Le laboratoire du Centre de traitement des soignants

D. Delaune[a], F. Janvier[b], V. Foissaud[c], T. Gaillard[b], O. Flusin[d], P. Dubrous[e], C. Mac Nab[c], E. Valade[f, g], A. Mérens[a, g]

a HIA Bégin, 69 avenue de Paris – 94163 Saint-Mandé Cedex.
b HIA Sainte Anne, 2 boulevard Sainte Anne – 83800 Toulon.
c HIA Percy, 101 avenue Henri Barbusse – 92141 Clamart Cedex.
d Institut de recherche biomédicale des armées, Équipe résidente de recherche en infectiologie tropicale, HIA Laveran, BP 60149 – 13384 Marseille Cedex 13.
e HIA R. Picqué, 351 route de Toulouse – 33882 Villenave d'Ornon Cedex.
f Institut de recherche biomédicale des armées, BP 43 – 91223 Brétigny sur Orge Cedex.
g École du Val-de-Grâce, 1 place Alphonse Laveran – 75230 Paris Cedex 05.

Résumé

La préparation, le déploiement et le fonctionnement quotidien du laboratoire du Centre de traitement des soignants en Guinée ont été possibles grâce à une collaboration entre les laboratoires de biologie médicale des Hôpitaux d'instruction des armées et l'Institut de recherche biomédicale des armées. Ce nouveau laboratoire projetable de niveau de sécurité biologique équivalent à un niveau 3 a été conçu spécifiquement pour la mission. L'objectif était de réaliser des analyses de biologie médicale variées, y compris moléculaires, au profit des patients hospitalisés au Centre de traitement des soignants et des militaires présents sur site. Il a été adapté aux contraintes liées au respect des règles de biosécurité et à la réalisation d'analyses de biologie moléculaire en zone tropicale.

Mots-clés : Biologie moléculaire. Biosécurité. Laboratoire projetable. Virus Ebola.

Abstract

THE RESEARCH LABORATORY OF THE HEALTHCARE CENTRE FOR MEDICAL STAFF.

The design, deployment and worflow of the laboratory of the healthcare Center for Medical Staff in Guinea were made possible thanks to a collaboration between French military hospital laboratories and military biomedical research centres. This new BLS3 field laboratory was designed and deployed for the first time to implement the Ebola virus RT-PCR and a wide panel of biological tests for hospitalized patients and soldiers. This laboratory was adapted to bio-security rules and molecular biology analysis in a tropical country.

Keywords: Bio-security. Ebola virus. Field laboratory. Molecular biology.

Introduction

Suite à la décision d'implantation d'un Centre de traitement des soignants (CTS) à Conakry armé par du personnel du Service de santé des armées (SSA), un laboratoire permettant non seulement le diagnostic de la maladie à virus Ebola, mais également le suivi des patients suspects ou contaminés par le virus Ebola a été conçu et projeté. Les points critiques étaient la mise en place des mesures de biosécurité pour la protection du personnel et de l'environnement, la détermination du panel des analyses réalisées et le choix des techniques, la conception du laboratoire et de son fonctionnement quotidien, l'achat en urgence et le ravitaillement des différents matériels, la formation des personnels avant projection. Une collaboration étroite entre des personnels des services de biologie médicale des Hôpitaux d'instruction des armées (HIA) et de l'Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA), avec le soutien logistique de la Direction des approvisionnements en produits de santé (DAPSA) et de l'Établissement de ravitaillement sanitaire des armées (ERSA), a permis de réaliser cette mission dans les délais impartis.

D. DELAUNE, médecin principal, praticien certifié. F. JANVIER, médecin en chef, praticien certifié. V. FOISSAUD, médecin en chef, praticien certifié. T. GAILLARD, pharmacien en chef, praticien certifié. O. FLUSIN, médecin en chef, praticien certifié. P. DUBROUS, médecin en chef, praticien certifié. C. MAC NAB, médecin en chef, praticien certifié. E. VALADE, médecin en chef, professeur agrégé du Val-de-Grâce. A. MÉRENS, médecin en chef, professeur agrégé du Val-de-Grâce.
Correspondance : Madame le médecin principal D. DELAUNE, Fédération des laboratoires, HIA Bégin, 69 avenue de Paris – 94163 Saint-Mandé Cedex.
E-mail : delaune.deborah@orange.fr

Préparation de la mission

Biosécurité au laboratoire : rappels

Les conditions et les modalités du diagnostic et du suivi biologique des patients cas possibles ou cas avérés de maladie à virus Ebola ont été dès le début de la crise une question centrale dans la réponse sanitaire internationale. En France, par exemple, seuls les Laboratoires de sécurité biologique de niveau 4 (LSB4) étaient habilités à manipuler des échantillons sanguins contenant du virus Ebola (1). Un seul laboratoire de ce type était fonctionnel en France, situé à Lyon. Ce laboratoire de recherche n'était pas en mesure d'assurer la réalisation d'analyses de biologie courante pour les patients. De plus les délais pré analytiques de certaines analyses (gaz du sang, hémostase, certains paramètres biochimiques) et la nécessité d'obtenir des résultats rapides pour certains paramètres (diagnostic différentiel ou suivi biologique) imposaient une proximité entre le patient et le laboratoire réalisant les analyses. L'arrêté du 6 août 2014 relatif à l'autorisation de manipulation dérogatoire de l'agent biologique de groupe 4 Ebola à des fins de réalisation d'examens biologiques pour les patients atteints d'infection avérée à cet agent a alors été publié. Il autorisait à titre dérogatoire la réalisation d'analyses biologiques dans les établissements de santé qui disposaient d'installations de niveau de confinement 3 et qui étaient équipés d'un Poste de sécurité microbiologique de niveau III (PSM III).

À défaut, ces analyses pouvaient désormais être réalisées dans les établissements de santé qui disposaient :

– d'installations de niveau de confinement 3 et étaient équipés d'un Poste de sécurité microbiologique de niveau II (PSM II) ;

– d'un automate placé sous tente plastique de protection et implanté dans la chambre d'isolement à pression négative du patient (2).

Une expérience préalable nécessaire

Dès le mois d'avril 2014 et les premières recommandations du Haut conseil de la santé publique (HCSP) (3), le laboratoire de l'HIA Bégin a effectué une expression de besoins de nouveaux automates et de nouveaux moyens de confinement (PSM de type III), au profit des LSB3 de l'HIA Bégin et de l'HIA Sainte-Anne. Suite à la désignation de l'HIA Bégin comme Établissement de santé de référence habilité, ces nouveaux automates et les nouvelles procédures de biosécurité ont été mis à profit dans le LSB3 dès le mois de septembre 2014 pour la prise en charge des deux seuls cas de MVE rapatriés sur le territoire national. À compter de novembre 2014, au vu des délais courts de conception du laboratoire du CTS, cette expérience préalable a permis de gagner beaucoup de temps dans le choix des matériels et la rédaction des procédures, mais également de rassurer les personnels projetés lors des premiers mandats grâce à une relation de confiance avec les formateurs.

Préparation matérielle

À partir de début novembre 2014, le Directeur central du Service de santé des armées a nommé un pilote et copilote d'un groupe de travail « laboratoire ». Afin d'optimiser les délais et les compétences, les pilotes ont défini et coordonné six sous-groupes de travail (analyses de biologie conventionnelle, biologie moléculaire, organisation du laboratoire, gestion des flux, sélection du personnel et formation). Après définition de la liste des analyses nécessaires ou souhaitables, ces groupes ont sélectionné les automates appropriés, déterminé les kits de biologie moléculaire adaptés au diagnostic parmi ceux alors disponibles sur le marché français. La liste des matériels et réactifs nécessaires a été établie et transmise à la DAPSA pour achat et projection sur le théâtre. L'ensemble représentait plus de 330 lignes de commande. Un plan du laboratoire et de ses équipements a été établi en fonction des données fournies par l'élément précurseur présent sur le site. La liste des éléments critiques en termes de réseau électrique et de moyens de communication a été rédigée. Un sous-groupe a mis au point une base de données biologique informatisée permettant l'enregistrement des bilans, le rendu des résultats et l'archivage de l'activité.

Les effectifs nécessaires pour armer le laboratoire ont été déterminés en fonction des séquences de travail envisagées : il a été défini un effectif nécessaire de 2 biologistes et 4 techniciens en l'absence de travail la nuit pour des mandats de 2 mois environ.

Formation des personnels

La formation des biologistes et techniciens projetés a été réalisée en deux temps. Ces personnels du laboratoire ont suivi une partie du module de formation commune à tous les personnels projetés sur le CTS au CEFOS (La Valbonne), afin de s'immerger dans l'équipe et de bien saisir la place du laboratoire dans le dispositif et les contraintes générales imposées aux cliniciens et aux paramédicaux en « zone rouge ».

Puis une formation spécifique de huit journées a été dispensée à l'HIA Bégin avant chaque départ : formation théorique et pratique sur la MVE, la biologie moléculaire, l'utilisation des nouveaux automates, des principes du travail en boîte à gants, les règles de biosécurité et de travail en LSB3, le bionettoyage et la décontamination du laboratoire, la gestion des Déchets d'activité de soins à risque infectieux (DASRI), la conduite à tenir en cas d'incident.

Grâce à l'installation dans un hangar de l'HIA Bégin d'une réplique du laboratoire de confinement projeté en Guinée, la partie pratique a pu être réalisée sur des matériels identiques à ceux déployés (ISOROOM, boîtes à gants, automates y compris biologie moléculaire). Les biologistes et techniciens ont ainsi pu s'approprier la mission, en réalisant concrètement sur de faux échantillons des séquences de travail complètes avec port des EPI. Une habilitation était établie avant départ par un contrôle continu et final. Pour la formation des équipes du 3e et 4e mandats, l'équipe pédagogique s'est enrichie avec la participation de personnels projetés

sur le premier mandat afin de bénéficier de leur retour d'expérience.

Format du laboratoire projeté

Confinement

Les aspects de biosécurité permettant d'assurer la protection du personnel et de l'environnement ont constitué un des points clés du laboratoire en développement. Il a été décidé de respecter au mieux la réglementation française en s'adaptant aux contraintes de terrain. À cette fin, le SSA s'est doté d'une nouvelle structure : une tente souple de 20 m^2 environ équipée d'un extracteur d'air créant une dépression (-40 Pa environ). Cette structure est pourvue d'un SAS lui-même en dépression intermédiaire (-20 Pa environ). Cette cascade de dépression permet d'assurer des séquences d'entrée et de sortie du personnel et du matériel sans rupture de confinement. L'air rejeté est filtré avec un filtre HEPA. Cette structure portant le nom d'ISOROOM peut être montée en 4 heures environ et peut être démontée après décontamination pour être transportée et redéployée sur un autre site. La décontamination est effectuée par vaporisation de peroxyde d'hydrogène.

En garantissant un rejet d'air filtré et une dépression, selon le principe des LSB3, l'ISOROOM assure la protection de l'environnement (fig. 1), en l'occurrence des autres espaces du laboratoire : secteur de biologie moléculaire, accueil, stockage, laboratoire conventionnel. Au-delà de ce rôle, l'ISOROOM a pour avantage de posséder un sas facilitant le déshabillage des personnels, un système sécurisé de gestion des DASRI. Par ailleurs, ses parois transparentes facilitent la supervision par le personnel situé à l'extérieur, ainsi que la communication.

La protection du personnel est assurée par deux boîtes à gants installées à l'intérieur de l'ISOROOM. Ces équipements rigides en dépression (environ -180 Pa) sont équipés d'un sas d'entrée du matériel et des échantillons permettant de réaliser le confinement de l'air situé à l'intérieur. L'ouverture des tubes, l'ensemble des analyses de biologie conventionnelles et l'inactivation des échantillons précédant les analyses

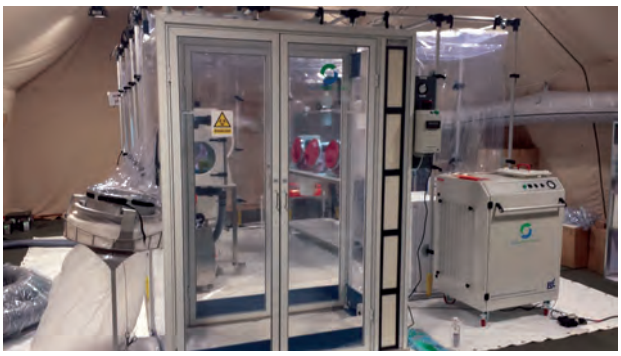


Figure 1. ISOROOM : structure souple pourvue d'un sas d'entrée ; sur la droite on observe l'extracteur pourvu de filtres HEPA de type H14 ; à l'intérieur se trouvent les deux boîtes à gants. © MC Foissaud.

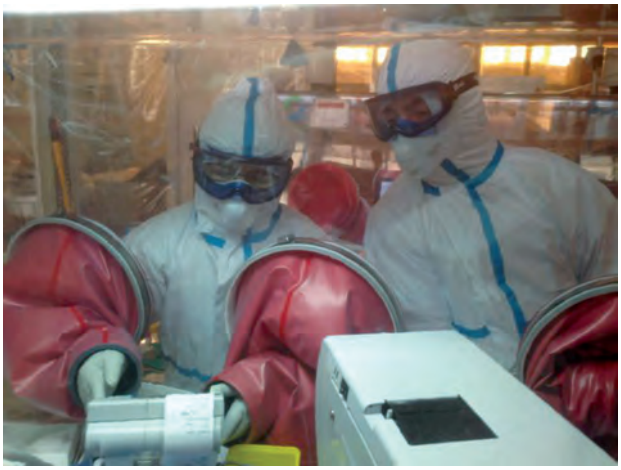


Figure 2. Manipulation en boîte à gants dans l'ISOROOM, ici dans le laboratoire de formation monté pour l'occasion sur l'HIA Bégin, réplique de celui du CTE de Conakry. © MC Mérens.

de biologie moléculaire étaient réalisés à l'intérieur des boîtes à gants (fig. 2). La décontamination de la boîte à gants peut être réalisée par vaporisation d'acide peracétique dans l'ensemble zone de travail plus sas ou dans le sas uniquement. Cette décontamination isolée du sas d'une durée d'une heure quinze minutes était réalisée à l'issue de chaque séance de travail. Il faut noter que la boîte à gants est une structure sans flux laminaire qui protège l'environnement et le personnel mais n'empêche pas la contamination inter échantillon.

Pour assurer la protection du personnel à l'intérieur de l'ISOROOM, en cas de rupture de confinement de la boîte à gants (perçage de gants par exemple) ou en cas d'ouverture simultanée inopinée des deux portes du sas de la boîte à gants ou en cas d'incident lors du conditionnement des DASRI, le personnel entrant dans l'ISOROOM portait des Équipements de Protection Individuels (EPI) : combinaison, surbottes, double paire de gants nitriles, masque, cagoule et lunettes de protection (fig. 3).

Des procédures de bionettoyage et de décontamination ont été élaborées pour éviter les incidents impliquant le personnel ou la contamination des échantillons. Le nettoyage des surfaces à l'intérieur des boîtes à gants était réalisé à l'aide d'un détergent désinfectant à base d'acide peracétique après chaque séance de travail. Le nettoyage quotidien des surfaces à l'intérieur de l'ISOROOM était réalisé en trois temps : détergent – désinfectant, rinçage à l'eau, désinfectant. La décontamination des boîtes à gants et de l'SOROOM était réalisée en cas d'incident, de rupture de confinement des boîtes à gants, à titre systématique de prévention ou avant le démontage pour reconditionner les matériels en toute sécurité. Ces séquences nécessitaient l'arrêt des automates et des analyses pendant 12 heures (décontamination isolée des boîtes à gants) à 24 heures (décontamination de l'ensemble du dispositif). Leur efficacité était validée par l'utilisation de témoins bactériens (spores de *Bacillus thermostearophilus* fixés sur des membranes) déposés aux endroits les moins exposés au produit vaporisé. Après décontamination, ces témoins étaient mis en



Figure 3. Équipement de protection d'un personnel de laboratoire pour une séance de travail dans l'ISOROOM. © MC Foissaud.

culture dans des bouillons incubés 7 jours à 37 °C. La négativité de la culture signait l'inactivation des spores (forme de résistance bactérienne dans l'environnement) donc l'efficacité de la décontamination.

Enfin l'élimination des DASRI générés par l'activité du laboratoire devait être maîtrisée. Le volume de déchets produits chaque jour par l'activité du laboratoire en période de pleine activité dépassait les capacités d'inactivation d'un autoclave de modèle comparable à ceux utilisés dans les laboratoires de type LSB3 en France. De plus l'installation et l'entretien d'un tel équipement étaient une incertitude en milieu tropical. Il a donc été décidé de conditionner les déchets souillés par le virus Ebola dans des conteneurs DASRI type OPTC ou sac dédiés et de les décontaminer dans le SAS d'entrée des boîtes à gants par vaporisation d'acide peracétique puis de les transférer dans des fûts DASRI vers l'incinérateur du CTS selon une procédure garantissant la protection des personnels.

Diagnostic de Maladie à virus Ebola (MVE)

La méthode recommandée par l'OMS pour le diagnostic des stades précoces de l'infection est le diagnostic par biologie moléculaire (détection de l'ARN viral par RT-PCR) ou la détection d'antigènes. À un stade plus tardif il est possible de réaliser le diagnostic par la détection d'IgM spécifiques (4). Le critère de guérison retenu par l'OMS étant la négativité de 2 RT-PCR sanguines réalisées à au moins 48 heures d'intervalle chez un patient asymptomatique, le laboratoire devait être équipé de techniques de biologie moléculaire. Si cette méthode présente de nombreux avantages : rapidité, sensibilité et spécificité, elle nécessite de maîtriser un certain nombre de points critiques : connaissance des cibles d'amplification, sensibilité, spécificité, respect de la chaîne du froid pour les réactifs, résistance des équipements aux conditions tropicales (température, humidité), respect du principe de marche en avant dans l'organisation des locaux et les séquences de travail pour éviter les contaminations. Lors de la conception du laboratoire, seuls trois kits commerciaux étaient disponibles en France (tab. I). Deux d'entre eux ont été sélectionnés pour équiper le laboratoire du CTS : le kit Altona et le kit Roche. Concernant le thermocycleur, la conception récente de l'Élément militaire d'intervention biologique et épidémiologique (EMIBE) avait permis de tester sur le terrain (collaboration IRBA – ERRIT/HIA Laveran) un thermocycleur (Smartcycler, Cepheid) utilisant des capillaires en plastique et permettant de réaliser des réactions différentes de RT-PCR simultanément. Cet automate robuste a été retenu pour équiper le laboratoire du CTS.

Paramètres de biologie conventionnelle

Afin de monitorer au mieux la prise en charge des patients atteints de MVE et d'adapter la thérapeutique, il a été défini une liste de paramètres biologiques d'intérêt à analyser permettant de proposer le même panel de paramètres d'urgence que celui disponible dans les hôpitaux de référence européens. Ces analyses devant être réalisées en LSB3, idéalement dans les boîtes à gants, il a donc été nécessaire d'équiper le laboratoire

Tableau I. Comparatif des kits de biologie moléculaires commerciaux disponibles pour le diagnostic et le suivi de MVE fin 2014.

Kit	Cible	Témoin positif	Contrôle interne	Remarques
RealStar Filovirus Screen RT-PCR kit (Altona Diagnostics)	gène L (polymérase)	oui	oui	multiplex : Ebola et Marburg
Lightmix Modular Ebola Virus Zaire (2014) Roche	gène L (polymérase)	oui	non	
Kit Ebola Virus (Zaire 2014) Assay and Control set Life technologies	non précisé par le fabricant	oui	non	

de systèmes analytiques de faible volume et permettant de réaliser les analyses souhaitées en temps limité en raison des contraintes environnementales sur le personnel pendant les séances de travail : port d'EPI par des températures avoisinant parfois les 30 °C pendant des durées pouvant aller jusqu'à 2 heures voire plus. Les automates sélectionnés permettaient de réaliser les analyses présentées dans le tableau II. Il a également été décidé d'équiper le laboratoire d'un back up identique pour chaque automate : ces analyseurs étaient situés hors de l'ISOROOM et permettaient de réaliser ces analyses pour des militaires soignés à l'unité médicale de transit, ne présentant ni fièvre, ni signe clinique évocateur d'une éventuelle MVE. Ces automates pouvaient être transférés dans l'ISOROOM en cas de panne de l'un des analyseurs de première ligne. La réalisation d'examens de bactériologie n'a pas été possible en raison de la nécessité d'équipements spécifiques non disponibles dans les délais impartis pour la mise en place de la mission (boîte à gants spécifiquement conçue pour contenir une petite étuve, microscope avec écran informatique déporté, automate d'incubation de flacons d'hémoculture adapté au format de l'ISOROOM). Pour cette même raison, ces analyses n'avaient pu être réalisées lors de la prise en charge des deux patients atteints de MVE à l'HIA Bégin.

Par ailleurs, la zone d'hospitalisation du CTS était équipée d'un automate de biologie délocalisée (I-stat, Abbott) permettant la réalisation d'analyses de biologie pour les admissions de patients en soirée ou en cas d'évolution défavorable nécessitant une réévaluation au cours de la nuit.

Déroulement de la mission

Déploiement du laboratoire

Le premier mandat a effectué la phase de montée en puissance du laboratoire (5). À son arrivée la zone d'installation du laboratoire avait été préparée : dalle de béton surélevée et installation de trois tentes type UTILIS pour installer le laboratoire. Après réception de l'ISOROOM, cette structure a été déployée dans la plus grande tente. Les matériels ont ensuite été agencés pour optimiser l'espace et permettre le principe de la marche en avant. Sur la figure 4 on observe cette répartition spatiale : la plus grande zone est dédiée à l'installation de l'ISOROOM, au stockage d'une partie du matériel de réserve et à l'extraction des échantillons inactivés. Au fond de cette zone on observe une sortie vers l'extérieur permettant l'évacuation des déchets vers la zone rouge du CTS pour y être incinérés. La tente intermédiaire est utilisée pour créer une zone protégée par du vinyle pour réalisation des mix et mélange mix-extraits (fig. 5), chacune de ces étapes bénéficiant d'une zone dédiée et d'un poste de travail (hotte sans flux laminaire) pour éviter les contaminations. Enfin, la première zone est réservée pour l'amplification propre et les automates back up utilisés pour les bilans de patients non suspects de MVE. Cette zone est également utilisée pour préparer les bilans du lendemain et saisir les résultats dans la base informatique.

Fonctionnement quotidien

Identito-vigilance

L'une des priorités dans la préparation de la mission était de garantir l'identito-vigilance. Pour cela une organisation spécifique a été développée. Chaque patient était identifié par un numéro unique à son arrivée

Tableau II. Automates utilisés au CTS et panel des analyses réalisables.

	PiccoloXpress (Abaxis)	Poch-100i (Sysmex)	Hémochron (Gamida)	Tests de diagnostic rapide	I Stat (Abbott)
Localisation	Boîte à gants dans ISOROOM	Boîte à gants dans ISOROOM	Boîte à gants dans ISOROOM	Boîte à gants dans ISOROOM	CTS zone hospitalisation
Paramètres	Na, K, Cl, tCO2, CRP, glucose, Ca, urée, créatinine, acide urique, ASAT, ALAT, PAL, GGT, bilirubine totale, amylase, albumine, CK, protéines totales	Numération sanguine - approche de formule sanguine	INR, ACT	Paludisme, VIH, dengue groupage sanguin épreuve globulaire	Na, K, Cl, tCO2, trou anionique, Ca ionisé, glucose, urée, créatinine, Hb/Ht, pH, PO2, PCO2, HCO3-, SO2, excès de bases, INR/TP
Durée des analyses	15 minutes pour une cassette de 12 paramètres (1 patient)	5 minutes pour une numération	5 minutes pour un paramètre	5 à 20 minutes par TDR	10 minutes pour une cartouche (1 à 12 paramètres selon les cartouches)
Limites	respect de la chaîne du froid pour les cartouches réactifs, rotor fragile, certains paramètres non mesurés si température ambiante > 30 °C (CRP)	packs réactifs encombrants dans une boîte à gants	respect de la chaîne du froid pour les cartouches réactifs	sensibilité du TDR paludisme imparfaite (faibles parasitémies, espèces autres que *P. falciparum*), pas de frottis sanguin pour confirmation de l'espèce et détermination de a parasitémie	respect de la chaîne du froid pour les cartouches réactifs

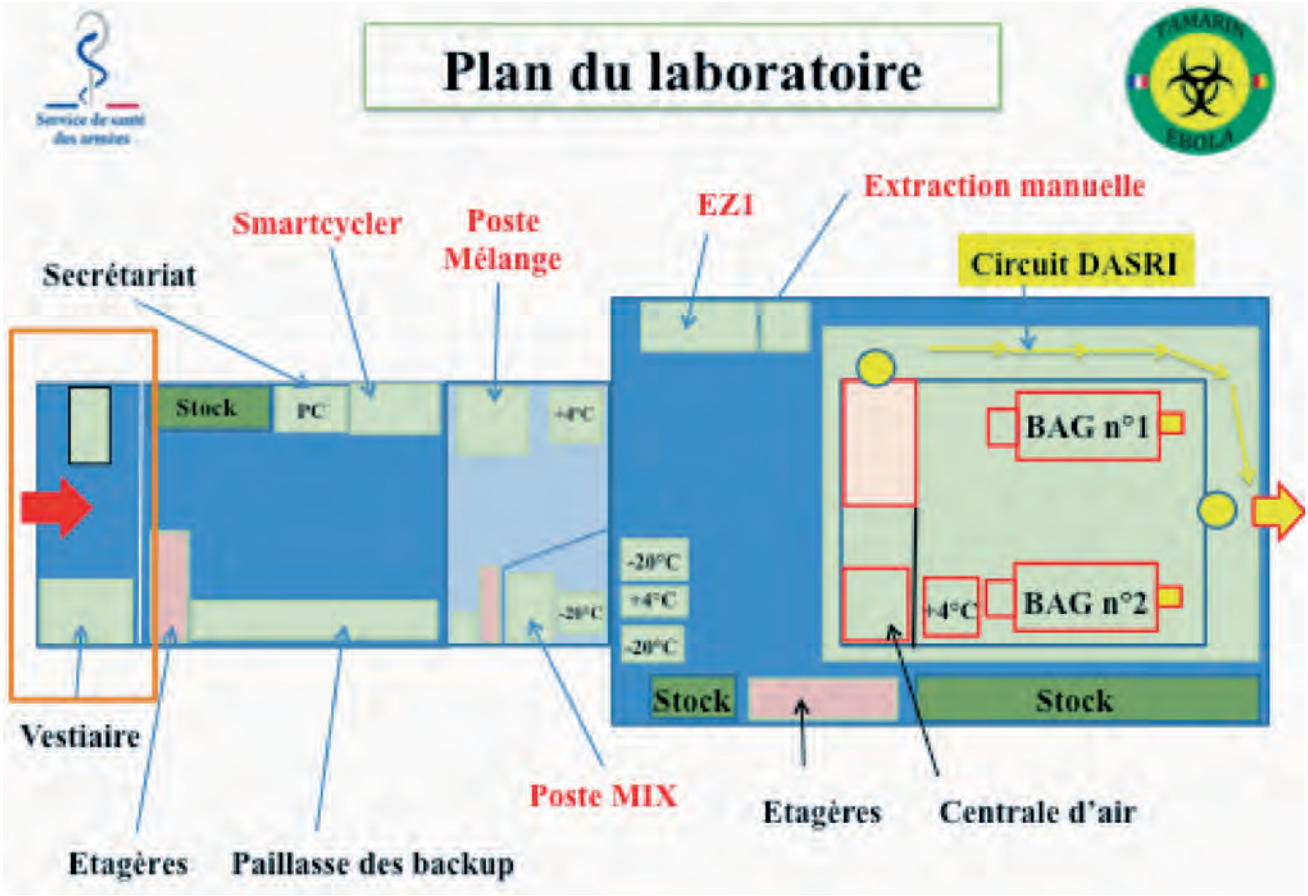


Figure 4. Plan du laboratoire : l'entrée dans le laboratoire se situe au niveau de la flèche rouge. © MC Foissaud.



Figure 5. Poste de travail de biologie moléculaire (zone mélange extraits – mix) ; la séparation des zones de travail et le respect du principe de marche en avant ont permis l'absence de contamination au cours de la mission. © MC Foissaud.

et une planche d'étiquettes à ce numéro était placée dans la chambre. Les bilans de chaque patient étaient discutés en staff médical puis le personnel du laboratoire préparait ces bilans : tubes identifiés par un numéro unique de bilan (étiquettes résistant au trempage de 15 minutes dans l'eau de javel), prescription pré remplie étiquetée avec le même numéro de bilan et un sac pour le retour au laboratoire. Le tout était placé dans un sac de transport identifié par le numéro d'identification patient et déposé au PC médical. Le lendemain le personnel médical effectuait la visite avec ces sacs. Si un patient devait bénéficier d'un bilan le personnel préleveur entrait dans la chambre avec le sachet, réalisait le bilan, réalisait le trempage des tubes 15 minutes dans l'eau de javel, identifiait la prescription avec une étiquette issue de la planche présente dans la chambre. Tubes et prescription étaient ensuite placés dans le sac de retour et transférés vers de la zone de récupération des bilans par le laboratoire.

Réalisation des analyses

Après récupération des bilans par le laboratoire selon une procédure garantissant la protection des personnels, les bilans étaient transportés au laboratoire pour analyse immédiate. Deux personnels équipés d'EPI pénétraient dans l'ISOROOM avec les bilans, les solutions de décontaminations nouvellement reconstituées et les réactifs nécessaires aux analyses. Chaque personnel réalisait les analyses spécifiques d'une boîte à gants et les contrôles de qualité des automates. La première boîte à gants était destinée à la réception des bilans : ouverture des sachets, vérification de la conformité des échantillons et de l'identito vigilance, réalisation des tests de diagnostic rapide : paludisme, VIH, dengue, des analyses de biochimie et d'hémostase. Les tubes

destinés à la seconde boîte à gants étaient transférés par une boîte de transfert hermétique. Dans la seconde boîte à gants étaient réalisées les analyses d'hématologie, le groupage sanguin (épreuve globulaire uniquement) et l'inactivation du plasma avant réalisation des analyses de biologie moléculaire. Chaque ticket automate ou écran d'analyseur était photographié grâce à un appareil photo situé en permanence à l'intérieur de l'ISOROOM. Les fichiers étaient transmis par Bluetooth au même appareil situé à proximité de l'ISOROOM et relié à un ordinateur. Les fichiers étaient ainsi sauvegardés en temps réel sur le système informatique sécurisé du CTS. À l'issue de la séance de travail le plasma inactivé était transféré dans des cryotubes, lesquels étaient désinfectés par trempage pendant 15 minutes dans une solution d'acide peracétique et transférés via le sas d'entrée au personnel en charge des analyses de biologie moléculaire. Chaque séance de travail durait entre 1h et 2h30 selon le nombre d'analyses à réaliser. Les personnels présents dans l'ISOROOM travaillaient sous la responsabilité d'un superviseur chargé de récupérer et saisir les résultats d'analyses, noter les réactifs et matériels pouvant venir à manquer pour une prochaine séance de travail, gérer le minutage des tests de diagnostic rapide, des étapes d'inactivation et de décontamination, encadrer la phase de sortie et déshabillage et participer à la prise en charge en cas d'incident (alerter les personnels de l'Unité médicale de transit et aider le binôme pour la sortie de la victime).

Pour rendre les résultats aux cliniciens, une base ACCESS avait été développée avant l'installation du laboratoire. Cette base permettait de saisir les résultats transmis par Bluetooth dans un dossier unique identifié par le numéro du patient, son état civil, la date du prélèvement et de réalisation des analyses et le numéro d'identification du bilan. Après vérification par un deuxième personnel, les résultats étaient imprimés et signés par le biologiste puis transmis au staff médical. Une sauvegarde régulière de la base a permis la récupération de l'ensemble des données biologiques de la mission et son archivage à l'EVDG pour la réalisation de travaux ultérieurs. La réalisation d'un panel d'analyses biologiques aussi complet que le permettaient les circonstances a contribué au monitorage le plus précis possible des patients pour optimiser leur prise en charge et à l'établissement de critères pronostics (6).

Adaptation aux contraintes

Rapidement il est apparu que le réactif de biologie moléculaire utilisé en première intention (kit Altona) était moins sensible que le kit de seconde intention (kit Roche) sur les faibles charges virales, cette différence étant expliquée par une cible plus spécifique de la souche épidémique dans le second kit (7). En revanche la présence d'un contrôle interne dans le kit Altona présentait l'avantage de valider l'absence d'inhibiteurs lors de l'amplification. Ainsi ce kit était préférentiellement utilisé en diagnostic initial (contrôle systématique à 48 heures si le premier prélèvement avait été prélevé moins de 72 heures après le début des signes cliniques permettant d'écarter les faux négatifs) et le suivi en période de forte virémie et le kit Roche pour la confirmation de la guérison (deux PCR négatives dans le sang à 48 heures d'intervalle).

Concernant les conditions environnementales, les défis à relever étaient la limitation de l'empoussièrement du laboratoire (risque de contaminer les zones de biologie moléculaire par des inhibiteurs de PCR). Cette maîtrise a été possible grâce à la création au niveau de la tente d'entrée d'un sas délimité par du film plastique vinyle et le port systématique de sur chaussures jetables au-delà de cette zone par le personnel et tous les visiteurs. Un autre défi était d'assurer le fonctionnement des automates et systèmes informatiques par des températures très élevées en milieu de journée. Pour cela toutes les tentes du laboratoire étaient tempérées par un système de climatisation. Cependant les températures dépassaient régulièrement les 30 °C en journée dans le laboratoire et l'ISOROOM pouvant générer des défaillances d'automates : ainsi sur l'analyseur de biochimie, le paramètre CRP ne pouvait être rendu au-delà de 28 °C. Les bilans pour lesquels ce paramètre était prescrit étaient donc réalisés le plus tôt possible le matin. Un autre point clé était la stabilité des installations électriques : fragilité des automates en cas de coupures de courant répétées et/ou surtensions, risque de non-réalisation des analyses de biologie moléculaire en cas de coupure de courant au cours des analyses d'extraction automatisée ou d'amplification par RT-PCR avec *a minima* une perte de temps voire la perte de l'échantillon et nécessité d'un nouveau prélèvement. Pour éviter ces problèmes, les analyseurs critiques (biologie moléculaire) étaient placés sur onduleur permettant la réalisation de la fin des analyses en cours en cas de coupure. Un groupe électrogène spécifique au laboratoire était également installé prêt à prendre le relais en cas de coupure prolongée. Cette installation permettait de limiter le risque d'indisponibilité prolongée du laboratoire ou le risque de rupture de confinement au niveau de l'ISOROOM ou la perte de réactifs situés dans les enceintes réfrigérées du laboratoire (biologie moléculaire en particulier).

Activités transversales

Les personnels du laboratoire présents sur place étaient également sollicités pour la formation du personnel hospitalier à l'utilisation de l'automate de biologie délocalisée, à la réalisation de bilans sur cet automate lors de l'admission des patients (accompagnement de l'équipe médicale en zone d'hospitalisation), le conseil au commandement dans le domaine de la biosécurité, de l'hygiène hospitalière, des décontaminations et du désengagement. Il a participé à un protocole de recherche clinique en assurant la préparation et le conditionnement d'échantillons à destination du laboratoire P4 de Lyon. Il a également effectué des travaux sur la conservation pré analytique des échantillons destinés au diagnostic de la MVE (8) et sur la survie du virus dans l'environnement en zone d'hospitalisation.

Le personnel a participé aux réunions de la sous-commission laboratoires de la coordination nationale guinéenne pour la lutte contre Ebola. Il a également pris part à la formation de médecins militaires guinéens dont 7 médecins biologistes au diagnostic de la MVE.

Bilan et enseignements

Au total la mission a duré près de 7 mois : 4 équipes se sont succédé (7 médecins biologistes et 13 techniciens de laboratoires, ces personnels étant issus des HIA, de l'IRBA et de l'Élément de préparation et de réponse aux urgences sanitaires). Près de 300 bilans ont été réalisés au profit des 61 patients pris en charge au CTS (suspicion de MVE ou MVE confirmée).

À l'issue de la prise en charge des patients le personnel du laboratoire a également participé au désengagement de la mission : décontamination des matériels réutilisables et reconditionnement avant leur retour en France.

Les points sensibles soulevés par le déploiement sont la nécessité d'une chaîne du froid correcte lors du transport des réactifs et la possibilité de stockage en enceintes froides sur place, la nécessité d'un réseau électrique fiable ou d'onduleurs et/ou groupes électrogènes de bonne qualité, la nécessité de locaux climatisés pour le travail en EPI et pour respecter les conditions ambiantes nécessaires au bon fonctionnement des analyseurs.

Conclusion

Cette expérience de déploiement d'un laboratoire de niveau de sécurité biologique de type LSB3 (voire même LSB3 +) a constitué un défi relevé conjointement par les équipes de biologie médicale des HIA et de l'IRBA. Cette structure et ces équipements qui ont été reconditionnés pourront être utilisés de nouveau en cas de nouvelle crise sanitaire. Pour cela le personnel doit être régulièrement formé et entraîné, les équipements réévalués et adaptés aux évolutions technologiques et aux particularités des agents biologiques suspectés ou isolés.

Les auteurs ne déclarent pas de conflit d'intérêt concernant les données présentées dans cet article.

Ensemble du personnel ayant contribué à la préparation de la mission et/ou au déroulement.

HIA Bégin :	MC A. Mérens, MP D. Delaune, MC C. Bigaillon, PC H. Delacour, MC C. Ficko, TLCS O. Pichelin, TLCS C. Gros, TLCS A. Wuille, TPCCS N. Guitard, TLCN M. Lyatmi, TLCN L. Roussé
HIA Percy :	MC V. Foissaud, MC C. Mac Nab, TLCN L. Queval, TLCN R. Boffy
HIA Sainte Anne :	MC F. Janvier, PC T. Gaillard, TLCN J. Top, TLCN K. Fourmaux, TLCN Y. Honeywood
HIA Legouest :	MP P. Perez
HIA Laveran :	MC E. Garnotel, TLCN L. Dresch, TLCN S. Gorbatch
HIA Robert Picqué :	MC JL. Koeck, MC P. Dubrous
IRBA :	MC E. Valade, PP T. Poyot, IEF S. Richard, IEF J.C. Paucod, TLCS A. Caclart, TLCN S. Brun, TLCN C. Vigier
IRBA ERL :	PC C. Peyrefitte, Dr O. Ferraris, TLCN F. Jarjaval
IRBA ERRIT :	Dr I. Leparc Goffart, MC O. Flusin, TLCN L. Boubis, TLCS P. Gravier
DCSSA :	PC F. Thibaut, PC B. Conte, PC P-A Le Goff
EPRUS :	M^{me} E. Tracqui
DAPSA :	PC S. Girardot
ERSA :	les THS

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Arrêté du 16 juillet 2007 fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes. Journal officiel de la République française 4 août 2007.
2. Arrêté du 6 août 2014 relatif à l'autorisation de manipulation dérogatoire de l'agent biologique de groupe 4 Ebola à des fins de réalisation d'examens biologiques pour les patients atteints d'infection avérée à cet agent. Journal officiel de la République française, 9 août 2014.
3. Avis relatif à la conduite à tenir autour des cas suspects de maladie Ebola. Haut Conseil de la Santé Publique 10 avril 2014.
4. Laboratory diagnosis of Ebola virus disease'. World Health Organization, Geneva : http://who.int/csr/resources/publications/ebola/laboratory-guidance/en/. September 2014.
5. Janvier F, Foissaud V, Delaune D, Flusin O, Dubrous P, Mac Nab C, et al. Deployment of the French Military Field Laboratory Dedicated to Ebola Virus Infected Patients in Guinea, January-July 2015. J Infect Dis 2015.
6. Cournac JM, Karkowski L, Bordes J, Aletti M, Duron S, Janvier F, et al. Rhabdomyolysis in Ebola virus disease. Results of an observational study in a treatment center in Guinea. Clin Infect Dis 2016 ; 62 : 19-23.
7. Janvier F, Gorbatch S, Queval L, Top J, Vigier C, Cotte J, et al. Difficulties of interpretation of Zaire Ebola Virus PCR results and implication in the field. J Clin Virol 2015 ; 67 : 36-7.
8. Janvier F, Poyot T, Valade E, Mérens A, Rollin PE, Foissaud V. Ebola Virus RNA Stability in Human Blood and Urine in West Africa's Environmental Conditions Emerging Infectious Diseases 2016 ; 22 (2).