérification des tests qualitatifs (SH FORM 43) .....	100
	a) Tests qui ont fait l'objet d'un essai sur site .....	100
	b) Tests qui ont fait l'objet d'une étude bibliographique .....	103
2.2.3.	Procédures dégradées .....	103
2.2.4.	Habilitation technique pour la sérologie automatisée de la toxoplasmose sur l'Architect i2000	106
<b>2.3.</b>	<b>Gestion des contrôles et des maintenances.....</b>	<b>106</b>
2.3.1.	Gestion quotidienne des CIQ sur l'Architect i2000 .....	106
2.3.2.	Suivi à moyen et long terme des CIQ sur l'Architect i2000 .....	112
	a) Suivi à moyen terme .....	112
	b) Suivi à long terme .....	113
2.3.3.	Gestion de la période probatoire sur l'Architect i2000 .....	114
2.3.4.	Gestion des EEQ et CIL en sérologie de la toxoplasmose .....	114
2.3.5.	Maintenance journalière de l'EUROBlot Master .....	116
<b>2.4.</b>	<b>Phase postanalytique.....</b>	<b>116</b>
2.4.1.	Validation biologique des examens du sérodiagnostic de la toxoplasmose .....	116
2.4.2.	Habilitation à la validation des examens du sérodiagnostic de la toxoplasmose .....	123
2.4.3.	Gestion de la sérothèque .....	124
<b>2.5.</b>	<b>Audit croisé.....</b>	<b>124</b>
2.5.1.	Les points forts relatifs aux exigences techniques (chapitre 5 de la norme NF EN ISO 15189)	124
2.5.2.	Les points forts relatifs au management (chapitre 4 de la norme NF EN ISO 15189) .....	125
<b>3.</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>126</b>
<b>4.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>133</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>		<b>136</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>		<b>149</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX .....</b>		<b>151</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>		<b>152</b>
<b>ANNEXES.....</b>		<b>155</b>

# Annexes

## Annexe 1 : Diagramme de Gantt (1 sur 2)

Diagramme de Gantt – Accréditation des examens sérologiques de la toxoplasmose – 2018/2019

Tâches	nov-18	déc-18	janv-19	févr-19	mars-19	avr-19	mai-19	juin-19	juil-19	août-19	sept-19	oct-19	nov-19	déc-19	janv-20
<b>Prise de contact avec le personnel</b> <i>(biologistes, techniciens, ingénieur, cellule qualité)</i>	█														
<b>Etat des lieux du système documentaire</b> <i>(en relation avec la Qualité et le projet)</i>	█														
<b>Demande d'extension</b> <i>(pour la prochaine visite du COFRAC en Janvier 2020)</i>			█												
<b>Prendre connaissance des techniques et de l'organisation</b> <i>(Architect et techniques complémentaires - observation des techniciens)</i>	█														
<b>Réunions</b> <i>(1 fois par mois si nécessaire avec le personnel concerné)</i>	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█				
<b>Maîtrise des risques - AMDEC</b> <i>(selon la méthode des 5M)</i>	█	█	█	█	█	█	█	█	█						
<b>Habilitations / Formations</b> <i>(selon les besoins du personnel)</i>	█	█	█	█	█	█	█	█	█						
<b>Rédaction / Modifications des documents</b> <i>(suite à l'état de lieux sur KaliLab, et aux besoins du personnel)</i>	█	█	█	█	█	█	█	█	█						
<b>Rédaction du SH-FORM 43 (Architect i2000)</b> <i>(+ bibliographie et tests nécessaires)</i>	█	█	█	█	█	█	█	█	█						
<b>Rédaction du SH-FORM 43 (Western-Blot)</b> <i>(+ bibliographie et tests nécessaires)</i>			█	█	█	█	█	█	█						

## Annexe 1 : Diagramme de Gantt (2 sur 2)

Diagramme de Gantt – Accréditation des examens sérologiques de la toxoplasmose – 2018/2019

Tâches	nov-18	déc-18	janv-19	févr-19	mars-19	avr-19	mai-19	juin-19	juil-19	août-19	sept-19	oct-19	nov-19	déc-19	janv-20
Rédaction du SH-FORM 43 (Latex) <i>(+ bibliographie et tests nécessaires)</i>					■	■									
Rédaction du SH-FORM 43 (ISAGA) <i>(+ bibliographie et tests nécessaires)</i>						■	■	■							
Stratégie "Gestion des CIQ" sur Architect i2000 <i>(établir un consensus pour la définition de notre série)</i>			■	■	■	■	■								
Vérification des connexions informatiques <i>(GLIMS, OneLink, Automate, URT/UC)</i>								■							
Checker tous les éléments nécessaires au dossier COFRAC (autre que le SH-FORM 43) + créer un dossier sur le serveur						■	■	■							
Organiser un audit interne ou croisé <i>(réunion pré-audit + bilan de l'audit)</i>									■						
Résolution des "écarts" suite à l'audit interne ou croisé								■	■	■	■	■			
Rédaction du mémoire de thèse						■	■	■	■	■	■	■			
Correction, diffusion du mémoire aux membres du jury + PowerPoint										■	■	■			
Soutenance de la thèse												■			
Envoi du dossier au COFRAC <i>(+ modifications suite aux éventuels points à améliorer sur le dossier)</i>														■	■
Réunion "pré-visite" du COFRAC <i>(biologistes, techniciens, cellule qualité)</i>														■	■
Visite du COFRAC <i>(+ correction des écarts suite à la visite + réunion pour bilan de la visite)</i>															■

**Annexe 2 : pondération d'une Analyse des Modes de Défaillance de leurs Effets et de leur Criticité (AMDEC) pour établir une échelle de criticité d'un risque en fonction de la détectabilité du risque, de sa gravité et de sa probabilité d'apparition**

DétECTION	
Note	Critère
1	Très facilement détectable (détection automatisée 100 %)
2	Facilement détectable (détection automatisée possible)
3	Détectable (détection humaine)
4	Difficilement détectable (détection aléatoire)
5	Indétectable

Gravité	
Note	Critère
1	Nulle : aucune incidence
2	Faible : non conforme mais pas d'impact pour le patient
3	Moyenne : non conforme avec impact non critique pour le patient (délai de rendu, erreur non significative par exemple)
4	Forte : non conforme avec impact critique pour le patient ou pour l'organisation
5	Très forte : non conforme avec mise en danger du patient

Fréquence	
Note	Critère
1	Jamais
2	Rare : d'1 à 2 fois par an
3	Occasionnellement : au moins 1 fois par mois
4	Souvent : au moins 1 fois par semaine
5	En permanence : au moins 1 fois par jour

$$\frac{(\text{DétECTION} + \text{Gravité} + \text{Fréquence})}{3}$$

1	2	2	3	4
1	2	3	3	4
2	2	3	4	4
2	3	3	4	5
2	3	4	4	5

**Echelle de criticité**

**Annexe 3 : références des réactifs utilisés pour la réalisation des tests des techniques quantitatives et qualitatives pour la sérologie de la toxoplasmose**

**Test de répétabilité sur l'Architect i2000**

<b>Tests</b>	<b>Référence du réactif</b>
Toxo IgG®	ARCHITECT Toxo IgG Controls Ref. 6C19 G5-89 / R05 C61192
Toxo IgM®	ARCHITECT Toxo IgM Controls Ref. 6C20 G5-3466 / R03 C6C202

**Test de fidélité intermédiaire sur l'Architect i2000**

<b>Tests</b>	<b>Référence du réactif</b>
Toxo IgG® et Toxo IgM®	CIQ positif : VIROTROL ToRCH-M (Réf.00117B) CIQ négatif : VIROCLEAR ToRCH (Réf.00118)

**Test de variabilité interopérateurs des techniques qualitatives**

<b>Tests</b>	<b>Référence du réactif</b>
TOXO II IgG ®	Lot : P5006-24T-022
PASTOREX TOXO®	Lot n°1 : 64166346 Lot n°2 : 64225504
Toxo-ISAGA®	Lot n°1 : 1006911540 Lot n°2 : 1006836340

**Test de contamination de l'EUROBlot Master**

<b>Test</b>	<b>Référence du réactif</b>
TOXO II IgG®	Lot : P5006-24T-024

**Annexe 4 : plan d'audit prévisionnel dans le cadre de l'audit croisé avec le CH de Cholet sur les sérologies infectieuses automatisées sur l'Architect i2000 (1 sur 2)**

<b>CARACTERISTIQUES DE L'AUDIT</b>	
<b>Date et lieu de l'audit :</b>	Jeudi 4 juillet 2019- pôle de biologie CHU ANGERS Durée une journée
<b>Titre de l'audit</b>	Audit croisé du laboratoire de biologie médicale du CHU D'ANGERS
<b>Objectif(s) de l'audit :</b>	Examiner les dispositions du laboratoire et leur application, par rapport aux référentiels de la portée d'accréditation COFRAC. <u>Sous-famille concernée :</u> Microbiologie Générale = Sérologie

<b>REFERENTIEL(S) / DOCUMENTS DE REFERENCE</b>
Références externes : Norme ISO 15189 v 2012, SH REF 02 et 08, GEN REF 11 Références internes : Dispositions du SMQ

<b>AUDITEURS/ COMPETENCES</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ C Fréneaux, biologiste médicale, responsable du PDPSL</li> <li>▪ AM Osta, biologiste médicale, responsable IH et Sérologie, suppléante informatique</li> <li>▪ H Robineau, RAQ LBM CH CHOLET, métrologie, réactovigilance, stock</li> </ul>

**Annexe 4 : plan d'audit prévisionnel dans le cadre de l'audit croisé avec le CH de Cholet sur les sérologies infectieuses automatisées sur l'Architect i2000 (2 sur 2)**

<b>DEROULEMENT DE L'AUDIT</b>			
<b>Horaires</b>	<b>Thème</b>	<b>Auditeur</b>	<b>Personnel concerné</b>
9h30 à 09h45	<b>Réunion d'ouverture :</b> - Présentation des interlocuteurs. - Présentation : type d'évaluation, objectifs de l'évaluation, référentiel et modalités d'évaluation. - Explication de la signification des écarts - Organisation de l'évaluation : plan prévisionnel - Revue de la portée d'accréditation et liste détaillée à jour - Visite rapide du laboratoire suivant le circuit de l'échantillon	AM Osta C Fréneaux H Robineau	- Biologistes - Technicien qualité /RAQ - Personnel disponible
9h45 à 16h00 Incluant une pause d'une heure de midi	<b>Disposition du SMQ</b> Chapitre 4 et métrologie = à définir le jour en vue de ce qui aura été évalué la veille	H Robineau	Biologistes et responsables des secteurs audités
	<b>Dispositions techniques</b> Compétence du personnel (5.1) - Locaux et conditions environnementales (5.2) - Processus analytiques (5.5) - Garantie de qualité des résultats (5.6) - Prestation de conseils (4.7) - Processus pré-analytiques (5.4) - Processus postanalytiques (5.7) - Comptes rendus des résultats (5.8) - Diffusion des résultats (5.9) - Gestion des informations de laboratoire (5.10)	AM Osta C Fréneaux	Biologistes et responsables des secteurs audités
15h30 à 16h00	Synthèse des auditeurs		
16h à 16h30	Restitution informelle : points forts, axes d'amélioration, écarts	AM Osta C Fréneaux H Robineau	Ensemble du personnel

<b>OBSERVATIONS</b>	
<b>Diffusion du programme et du rapport d'audit : M Arvier –E Godineau</b>	
Confidentialité : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non	
<b>Présentation du rapport prévue le :</b>	<b>Responsable de l'audit :</b>

**Annexe 5 : exemple de maîtrise des risques pour la technique de dépistage des IgG antitoxoplasmiques sur l'Architect i2000**

MAITRISE DES RISQUES				
5M	Points critiques	Echelle de criticité	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matière (échantillons)	Préanalytique Identité	4	Formation et information du personnel	<p><b>Instructions dans le manuel de prélèvement UBILAB</b>  <b>Réception/Enregistrement des prélèvements</b> (BIO-70130-PR-001)  <b>Réception et saisie des demandes en provenance du CH de Saumur</b> (BIO-70130-DO-159)  <b>Gestion de l'IPP des Capucins dans GLIMS</b> (BIO-70130-DO-092)  <b>Vérification de l'enregistrement manuel des prescriptions</b> (BIO-70130-DO-191)  <b>Prise en charge et enregistrement des demandes de Toxoplasmose</b> (BIO-70130-DO-145)</p> <p>En cas de panne du logiciel de prescription connectée, se référer au document <b>Procédure dégradée : presco et pneumatique</b> (BIO-87300-DE-526)</p>
	Préanalytique Préparation du patient	3	Information des patients et préleveurs	<b>Instructions dans le manuel de prélèvement UBILAB</b>
	Préanalytique Type de contenants	2	Formation (CPCS en interne) et information des préleveurs, et contrôle à réception	<p><b>Instructions dans le manuel de prélèvement UBILAB</b>  <b>Critères d'acceptation et de rejet des échantillons</b> (BIO-90350-DO-001)</p> <p>En cas de contenant non adapté, se référer au document <b>Gestion et enregistrement d'une non-conformité pré analytique</b> (BIO-87300-DO-002)</p>
	Préanalytique Nature et volume de l'échantillon	3	Contrôle à réception	<p><b>Instructions dans le manuel de prélèvement UBILAB</b>  <b>Réception/Enregistrement des prélèvements</b> (BIO-70130-PR-001)</p> <p>Si le prélèvement n'est pas conforme, se référer au document <b>Gestion et enregistrement d'une non-conformité pré analytique</b> (BIO-87300-DO-002)</p>
	Préanalytique Délai et température avant traitement analytique	3	Information des préleveurs et gestion logistique (coursiers, pneumatiques)	<p><b>Instructions dans le manuel de prélèvement UBILAB</b>  <b>Réception/Enregistrement des prélèvements</b> (BIO-70130-PR-001)  <b>Prise en charge des prélèvements arrivés en urgence</b> (BIO-70130-DO-043)  <b>Liste des examens d'urgence</b> (BIO-87300-DO-011)</p> <p>Si les conditions ne sont pas respectées, se référer au document <b>Gestion et enregistrement d'une non-conformité préanalytique</b> (BIO-87300-DO-002)</p> <p>En cas de panne des pneumatiques SWISSLOG, se référer au document <b>Procédure dégradée en cas de panne du pneumatique SWISSLOG</b> (BIO-70130-DO-068)</p>

	<b>Préanalytique</b> Prétraitement : centrifugation, aliquotage	3	Formation du personnel et traitement préanalytique	<b>AU800 : Utilisation</b> (BIO-70130-DO-048) En cas de panne de l'AU800, se référer au document <b>Procédure dégradée : Automate AU800</b> (BIO-70130-DO-162) <b>Gestion des tubes non aliquotés sur Automate 800</b> (BIO-70130-DO-143) et <b>Gestion des échantillons infectieux sur l'ilot PTA</b> (BIO-90490-DO-103)
	<b>Préanalytique</b> Interférences	3	Formation des préleveurs	<b>Instructions dans le manuel de prélèvement UBILAB</b> <b>Instruction ordre de prélèvement des tubes</b> (BIO-87300-DO-041)
	<b>Analytique</b> Délai de traitement	5	Gestion de l'urgence et information du personnel	<b>Instructions dans le manuel de prélèvement UBILAB</b> <b>Réception/Enregistrement des prélèvements</b> (BIO-70130-PR-001) <b>Liste des examens d'urgences</b> (BIO-87300-DO-011) <b>Gestion d'un prélèvement au poste "Urgence"</b> (BIO-90490-DO-047)
	<b>Préanalytique</b> Perte d'un échantillon	3	Traçabilité et formation du personnel	<b>Suivi de la traçabilité des échantillons à la RCEB</b> (BIO-70130-PR-002) <b>Liste des "en cours"</b> réalisée en fin de journée par les techniciens concernés par l'Architect i2000 (Cf. fiche d'habilitation des techniciens à l'Architect i2000)
<b>Milieu</b>	<b>Préanalytique et postanalytique :</b> Respect de la température de conservation des échantillons	3	Suivi des réfrigérateurs, chambres froides (métrologie) et formation du personnel	Les dispositions concernant le raccordement métrologique des équipements critiques sont indiquées dans le document <b>S2 - Matériel</b> (BIO-87300-PR-011). Les conditions de conservation des échantillons sont consultables dans la notice du fournisseur, disponible dans KaliLab, avec vérification de la dernière version. Lors d'un changement de lot, consulter les documents <b>Modalité de gestion des changements de notices fournisseurs</b> (BIO-90560-DO-019), <b>Gestion des notices fournisseurs</b> (BIO-90490-DO-002) et <b>Gestion des notices des réactifs commerciaux</b> (BIO-70180-DO-126) <b>Instructions dans le manuel de prélèvement UBILAB</b> <b>Gestion des modules IOM et RIM de la chaîne APTIO</b> (BIO-90490-DO-081) <b>Confirmation métrologique d'un appareil après cartographie</b> (BIO-87300-DO-028) <b>Etalonnage d'une sonde de température</b> (BIO-87300-DO-031) <b>Procédure dégradée chambre de congélation -20 °C</b> (BIO-87300-DO-057)
	<b>Préanalytique</b> Déchets, hygiène et sécurité	2	Gestion des déchets d'activité de soin, propreté et sécurité des locaux	Les dispositions concernant la gestion des déchets et l'hygiène au laboratoire sont indiquées dans les documents <b>S4. Milieu</b> (BIO-87300-PR-020), <b>"Entretien des locaux du PBH"</b> (BIO-87300-PR-013), <b>Accueil au PBH</b> (BIO-87300-DO-037). <b>Liste du matériel dans le sac d'urgence</b> (BIO-70100-FO-029)

	<p><b>Analytique :</b> Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur</p>	2	<p>Respect des conditions de fonctionnement de l'automate : environnement (température de la pièce) et ergonomie de travail</p>	<p>Les dispositions concernant le raccordement métrologique des équipements critiques sont indiquées dans les documents <b>S2 – Matériel</b> (BIO-87300-PR-011) et <b>Manuel Architect</b> (BIO-90560-DE-043).</p>
	<p><b>Analytique</b> Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (température, ...)</p>	3	<p>Conditions environnementales Suivi des réfrigérateurs, chambres froides (métrologie) et formation du personnel</p>	<p>Les dispositions concernant le raccordement métrologique des équipements critiques sont indiquées dans le document <b>S2 – Matériel</b> (BIO-87300-PR-011). Les conditions de conservation des réactifs sont consultables dans la notice du fournisseur, disponible dans KaliLab, avec vérification de la dernière version. Lors d'un changement de lot, consulter les documents <b>Modalité de gestion des changements de notices fournisseurs</b> (BIO-90560-DO-019), <b>Gestion des notices fournisseurs</b> (BIO-90490-DO-002) et <b>Gestion des notices des réactifs commerciaux</b> (BIO-70180-DO-126) <b>Confirmation métrologique d'un appareil après cartographie</b> (BIO-87300-DO-028) <b>Etalonnage d'une sonde de température</b> (BIO-87300-DO-031), et <b>Procédure dégradée chambre de congélation -20 °C</b> (BIO-87300-DO-057)</p>
<b>Matériel (équipements)</b>	<p><b>Préanalytique (Matériel de prélèvement)</b> Adapté et conforme</p>	3	<p>Information et formation des préleveurs interne et externe</p>	<p><b>Instructions dans le manuel de prélèvement UBILAB</b></p>
	<p><b>Préanalytique (Matériel de prélèvement)</b> Ordre de prélèvement respecté</p>	3	<p>Information et formation des préleveurs interne et externe</p>	<p><b>Instructions dans le manuel de prélèvement UBILAB</b> <b>Instruction ordre de prélèvement des tubes</b> (BIO-87300-DO-041)</p>
	<p><b>Préanalytique (Matériel de prélèvement)</b> Utilisation de tubes périmés</p>	3	<p>Information et formation des préleveurs interne et externe</p>	<p>Les dispositions concernant la gestion des stocks sont indiquées dans les documents <b>S3. Matière</b> (BIO-87300-PR-017), <b>Gestion des stocks</b> (BIO-87300-DO-055), et <b>Utilisation du logiciel Gesstock pour la traçabilité</b> (BIO-87300-DE-518)</p>
	<p><b>Analytique (Automate)</b> Référence unique créée Fiche de vie créée</p>	2	<p>Matériel identifié Fiche de vie suivi</p>	<p><b>Guide de gestion du matériel sur KaliLab</b> (BIO-87300-DO-009)</p>

<p><b>Analytique (Automate)</b> Panne bloquante et aiguille endommagée</p>	3	Gestion du mode dégradé	<p><b>Remplacement et calibration des aiguilles de l'i2000</b> (BIO-90490-DO-025) <b>Procédure dégradée de l'Architect i2000</b> (BIO-90490-DO-182)</p>
<p><b>Analytique (Automate)</b> Non-respect des maintenances internes Non-respect des maintenances fournisseur</p>	2	Suivi et traçabilité des maintenances	<p><b>Maintenance sur i2000</b> (BIO-90490-DO-044) Le suivi des maintenances est réalisé sur l'automate ou dans le logiciel KaliLab avec rappel aux utilisateurs, pour les maintenances fournisseur sur chaque automate signalisation de la date de la dernière maintenance et échéance de la prochaine maintenance, se référer au document <b>Guide de gestion du matériel sur KaliLab</b> (BIO-87300-DO-009)</p>
<p><b>Analytique (Automate)</b> Surveillance des dérives</p>	3	Calibrations Passage et suivi des contrôles internes et des EEQ	<p><b>Manuel Architect</b> (BIO-90560-DE-043) <b>Calibration et contrôle sur i2000</b> (BIO-90490-DO-161) <b>Gestion des contrôles qualité internes et externes</b> (BIO-87300-PR-007) <b>Gestion des Contrôles Internes de Qualité sur Architect i2000</b> (BIO-90490-DO-183) <b>Modalité de gestion des EEQ/CIL en sérologie de la toxoplasmose</b> (BIO-70180-DO-158) <b>Modalité de gestion des EEQ en virologie</b> (BIO-90350-DO-027) <b>Suivi mensuel des CIQ - Calcul de l'incertitude de mesure Architect i2000</b> (BIO-90490-DO-184)</p>
<p><b>Analytique (Matériel annexe)</b> Pipettes, Centrifugeuses, Réfrigérateurs, Chambre froide, AU800, chaîne Aptio (Siemens)</p>	3	Périodicité des maintenances, maîtrise des équipements avec suivi métrologique et raccordement	<p>Les dispositions concernant le raccordement métrologique des équipements critiques sont indiquées dans le document <b>S2 - Matériel</b> (BIO-87300-PR-011). Les enregistrements se font sous KaliLab ainsi que le programme de métrologie, se référer au document <b>Guide de gestion du matériel sur KaliLab</b> (BIO-87300-DO-009). <b>Métrologie des pipettes - Balance XP26PC (Agents infectieux)</b> (BIO-87300-DO-005) et <b>Spécifications métrologie des pipettes</b> (BIO-87300-FO-224) <b>AU800 : Maintenance</b> (BIO-70130-DO-052) <b>Maintenances de la chaîne APTIO</b> (BIO-90490-DO-079) <b>Etalonnage d'une sonde de température</b> (BIO-87300-DO-031) <b>Contrôle métrologique des centrifugeuses</b> (BIO-87300-DO-066)</p>
<p><b>Analytique</b> Contamination</p>	2	Respect des conditions opératoires du fournisseur	<p>Se référer au test de contamination disponible dans le <b>rapport de vérification de méthode</b>.</p>

	<b>Préanalytique, analytique et postanalytique</b> Informatique embarquée	3	Paramétrage, Vérification des connexions (arrondis, paramètres calculés) Sauvegarde des données, formation du personnel	<p><b>Paramétrage :</b> Les vérifications des modifications de paramétrage informatique sont indiquées dans le document <b>S5. Méthode</b> (BIO-87300-PR-021) <b>Architecture des systèmes d'information</b> (BIO-87300-DO-023) <b>Vérification des connexions par jeux de tests. Suivi dans le dossier paramétrage du système</b> (BIO-87300-FO-119)</p> <p><b>Procédure détection panne informatique RCEB</b> (BIO-87300-DO-026)</p> <p><b>Procédures dégradées des différentes interfaces informatiques :</b> <b>Procédure dégradée GLIMS - Mode POC OL2</b> (BIO-90490-DO-126) <b>GAM : Procédure dégradée en cas de panne</b> (BIO-70130-DO-003) <b>Procédure dégradée: Panne sorting drive Beckman</b> (BIO-70130-DO-066) <b>Mode dégradé en cas de panne ou arrêt du concentrateur OneLink2 Néo</b> (BIO-90490-DO-122) <b>Procédure dégradée en cas de panne d'URT</b> (BIO-90490-DO-170) <b>Procédure dégradée : presco et pneumatique</b> (BIO-87300-DE-526) <b>Sauvegarde des données</b> <b>Maintenance sur i2000</b> (BIO-90490-DO-044) <b>Sauvegarde et récupération des données et des logiciels informatiques</b> (BIO-87300-DE-525)</p>
<b>Matériel (réactifs)</b>	<b>Analytique</b> Acceptation à la réception (réactifs, contrôles, calibrateurs)	3	Conditions d'acceptation	Les dispositions de vérification à réception sont indiquées dans le document <b>Réception des colis</b> (BIO-87300-DO-1012)
	<b>Analytique</b> Réactio- matérieo-vigilance	3	Alertes fournisseurs et ANSM	Les dispositions concernant les alertes ANSM et leurs gestions sont indiqués dans le document <b>S3. Matière</b> (BIO-87300-PR-017)
	<b>Analytique</b> Rupture de stock	2	Gestion des stocks traçabilité des lots, formation du personnel	Les dispositions concernant la gestion des stocks sont indiquées dans les documents <b>S3. Matière</b> (BIO-87300-PR-017), <b>Gestion des stocks</b> (BIO-87300-DO-055), <b>Gesstock: gestion des commandes</b> (BIO-70130-DO-088) et <b>Utilisation du logiciel Gesstock pour la traçabilité</b> (BIO-87300-DE-518)

	<b>Analytique</b> Conservation	3	Respect des consignes fournisseur Cartographie des réfrigérateurs et chambres froides par sondes	Les conditions de conservation des réactifs sont consultables dans la notice du fournisseur, disponible dans KaliLab, avec vérification de la dernière version. Lors d'un changement de lot, consulter les documents <b>Modalité de gestion des changements de notices fournisseurs</b> (BIO-90560-DO-019), <b>Gestion des notices fournisseurs</b> (BIO-90490-DO-002) et <b>Gestion des notices des réactifs commerciaux</b> (BIO-70180-DO-126)  Les dispositions concernant le raccordement métrologique des équipements critiques sont indiquées dans le document <b>S2 - Matériel</b> (BIO-87300-PR-011) <b>Procédure dégradée chambre de congélation -20 °C</b> (BIO-87300-DO-057)
	<b>Analytique</b> Condition d'utilisation	3	Respect des consignes fournisseur	Les conditions d'utilisation des réactifs sont consultables dans la notice du fournisseur disponible dans KaliLab, avec vérification de la dernière version. Lors d'un changement de lot, consulter les documents <b>Modalité de gestion des changements de notices fournisseurs</b> (BIO-90560-DO-019), <b>Gestion des notices fournisseurs</b> (BIO-90490-DO-002) et <b>Gestion des notices des réactifs commerciaux</b> (BIO-70180-DO-126)
<b>Méthode</b>	<b>Préanalytique</b> Respect des techniques de prélèvement	3	Mise à disposition des instructions utiles	<b>Instructions dans le manuel de prélèvement UBILAB</b> <b>Instruction ordre de prélèvement des tubes</b> (BIO-87300-DO-041)
	<b>Analytique</b> Limite de la méthode	1	Limite de détection, quantification, de linéarité, spécificité et sensibilité	Se référer au <b>rapport de vérification de méthode</b> .
	<b>Analytique</b> Passage et surveillance des CIQ	3	Vérification de la fidélité	Réalisée chaque année dans la mise à jour du dossier de validation de méthode grâce aux CIQ passés au quotidien sur l'année n-1, via la carte de contrôle URT. Se référer aux documents <b>Incertitude de mesure</b> (BIO-87300-PR-038) et <b>Suivi mensuel des CIQ - Calcul de l'incertitude sur Architect i2000</b> (BIO-90490-DO-184)
	<b>Analytique</b> Passage et surveillance des CIQ externalisés et/ou EEQ	3	Vérification de la justesse et/ou de l'exactitude	Réalisée chaque année dans la mise à jour du dossier de vérification de méthode grâce aux EEQ passés au cours de l'année n-1, via la carte de contrôle URT. Se référer aux documents <b>Incertitude de mesure</b> (BIO-87300-PR-038), <b>Validation de méthode en routine multiparamétrique</b> (BIO-87300-FO-078), et <b>Modalité de gestion des EEQ/CIL en sérologie de la toxoplasmose</b> (BIO-70180-DO-158) <b>Modalité de gestion des EEQ en virologie</b> (BIO-90350-DO-027)
	<b>Analytique</b> Respect des délais de réalisation d'une analyse	2	Indicateur qualité	Un document commun au pôle est disponible via le chemin <b>i/courrier/laborato/ucl/cellule qualité</b> <b>Délai de réalisation</b> (BIO-87300-DO-036)

Main d'œuvre	<b>Préanalytique</b> Compétence et maintien de compétence des préleveurs	3	Formation des préleveurs internes et informations des préleveurs externes	Enregistrement des compétences du personnel sur le logiciel KaliLab pour les préleveurs internes. <b>Guide gestion du personnel sur KaliLab</b> (BIO-87300-DO-008) Les dispositions concernant la gestion des compétences du personnel sont indiquées dans le document <b>S1 - Main d'œuvre</b> (BIO-87300-PR-016)
	<b>Analytique</b> Compétence et maintien de compétence des techniciens	3	Formation et informations des techniciens et ingénieurs	Enregistrement des compétences du personnel sur le logiciel KaliLab. <b>Guide gestion du personnel sur KaliLab</b> (BIO-87300-DO-008) Les dispositions concernant la gestion des compétences du personnel sont indiquées dans le document <b>S1 - Main d'œuvre</b> (BIO-87300-PR-016) <b>Gestion des compétences sur le PTA</b> (BIO-90490-DO-101)  <b>UF7018-PARASITOLOGIE/MYCOLOGIE</b> <b>"Fiche de poste - Technicien de Sérologie parasitaire et fongique"</b> (BIO-70180-FP-010) <b>"Formation initiale - Sérologie automatisée de la toxoplasmose"</b> (BIO-70180-FO-101) <b>"Suivi du maintien des compétences non médicales dans l'UF 7018"</b> (BIO-70180-FO-094)  <b>UF9035-VIROLOGIE</b> <b>Technicien de laboratoire de virologie</b> (BIO-90350-FP-001) <b>Ingénieur en Biologie Médicale de virologie</b> (BIO-90350-FP-002) <b>Fiche de formation PTA</b> (BIO-90350-FO-029) <b>Validation technique dans GLIMS</b> (BIO-90350-DO-028)
	<b>Analytique</b> Compétence et maintien de compétence des biologistes	3	Formation et informations des biologistes et des internes	Enregistrement des compétences du personnel sur le logiciel KaliLab. <b>Guide gestion du personnel sur KaliLab</b> (BIO-87300-DO-008) Les dispositions concernant la gestion des compétences du personnel sont indiquées dans le document <b>S1 - Main d'œuvre</b> (BIO-87300-PR-016) <b>Fiche de poste-Biologiste en Parasitologie-Mycoologie</b> (BIO-70180-FP-001) <b>Habilitation initiale à la validation des sérologies de la toxoplasmose</b> (BIO-70180-FO-100) <b>Validation des résultats des analyses du sérodiagnostic de la toxoplasmose</b> (BIO-70180-DO-114) <b>Diagnostic de la toxoplasmose acquise chez l'immunocompétent : Stratégie et interprétation des résultats</b> (BIO-70180-DO-161) <b>Prestation de conseil en Parasitologie/Mycoologie</b> (BIO-70180-FO-031)
	<b>Pré/Post-analytique :</b> Enregistrement des demandes, transmission des comptes-rendus et archivage	3	Formation et informations des secrétaires	<b>Fiche de poste - Secrétaire des UF de Bactériologie-Hygiène hospitalière, Parasitologie-Mycoologie et Virologie</b> (BIO-90560-FP-001)

	<b>Postanalytique</b> Transmission des résultats	3	Formation et information du personnel habilité à transmettre un résultat	<b>Convention de preuve</b> (BIO-87300-FO-215) <b>Envoi de résultat par FAX</b> (BIO-90490-DO-003) <b>Transmission des résultats par téléphone</b> (BIO-70180-DO-038) <b>Transmission des comptes rendus</b> (BIO-70180-DO-014) <b>Fiche de poste - Secrétaire des UF de Bactériologie-Hygiène hospitalière, Parasitologie-Mycologie et Virologie</b> (BIO-90560-FP-001)
	<b>Pré/Ana/Post-analytique</b> Défaut de personnel	3	Gestion des plannings	<b>Règles pour les plannings</b> (BIO-90490-DO-109)

## Annexe 6 : résultats des tests réalisés pour la construction du SH FORM 43 des IgM antitoxoplasmiques sur l'Architect i2000

NA : non applicable ; n : nombre d'échantillon ; m = moyenne ;  $\sigma$  = écart-type ; CV : coefficient de variation ; SFBC : Société française de biologie clinique.

REPETABILITE								
Unité		Index						
Date		CIQ positif (27/01/17) et CIQ négatif (01/02/17)						
Echantillons / Niveaux	n	m	$\sigma$	CV (%)	CV (%) retenu par le laboratoire	CV (%) fournisseur	Source	Conclusion
CIQ positif	30	1,44	0,097	6,74	15	7,50	SFBC	VALIDE
CIQ négatif	30	0,09	0,010	NA	NA	NA	SFBC	-

FIDÉLITE INTERMÉDIAIRE								
Unité		Index						
Période		Du 12/10/18 au 10/11/18						
Echantillons / Niveaux	n	m	$\sigma$	CV (%)	CV (%) retenu par le laboratoire	CV (%) fournisseur	Source	Conclusion
CIQ positif	30	7,68	0,380	4,96	15	≤ 10	SFBC	VALIDE
CIQ négatif	30	0,07	0,011	NA	NA	NA	SFBC	-

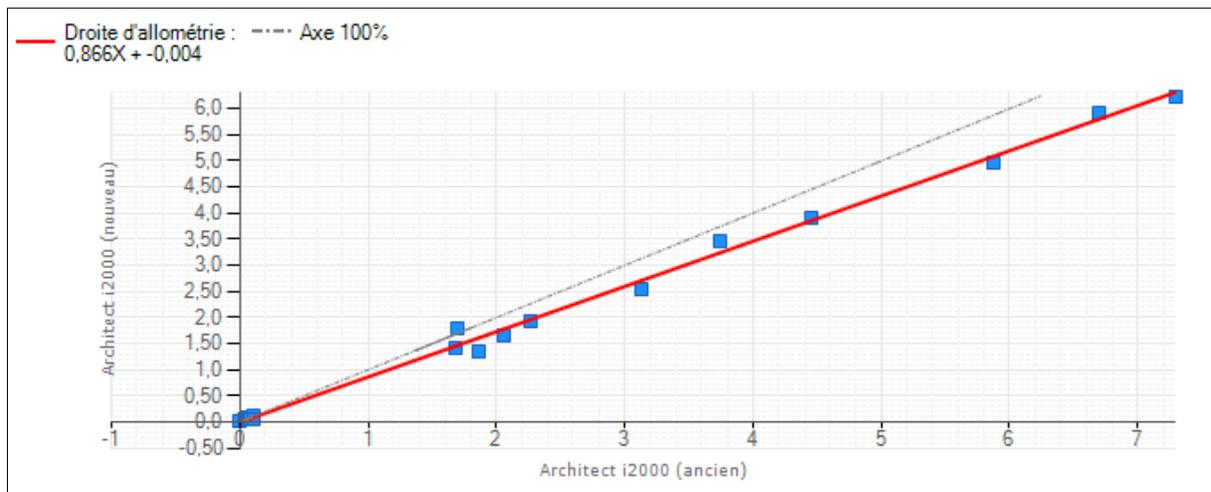
EXACTITUDE							
Unité		Index					
Période d'essai		Année 2018					
EEQ	LOT	Laboratoire		Groupe de pairs			z-score
		Niveau de contrôle	Valeur du laboratoire	Nombre de laboratoires	Cible		
CTCB 181 Sérum 1811	181	1	NA	135	Négatif	NA	
CTCB 181 Sérum 1812	181	1	NA	134	Négatif	NA	
CTCB 182 Sérum 1821	182	1	0,87	120	1,02	-1,916	
CTCB 182 Sérum 1822	182	1	0,81	121	1,01	1,1	
CTCB 183 Sérum 1831	183	1	NA	133	Négatif	NA	
CTCB 183 Sérum 1832	183	1	NA	128	Négatif	NA	
CTCB 184 Sérum 1841	184	1	0,72	117	0,80	0,573	
CTCB 184 Sérum 1842	184	1	NA	127	Négatif	NA	
Niveau	Objectif analytique	Source		Conclusion			
1	$0 \leq  z\text{-score}  \leq 2$	CTCB		VALIDE			

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input type="checkbox"/> ; calcul <input checked="" type="checkbox"/>		
Unité		Index
Période d'évaluation CIQ		Du 12/10/18 au 10/11/18
Période d'évaluation CIQ externe ou EEQ		Année 2018
		<b>Incertitudes calculées</b> <b>Exigence de performances</b>
<b>Mode de calcul (SH GTA 14)</b>		$u(C) = \sqrt{\left(\frac{CV \times m}{100}\right)^2 + \left(\frac{\bar{E}}{\sqrt{3}}\right)^2 + \sigma_E^2}$
<b>Quantification de l'incertitude (niveau 1)</b>		NA
<b>Quantification de l'incertitude (niveau 2)</b>		7,68 ± 0,79 (valeur index)      NA

La quantification de l'incertitude appliquée à la moyenne des CIQ positifs obtenue lors de la fidélité intermédiaire, est rendue dans ce document en valeur absolue ± U où U correspond à l'incertitude élargie soit 2 x u (C) en UI/mL.

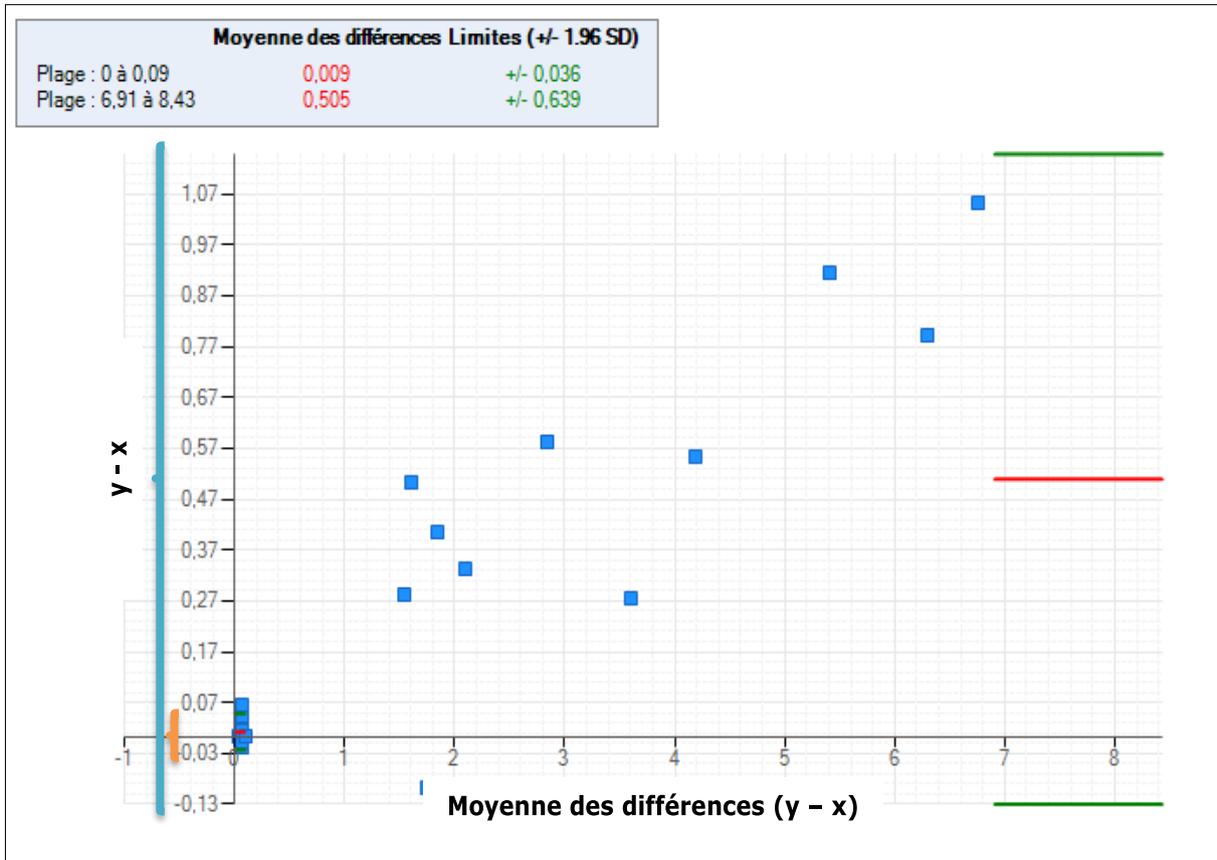
COMPARAISON DE METHODES	
Unité	IgM (index)
Date	03/2017
Données bibliographiques	<p><b>Comparaison :</b>            Architect et AxSYM Toxo IgM (102)            Architect, VIDAS et AxSYM Toxo IgM (163)            Architect , VIDAS et LIAISON Toxo IgM (164)</p> <p><b>Nombre de mesures :</b>            2031 sérums de femmes enceintes, donneurs de sang et patients hospitalisés (102)            730 sérums de femmes enceintes (163)            631 sérums issus de femmes enceintes et de nouveaux nés (164)</p> <p><b>Conclusion :</b> Concordance            Architect et VIDAS = 90 % (101)            Architect et AxSYM = 92,9 % et concordance Architect et VIDAS = 94,4 % (163)            Architect et VIDAS = 98,3 % (164)</p>
Nombre de mesures	30
Equation de la droite de régression	$Y = 0,866X - 0,004$
Diagramme des différences et/ou des rapports	Nombre de déviants = 0

### Régression des moindres rectangles



Représentation graphique de la corrélation des résultats obtenus à partir des 30 sérums pour le dosage des IgM antitoxoplasmiques sur l'ancien et le nouvel Architect i2000, illustrée par la droite d'allométrie en rouge d'équation  $Y = 0,866X - 0,004$ . En abscisses figurent les résultats obtenus sur l'ancien Architect i2000 en valeur index. En ordonnées figurent les résultats obtenus sur le nouvel Architect i2000 en valeur index.

Graphique de Bland et Altman :



Représentation graphique de la dispersion des résultats obtenus à partir des 30 sérums analysés sur l'ancien et le nouvel Architect i2000. En abscisses figure la moyenne des différences obtenues entre les résultats sur le nouvel (y) et l'ancien (x) Architect i2000. En ordonnées figure la différence obtenue entre les résultats sur le nouvel (y) et l'ancien (x) Architect i2000. Les limites pour lesquelles 95 % des différences seront susceptibles de se trouver sont définies par une accolade orange pour les points qui se situeront dans l'intervalle de mesure [0 ;0,09], et bleue pour les points qui se situeront dans l'intervalle de mesure [6,91 ;8,43].

**Annexe 7 : résultats des tests réalisés pour la construction du SH FORM 43 des techniques qualitatives**

**Test PASTOREX TOXO®**

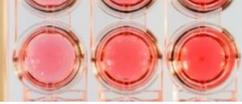
**Variabilité interopérateurs :**

Date (Opérateur évalué)	Résultat	Date (Opérateur évalué)	Résultat
29/01/2019 (STM)		18/03/2019 (STM)	
30/01/2019 (KLMA)		19/02/2019 (STM)	
04/02/2019 (STM)		20/02/2019 (KLMA)	
12/02/2019 (NAC)		05/03/2019 (NAC)	
13/02/2019 (KLMA)		07/03/2019 (STM)	

Les abréviations STM, NAC et KLMA correspondent aux opérateurs qui ont réalisé la technique. Le témoin négatif est signalé par la mention « T- », « T neg », ou « - », et le témoin positif par la mention « T+ » ou « + ».

## Tests Toxo-ISAGA® et Toxo-ISAGA IgA®

### Variabilité interopérateurs :

	Niveau	Lot /Date / Opérateur	Résultats	
1	Témoin antigène	1006691540 21/01/19 STM	0	
	Positif		12	
2	Témoin antigène	1006836340 28/01/19 STM	0	
	Positif		12	
3	Témoin antigène	1006836340 11/02/19 NAC	0	
	Positif		12	
4	Témoin antigène	1006836340 14/02/19 NAC	0	
	Positif		12	
5	Témoin antigène	1006836340 18/02/19 STM	0	
	Positif		12	
6	Témoin antigène	1006836340 23/02/19 NAC	0	
	Positif		12	
7	Témoin antigène	1006836340 04/03/19 STM	0	
	Positif		12	
8	Témoin antigène	1006836340 07/03/19 NAC	0	
	Positif		12	
9	Témoin antigène	1006836340 11/03/19 NAC	0	
	Positif		12	
10	Témoin antigène	1006836340 19/03/19 STM	0	
	Positif		12	

Les abréviations STM et NAC correspondent aux techniciennes qui ont réalisé la technique.

Le score « 0 » est attribué à la première ligne de chaque plaque du test Toxo-ISAGA® et correspond au témoin antigène (bouton de sédimentation au fond de la cupule).

Le score « 12 » est attribué à la deuxième ligne de chaque plaque du test Toxo-ISAGA® et correspond au témoin positif (cupule recouverte d'un voile).

**Exactitude :****Toxo-ISAGA®**

Echantillons	Résultat du laboratoire	Cible (groupe de pairs)	Conclusion
1811	Négatif (indice 2)	Négatif (NA)	Conforme
1812	Positif (indice 9)	Positif (indice 9)	Conforme
1821	Positif (indice 11)	Positif (indice 12)	Conforme
1822	Positif (indice 10)	Positif (indice 11)	Conforme
1831	Négatif (indice 4)	Négatif (NA)	Conforme
1832	Négatif (indice 5)	Négatif (NA)	Conforme
1841	Positif (indice 11)	Positif (indice 12)	Conforme
1842	Positif (indice 9)	Positif (NA)	Conforme

NA : non applicable

**Toxo-ISAGA IgA®**

Echantillons	Résultat du laboratoire	Cible (groupe de pairs)	Conclusion
1811	Positif (indice 12)	Positif (indice 12)	Conforme
1812	Positif (indice 12)	Positif (indice 12)	Conforme
1821	Négatif (indice 0)	Négatif (indice 0)	Conforme
1822	Positif (indice 12)	Positif (indice 12)	Conforme
1831	Positif (indice 12)	Positif (indice 12)	Conforme
1832	Positif (indice 11)	Positif (indice 12)	Conforme

**Test TOXOPLASMA WB IgG IgM®****Exactitude :**

Echantillon	Résultat du laboratoire	Cible (groupe de pairs)	Conclusion
1801 BB	IgG+ IgM+	IgG+ IgM+	Conforme
1801 MM	IgG+ IgM+	IgG+ IgM+	Conforme
1803 BB	IgG+ (identique) IgM-	IgG+ (identique) IgM-	Conforme
1803 MM	IgG+ IgM+	IgG+ IgM+	Conforme
1805 BB	IgG+ (identique) IgM-	IgG+ (identique) IgM-	Conforme
1805 MM	IgG+ IgM+	IgG+ IgM+	Conforme
1807 BB	IgG+ (identique) IgM+ (identique)	IgG+ (identique) IgM+ (identique)	Conforme
1807 MM	IgG+ IgM+	IgG+ IgM+	Conforme
1809 BB	IgG+ IgM+ (identique)	IgG+ IgM+ (identique)	Conforme
1809 MM	IgG+ IgM+	IgG+ IgM+	Conforme
1811 BB	IgG+ (identique) IgM-	IgG+ (identique) IgM-	Conforme
1811 MM	IgG+ IgM+	IgG+ IgM+	Conforme

MM (mère) BB (nouveau-né)

## Annexe 8 : habilitation initiale – sérologie automatisée de la toxoplasmose (BIO-70180-FO-101)

Plateau de Biologie Hospitalière - CHU Angers 4 rue Larrey 49933 ANGERS Cedex 9	<b>Habilitation initiale - Sérologie automatisée de la toxoplasmose</b>	Ref : BIO-70180-FO-101 V02 Version : 02 Applicable le : 29-03-2019 
---	---	---

NOM : \_\_\_\_\_ PRENOM : \_\_\_\_\_ POSTE : PTA

Noter les dates d'observation et de réalisation sous tutorat effectuées correctement dans les cases blanches

ETAPE DE LA FORMATION	DATE DE REALISATION				VISA ET COMMENTAIRE DU TUTEUR
Prise de connaissance des documents					
<b>OBSERVATION</b>					
Circuit des échantillons (AU2550/800 et chaîne Aptio) et acquittement des tubes					
Gestion des sérums en quantité insuffisante					
Utilisation de OneLink et confirmation technique					
Utilisation de Glims et confirmation technique					
Utilisation de l'automate i2000 (lancement d'une analyse)					
Utilisation du VIDAS (lancement d'une analyse, gestion des calibrations, contrôles et consommables)					
<b>REALISATION SOUS TUTORAT</b>					
Acquittement des échantillons					
Gestion des sérums en quantité insuffisante					
<b>VIDAS</b>					
Calibration et passage des contrôles de trousse					
Réalisation d'une détermination de l'avidité des IgG anti-toxoplasmiques					
<b>I2000</b>					
Programmation d'une analyse et consultation du statut de la demande					
Consultation des résultats et impression					
Programmation d'une dilution					
<b>OneLink</b>					
Traçabilité d'un échantillon					
Gestion des repasses					
Confirmation des résultats					
<b>GLIMS</b>					
Confirmation des résultats					
Gestion des <i>En cours</i>					

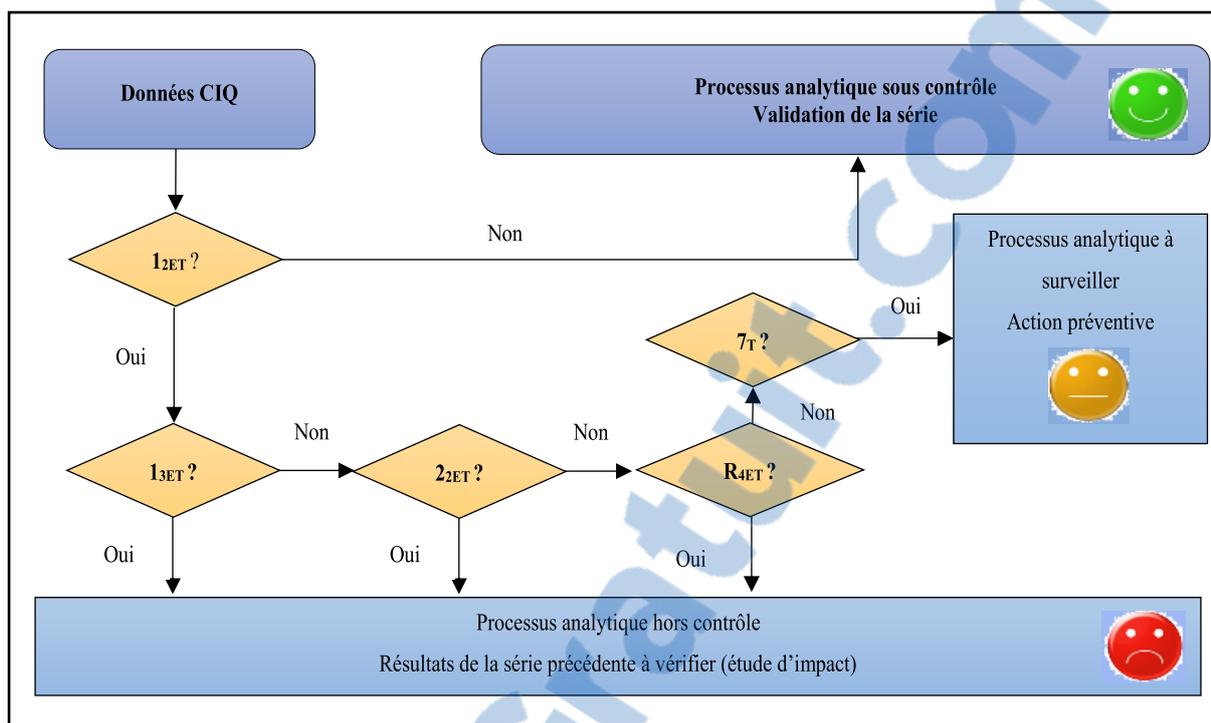
Date et VISA de la personne formée (en fin de formation) :

Date et VISA du responsable qualité ou du biologiste en charge du secteur :

## Annexe 9 : l'outil QQQCCP dans la construction d'une stratégie d'analyse des CIQ

Outil : Le QQQCCP	Situation Etat des lieux	Observations Recherche des causes (POURQUOI ?)	Actions d'amélioration Propositions de solutions
<b>QUI ?</b>	<p><b>Du lundi au vendredi :</b> techniciens de Virologie</p> <p><b>Du samedi au dimanche :</b> techniciens du PTA</p>	<p><b>Du lundi au vendredi :</b> &gt; 90 % des analyses concernent des examens de Virologie. Le reste correspond à la sérologie parasitaire de la toxoplasmose.</p> <p><b>Du samedi au dimanche :</b> 1 seul technicien de Virologie le samedi matin présent dans le secteur spécialisé de Virologie. Et absence de technicien de Virologie le dimanche et jours fériés (<i>versus</i> le technicien du PTA qui est de garde).</p>	Réorganiser les tâches de façon à se détacher du PTA le week-end.
<b>QUOI ?</b>	Contrôles qualité (CQ) et maintenance journalière (MJ)	S'assurer de la conformité de nos résultats	Impossible de changer
<b>OÙ ?</b>	PTA au rez-de chaussé du PBH	Lieu où se trouve tous les automates de volume conséquent, et fonctionnent 24h/24 à grand débit. Tous les automates sont reliés à la chaîne Siemens	Impossible de changer
<b>QUAND ?</b>	Tous les matins vers 9 heures	Début de journée des techniciens	<p><b>Du lundi au vendredi :</b> tous les matins à 8 h par un technicien de Virologie qui arrive à 8 h dans son secteur spécialisé, puis le relais est pris par le technicien de Virologie de 9 h en poste sur le PTA pour la journée.</p> <p><b>Du samedi au dimanche :</b> le week-end serait considéré comme une série</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Analyse des CQ et MJ le samedi matin à 8h par le technicien de Virologie</li> <li>- Analyse des CQ et MJ le lundi matin à 8h pour fermer la série par le technicien de Virologie</li> </ul>
<b>COMMENT ?</b>	Selon la procédure décrite dans le <b>BIO-90490-DO-161</b> « Contrôle et calibration i2000 » et <b>BIO-90490-DO-044</b> « Maintenance i2000 »	Selon les recommandations du fournisseur (Abbott Diagnostics)	Selon les recommandations du fournisseur (Abbott Diagnostics)
<b>COMBIEN ?</b>	1 analyse de CQ après la MJ	Stratégie définie lors de l'installation de l'automate	<p><b>Du lundi au vendredi :</b> analyse d'un CQ de début de série après la MJ, et analyse d'un CQ de fin de série avant la MJ.</p> <p><b>Du samedi au dimanche :</b> analyse du CQ de fin de série puis réalisation de la MJ puis ouverture de la série du week-end puis le lundi matin fermeture de la série du week-end par le CQ de fin de série etc.</p>

## Annexe 10 : règles d'acceptabilité des CIQ et de leurs interprétations sur l'Architect i2000



<b>Alarme</b>		<b>Rejet</b>	
<b>1<sub>2ET</sub></b>	1 valeur éloignée de +/- 2ET de la moyenne	<b>1<sub>3ET</sub></b>	1 valeur éloignée de +/- 3ET de la moyenne
<b>7<sub>T</sub></b>	7 valeurs consécutives d'un même niveau de CIQ présentent une progression strictement ascendante ou strictement descendante	<b>2<sub>2ET</sub></b>	2 valeurs consécutives éloignées de +/- 2ET du même côté de la moyenne
		<b>R<sub>4ET</sub></b>	2 valeurs consécutives éloignées l'une de l'autre de plus de 4ET

### Exemples de causes de « rejet » des CIQ

Règles	Causes
<b>1<sub>3ET</sub> ou R<sub>4ET</sub></b>	Erreurs aléatoires : maintenance non réalisée, réactif périmé, volume insuffisant, changement de lot, erreur de programmation
<b>2<sub>2ET</sub></b>	Erreurs systématiques : calibration, maintenance défectueuse (débris dans les tubulures...), vieillissement des réactifs, des matériaux de contrôles ...

## Annexe 11 : extrait de la NABM 2019 - Toxoplasmose

### MINISTÈRE DES SOLIDARITÉS ET DE LA SANTÉ

#### Décision du 4 octobre 2018 de l'Union nationale des caisses d'assurance maladie relative à la liste des actes et prestations pris en charge par l'assurance maladie

NOR : SSAU1900356S

Le collège des directeurs,

Vu le code de la sécurité sociale, notamment les articles L. 162-1-7, L. 162-1-7-1, R. 162 - 52 ;

Vu les avis de la Haute Autorité de santé en date des 1<sup>er</sup> février 2017 ; 24 mai 2017 ; 13 janvier 2016, 27 janvier 2016, 11 janvier 2017, 19 juillet 2017 ;

Vu les avis de l'Union nationale des organismes complémentaires d'assurance maladie du 10 septembre 2018 ;

Vu les avis de la commission de hiérarchisation des actes et prestations de biologie médicale en date des 17 avril 2017, 22 février 2018, 28 mars 2018,

Décide :

De modifier la liste des actes et prestations pris en charge par l'assurance maladie, pour la partie relative aux actes de biologie médicale, adoptée par décision de l'UNCAM du 4 mai 2006 modifiée comme suit :

#### Art. 1<sup>er</sup>. – Toxoplasmose

1. **Au sous chapitre 7-05 : sérologie parasitaire, la rubrique toxoplasmose est supprimée.**

Les actes 1422,1423,1424,1425,1426,1430,1431,1432,1433,1434,1435,1436,1437, sont supprimés.

Les actes 1420,1421 sont transférés dans la nouvelle rubrique : TOXOPLASMOSE créée au chapitre 19. Leurs libellés sont modifiés.

2. **Au sous chapitre 17-03 : diagnostic des embryofetopathies infectieuses**

Les actes 4060,4061, 4062 sont supprimés.

Le libellé de l'acte 4063 est modifié.

#### Recherche directe de *Toxoplasma* par amplification génique.

4063	<b>Détection d'ADN toxoplasmique</b> - à partir de liquide amniotique (amniocentèse devant être réalisée après 16 à 18 semaines de grossesse, et au moins quatre semaines après la date présumée de l'infection maternelle)	B 600
------	--	-------

3. **Au chapitre 19 - Microbiologie médicale par pathologie, il est ajouté une rubrique Diagnostic de la toxoplasmose :**

Les actes 1427,1428, 1438, 1439, 4508 sont créés.

#### Toxoplasmose

##### Recherche d'anticorps spécifiques anti-*Toxoplasma*

dans le cadre du dépistage, du diagnostic et de la surveillance

- pour le cas du suivi de la femme enceinte, le rythme des contrôles est réalisé selon la réglementation en vigueur, et pour les femmes séronégatives, jusqu'à 2 à 4 semaines après l'accouchement,
- patient présentant des symptômes évocateurs de toxoplasmose,
- patient donneur ou receveur de cellules souches hématopoïétiques, d'organes ou de tissus (en pré-greffe),
- patient immunodéprimé, nouveau-né, enfant de moins de un an ...

1420	<b>Recherche et titrage des IgG et des IgM anti-<i>Toxoplasma</i></b>	B 40
------	---	------

1421	Deuxième prélèvement pour <b>Confirmation ou Étude de la cinétique des IgG</b> à réaliser dans les cas suivants : - Lors d'une suspicion d'infection toxoplasmique aiguë (ou suspicion de toxoplasmose congénitale), sur deux échantillons prélevés à deux ou trois semaines d'intervalle et devant être titrés au cours d'une même série, avec la même technique. - Confirmation de la présence d'IgG suite à une 1 <sup>ère</sup> détermination chez une femme enceinte.	B 60
------	--	------

1427	<b>Test de confirmation par immuno-empreinte.</b> En présence de résultats équivoques d'IgG anti- <i>Toxoplasma</i> , 1 seule cotation.	B180
------	---	------

1428	<b>Test de confirmation par une autre technique.</b> En présence de résultats équivoques ou positifs d'IgM anti- <i>Toxoplasma</i> , obtenu lors du test 1420, la confirmation devra être réalisée sur un nouveau prélèvement et par technique différente 1 seule cotation.	B 20
------	---	------

1438	<b>• Chez la femme enceinte</b> <b>Test de mesure d'avidité des IgG anti-<i>Toxoplasma</i></b> pour dater l'infection lors d'une suspicion d'infection récente (en présence d'IgG anti- <i>Toxoplasma</i> , et de positivité des IgM confirmée par une seconde technique) réalisé sur le sérum initial. 1 seule cotation.	B120
------	--	------

1439	<b>• Lors d'une suspicion de toxoplasmose congénitale (nouveau-né, enfant de moins de un an) ou en cas de suspicion de toxoplasmose oculaire</b> <b>Recherche d'une néosynthèse d'IgG, d'IgM ou d'IgA</b> par comparaison de profils entre deux échantillons par immuno-empreinte 1 seule cotation par iso-type, maximum 2 isotypes.	B320
------	--	------

Les actes 1421, 1427, 1428 et 1438 sont à l'initiative du biologiste

## Annexe 12 : habilitation initiale à la validation des sérologies de la toxoplasmose (BIO-70180-FO-100)

Plateau de Biologie Hospitalière - CHU Angers 4 rue Larrey 49933 ANGERS Cedex 9	<b>Habilitation initiale à la validation des sérologies de la toxoplasmose</b>	Ref : BIO-70180-FO-100 V01 Version : 01 Applicable le : 14-12-2018
--	--	--

NOM – PRENOM : KLOSEK Marion

SEMESTRE : Nov 2018 - Avril 2019

### 1. PRE REQUIS

- Prise de connaissance sur KaliLab des documents propres à l'Unité Fonctionnelle
- Prise de connaissance sur KaliLab du document correspondant aux recommandations de l'HAS

### 2. VALIDATION DE DOSSIERS DE SEROLOGIE DE LA TOXOPLASMOSE

Phases d'observation, de tutorat et d'évaluation de l'interne ou du biologiste sous la responsabilité du biologiste référent

### 3. QCM POUR L'HABILITATION A LA VALIDATION DES SEROLOGIES DE NIVEAU B (DATATION)

Note minimale requise : 8/10

### 4. CONCLUSION

#### Habilitation à la validation des sérologies de niveau A (dépistage)

Date et signature du tuteur 26/11/2018  
(biologiste référent du secteur ou RAQ)

BCI

#### Habilitation à la validation des sérologies de niveau B (datation)

Note obtenue aux QCM : 10/10

Date et signature du tuteur 11/01/2019  
(biologiste référent du secteur ou RAQ)

BCI

Plateau de Biologie Hospitalière - CHU Angers 4 rue Larrey 49933 ANGERS Cedex 9	<b>Habilitation initiale à la validation des sérologies de la toxoplasmose</b>	Ref : BIO-70180-FO-100 V01 Version : 01 Applicable le : 14-12-2018
--	--	--

### SEROLOGIES DE NIVEAU A

L'habilitation à la validation de "sérologies de niveau A" correspond à la validation de dossiers sérologiques après analyse sur l'Architect I2000 (Abbott) en IgG et IgM, et ne nécessitant pas de techniques complémentaires d'expertise.

Phase d'observation		
Date	VISA du tuteur	
06-11-18	BCI	
08-11-18	BCI	
Phase de tutorat		
Date	VISA du tuteur	
19-11-18	BCI	
21-11-18	BCI	
Phase d'évaluation (10 dossiers)		
Date	Numéro de dossier	VISA du tuteur
26/11/2018	185467 681 180 165 702 185 447 513 180 165 706 185 447 546 180 165 711 180 165 513 180 165 714 180 165 635 180 165 715	BCI

Date et signature de l'interne ou du biologiste :

Le 26/11/2018

Date et signature du tuteur :

26/11/2018 BCI

Plateau de Biologie Hospitalière - CHU Angers 4 rue Larrey 49933 ANGERS Cedex 9	<b>Habilitation initiale à la validation des sérologies de la toxoplasmose</b>	Ref : BIO-70180-FO-100 V01 Version : 01 Applicable le : 14-12-2018
--	--	--

### SEROLOGIES DE NIVEAU B

L'habilitation à la validation des "sérologies de niveau B" correspond à la validation d'expertises sérologiques de la toxoplasmose (dossiers complexes nécessitant la réalisation de techniques complémentaires : avidité des IgG, agglutination directe haute sensibilité, immunocapture - agglutination (ISAGA A et M), Western-Blot).

Phase d'observation		
Date	VISA du tuteur	
08-11-18	BCI	
27-11-18	BCI	
Phase de tutorat		
Date	VISA du tuteur	
03/12/18	BCI	
09/12/18	BCI	
Phase d'évaluation (10 dossiers)		
Date	Numéro de dossier	VISA du tuteur
18/12/2018	180 174 024 180 174 028 180 174 070 180 174 075 180 174 160 180 174 164 185 472 968 185 474 728 185 472 171 185 472 480	BCI
28/12/2018	185 681 664 180 175 045 180 177 782 180 180 568 180 177 806 185 694 530 180 177 807 185 692 105 180 178 878 180 182 158	BCI
08/01/2019	180 183 016 185 495 250 180 184 038 180 183 235 180 000 433 180 184 078 185 005 211 180 184 078 180 184 118 180 000 531	BCI
10/01/2019		

Date et signature de l'interne ou du biologiste :

Le 11/01/2019

Date et signature du tuteur :

11/01/2019 BCI

