

Université Pierre et Marie Curie  
Paris 6

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

**Mise en place de contrôles de qualité interne  
dans un laboratoire de bactériologie**

**Verdet Charlotte  
2010-2011**

## **Note au lecteur**

Les mémoires des stagiaires du Diplôme Universitaire » « Assurance Qualité du laboratoire de biologie médicale » sont des travaux réalisés pendant l'année de formation.

Les opinions exprimées n'engagent que les auteurs.

Les travaux ne peuvent faire l'objet d'une publication en tout, ou partie, sans l'accord de l'auteur et du responsable du DU concerné.



Hôpitaux  
Universitaires  
Paris Est

• Saint-Antoine • Rothschild  
• Trousseau La Roche-Guyon • Tenon

Dr Charlotte Verdet

Praticien Hospitalier

Laboratoire de Bactériologie-Hygiène

Hôpitaux Universitaires Paris Est – Tenon

4 rue de la Chine 75970 Paris cedex 20

Tel : 01 56 01 67 33

Fax : 01 56 01 61 08

Mail : [charlotte.verdet@tnn.aphp.fr](mailto:charlotte.verdet@tnn.aphp.fr)

## Remerciements

La mise en place de la norme ISO EN 15189 dans un laboratoire de Bactériologie-Hygiène de l'AP-HP est un défi particulièrement difficile à relever en une période de restructuration profonde, avec la mise en place de pôles à l'échelle du groupement hospitalier, ce qui élargit considérablement le périmètre du LBM. Depuis un an, une cellule « qualité » s'est constituée au sein du pôle de biologie de l'hôpital Tenon, regroupant des biologistes, des cadres, des techniciens, des secrétaires et des agents hospitaliers de différentes disciplines biologiques. J'ai été désignée référente pour l'équipe de Bactériologie-Hygiène.

Des groupes de travail se sont mis progressivement en place autour de thématiques transdisciplinaires, dans un but d'homogénéisation des pratiques, mais aussi d'émulation et d'entraide en attendant la nomination d'un RAQ.

Dans ce contexte de profonde mutation, en attendant que s'organise le management à l'échelle du LBM, il m'a semblé opportun de concentrer l'effort de notre équipe sur le cœur de notre métier : la bactériologie. Ce choix est motivé par mon souhait de m'engager avec l'équipe de bactériologie dans l'accréditation par l'abord le plus direct, la phase analytique, qui requiert la plus grande implication. Tous les techniciens et biologistes ayant constaté qu'il existait une marge de manoeuvre dans l'amélioration de la qualité à la phase analytique, il m'est apparu plus facile de convaincre une majorité d'entre eux d'adhérer à ce projet.

Aussi, je remercie pour leur soutien actif mon chef de service, Guillaume Arlet, mes collègues biologistes, Sophie Vimont, Mouna Ben Soltana et Mouna Doufair, ainsi que l'ensemble de l'équipe technique, notamment Christelle Logereau et Isabelle Scatena, ainsi que Thierry Kerdaffrec, cadre logisticien.

# Sommaire

Glossaire	p. 1
Introduction	p. 2
1. Analyse de la maîtrise de risques	p. 3
1.1 Lister les facteurs de risque	p. 3
1.2 Hiérarchiser les facteurs de risque	p. 3
1.3 Prouver la maîtrise des facteurs de risque	p. 4
2. Contrôles internes de qualité (CQI)	p. 7
2.1 Situation existante	p. 7
2.2 Préparation	p. 8
2.2.1 Tests de sensibilité aux antibiotiques	p. 9
2.2.2 Suivi des réactifs d'identification bactérienne	p. 10
2.2.3 Galeries commerciales d'identification	p. 11
2.3 Résultats	p. 12
2.3.1 Suivi des antibiogrammes et Etest	p. 12
2.3.2 Réactifs d'identification bactérienne, galeries	p. 13
2.4 Analyse des résultats : apport du CQI à la maîtrise de la qualité	p. 14
2.4.1 Tests de sensibilité aux antibiotiques	p. 15
2.4.2 Identification bactérienne	p. 17
3. Bilan de cette première approche du CQI au laboratoire	p. 18
3.1 Pédagogie collective	p. 18
3.2 Intensification du CQI en vue de l'habilitation	p. 18
3.3 Antibiogrammes par diffusion : attention à la « sur-qualité »	p. 19
3.4 Antibiogrammes par diffusion : cibler les CQI	p. 20
3.5 Détermination des CMI par Etest	p. 20
4. Conclusion	p. 22
Références bibliographiques	p. 23
Annexes	p. 24
Annexe I : Diagramme d'Ishikawa Analyse de risques du processus analytique	p. 25
Annexe II : Logigramme résumant le cycle de vie d'un réactif	p. 26
Annexe III : Tableaux d'enregistrement "cycle de vie d'un réactif"	p. 27
Annexe IV: Suivi du CQI pour la souche <i>E. coli</i> ATCC 25922	p. 28
Annexe V : Suivi du CQI pour la souche <i>P. stuartii</i> ATCC 33672	p. 29
Annexe VI: Suivi du CQI pour la souche <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	p. 30
Annexe VII : Suivi du CQI pour la souche <i>S. aureus</i> ATCC 25923	p. 31
Annexe VIII : Fichier Excel de suivi des réactifs	p. 32

## Résumé

Le laboratoire de bactériologie-hygiène de l'hôpital Tenon est entré en 2010 dans la démarche d'accréditation selon la norme ISO EN 15189, en même temps que les autres services du pôle de biologie. J'ai choisi d'engager le laboratoire dans un travail sur la phase analytique de l'examen bactériologique, en commençant à introduire des contrôles de qualité internes (CQI) sur un petit nombre de tests en bactériologie standard : tests d'identification bactérienne et tests de sensibilité aux antibiotiques. Il importait au préalable de procéder à une analyse des risques de la phase analytique, et donc de bien repérer les facteurs susceptibles d'exercer un effet sur la qualité des réactifs, en amont de la pratique des CQI.

La mise en place de CQI présente le grand intérêt de remettre en question des pratiques quotidiennes trop peu souvent révisées, et soulève de nombreuses questions techniques. Cependant, la généralisation du CQI à l'ensemble du processus analytique sur des tests exclusivement qualitatifs présente un intérêt variable en fonction des méthodes utilisées. L'intensification du CQI doit être couplé à un système de traçabilité informatique pour pouvoir relier un examen, à des réactifs, des techniciens et des biologistes.

## Glossaire

CQI = Contrôle Interne de Qualité

GH = groupement hospitalier

LBM = laboratoire de biologie médicale

AGEPS = agence générale des équipements et produits de santé

AP-HP = Assistance Publique Hôpitaux de Paris

ECBU = examen cyto-bactériologique des urines

PSM = poste de sécurité microbiologique

RAQ = référent assurance qualité

CA-SFM = Comité de l'Antibiogramme – Société Française de Microbiologie

AFSSAPS = agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

EEQ = Evaluation Externe de la Qualité

CMI = Concentration Minimale Inhibitrice

ATCC = American Type Culture Collection

CIP = collection de l'Institut Pasteur

CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute

UFC = unités formant colonies

S, I, R = sensible, intermédiaire, résistant (antibiogramme)

EUCAST = European Union Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing

## Introduction

La mise en place de contrôles internes de qualité (CQI) n'est qu'un des aspects du chantier ouvert dans notre laboratoire pour entrer dans la démarche d'accréditation et répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189. Il était indispensable au préalable que se mette en place un système de gestion documentaire au sein du laboratoire. Une cellule qualité s'est constituée dans l'équipe de bactériologie impliquant progressivement un nombre croissant de techniciens : parmi eux, une personne est en charge de la codification des documents générés au fur et à mesure dans le logiciel de traitement de texte Word, en attendant qu'un logiciel de gestion de la qualité adapté à notre LBM soit à notre disposition.

La norme exige que le laboratoire conçoive « des systèmes de contrôle interne de qualité permettant de vérifier que la qualité prévue des résultats est bien obtenue » (1). En bactériologie où les analyses sont toutes de type qualitatif et encore très manuelles, la notion de qualité prévue est moins triviale que pour un paramètre quantitatif dosé par un automate après une calibration. La maîtrise de la qualité analytique en bactériologie va essentiellement reposer sur une analyse de la maîtrise des risques, afin d'établir les éléments de variabilité du processus (2). Cette analyse de la maîtrise des risques précède la stratégie de mise en place des contrôles de qualité (3).

L'objectif de ce mémoire est donc de présenter la mise en place de CQI dans le laboratoire de bactériologie de l'hôpital Tenon. On distinguera les CQI concernant les réactifs usuels d'identification des bactéries d'une part, les CQI concernant les tests de sensibilité aux antibiotiques d'autre part. Cette étude n'a concerné qu'un nombre limité de réactifs et de souches de référence pour une meilleure acceptabilité de la part des techniciens.

La question qui m'intéresse est d'évaluer si les CQI doivent être pratiqués régulièrement, "seulement" parce que c'est obligatoire pour être conforme à la norme EN15189, ou bien parce qu'ils sont utiles dans l'amélioration continue de la qualité dans notre laboratoire.

## **1. Analyse de la maîtrise de risques**

L'intégralité du processus analytique doit être prise en compte. Il faut :

- Identifier et lister tous les facteurs susceptibles d'influencer le résultat de l'analyse.

- Justifier l'influence jugée non significative de certains facteurs qui ne sont pas pris en compte.

- Montrer comment sont maîtrisés les facteurs dont l'influence est significative, de manière à minimiser les risques et les erreurs (2).

### **1.1 Lister les facteurs de risque**

En m'appuyant sur l'exemple de l'examen cyto-bactériologique des urines (ECBU), examen le plus courant dans un laboratoire de bactériologie, je me propose d'analyser les facteurs de risque du processus analytique à partir de la méthode des « 5M » (main d'œuvre, milieu, matériel, matière et méthode). Cette analyse est résumée par le diagramme d'Ishikawa (cf. annexe I). La liste des éléments cités dans chaque « M » est longue, particulièrement pour le matériel, la méthode et la main-d'œuvre. A titre d'exemple, l'élément cité sous le terme « réactifs » (Matériel) désigne en réalité plus d'une centaine de références de consommables : des réactifs de coloration aux disques d'antibiotiques en passant par les réactifs d'identification des bactéries. Ces réactifs sont communs à plusieurs examens cyto-bactériologiques.

### **1.2 Hiérarchiser les facteurs de risque**

Les facteurs de risque que j'ai cités dans ce diagramme d'Ishikawa ont tous une influence significative sur le résultat final. Pour un ECBU, la qualité du microscope (« Moyen ») n'est pas plus ou moins importante que la qualité de la lecture microscopique (« Main-d'œuvre »). En amont, l'influence exercée par le choix de la méthode (comptage des leucocytes au microscope / cytomètre de flux), dépend moins de considérations biologiques (ou médicales) que financières, deux entités distinctes en laboratoire publique.

La maîtrise de l'intégralité des facteurs de risque est un défi d'autant plus important qu'il implique un très grand nombre de personnes extérieures au laboratoire : des personnes travaillant dans des services supports de l'hôpital ou du GH (service biomédical, service économique, service des ressources humaines, direction des soins infirmiers, services techniques des bâtiments...), des personnes

de l'AP-HP en dehors du GH (ex : centrale d'achats AGEPS), et aussi nos partenaires industriels qui commercialisent les réactifs, milieux de culture, automates, logiciels... A défaut de hiérarchiser les facteurs de risque, je me propose de souligner ceux sur lesquels le personnel du laboratoire peut exercer une maîtrise significative.

### 1.3 Prouver la maîtrise des facteurs de risque

En ce qui concerne les facteurs de risque dépendant de contingences externes, il appartient au LBM de mettre en place des contrats avec les fournisseurs, c'est-à-dire des cahiers des charges correspondant aux exigences d'accréditation à satisfaire ; le laboratoire doit également procéder à l'évaluation de ces services supports, « sur la base de la satisfaction, du respect des engagements contractuels [...]. Tout dysfonctionnement de ces critères est systématiquement enregistré (procédure des non-conformités), afin d'être exploité » (3).

#### Risques liés aux matériels, réactifs (« Moyen »)

Le tableau suivant présente quelques pistes d'actions à mener au laboratoire pour améliorer la maîtrise des risques.

Action	Matériel concerné	Fait/A faire
Lister le matériel critique (métrologie)	Réfrigérateurs congélateurs Etuves	cartographie d'enceintes thermostatées <b>à faire par un organisme agréé COFRAC</b>
Organisation d'une maintenance régulière	Microscopes Postes de sécurité microbiologique Colorateurs densitomètres Automates de lecture des galeries API Automates de lecture des antibiogrammes	<b>a priori fait</b> : par le service support (bio medical) <b>à faire</b> : améliorer la traçabilité par le laboratoire
Tracer les consommables	Géloses pour la primo-culture Réactifs d'identification Galeries API Réactifs de révélation des galeries Disques d'antibiotiques Géloses Muller-Hinton (antibiogrammes)	<b>fait</b> : traçabilité de la livraison <b>à faire</b> : traçabilité des certificats de conformité du fournisseur, traçabilité de l'utilisation des réactifs (ouverture, stabilité après ouverture) <b>à faire</b> : raccordement aux résultats d'analyse, aux techniciens utilisateurs. <b>Nécessité d'un logiciel de gestion des réactifs</b>
Prévenir les ruptures de stock	Réactifs « critiques » rapidement périssables ou d'utilisation rare	<b>à faire</b> : suivi dynamique de la consommation/péremption
Alertes de réactovigilance de l'AFSSAPS	Tous les réactifs et consommables	<b>à faire</b> : traçabilité du suivi des lots incriminés

L'essentiel du travail consiste à tracer ce qui est *a priori* bien fait. Un partenariat avec le service support bio-médical est primordial. Des investissements sont incontournables pour acquérir un équipement répondant aux exigences métrologiques (enceintes thermostatées notamment), mais aussi pour disposer d'un logiciel informatique permettant que « Le résultat d'une analyse [soit] systématiquement relié aux différents lots de réactifs, étalons et contrôles de qualité employés pour son obtention, ainsi qu'aux différents équipements utilisés et aux personnes intervenues (traçabilité) » (3).

#### Risques liés aux méthodes

« En bactériologie [...], le laboratoire peut se référer aux documents de référence REMIC [...] et pour la lecture et l'interprétation des antibiogrammes auprès des recommandations du CA-SFM (versions en rigueur). » (3). Les biologistes choisissent les techniques sur des critères scientifiques et également financiers. Dans notre laboratoire, beaucoup de méthodes manuelles sont très performantes (ex : l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé pour dévoiler des mécanismes de résistance rares), mais la démonstration de la maîtrise de la qualité semble très difficile (jusqu'à 32 disques d'antibiotiques différents par souche). Désormais, la nécessité de tracer toutes les données (réactifs, opérateurs, résultats...) devrait accélérer le processus de robotisation des techniques. En contrepartie, il est impossible de mesurer la perte d'informations lors du remplacement du technicien expérimenté par un robot, sur des analyses bactériologiques de type qualitatif.

#### Risques liés au personnel (« Main d'œuvre »)

Bien que le personnel (techniciens et biologistes) soit globalement compétent, appliqué et consciencieux, tout est à faire pour la démonstration de la maîtrise des risques liés à la main d'oeuvre : définir et tracer les compétences individuelles, qualifications, habilitations, plan de formation continue...

#### Risques liés aux locaux (« Milieu »)

« Pour la microbiologie [...], les locaux du laboratoire permettent une organisation du circuit des échantillons biologiques et aliquotes de manière à prévenir toute contamination croisée (« inter-échantillon ») : ensemencement, lecture, ... et respecter le principe de « la marche en avant » des échantillons

biologiques. » (3). « Afin de prévenir toute contamination, il convient que le laboratoire dispose de PSM de protection [...] adaptés aux micro-organismes manipulés par le laboratoire. » (3).

Le laboratoire, entièrement refait en 2002, ne présente pas rigoureusement les critères exigés ci-dessus, notamment parce que les PSM sont en nombre insuffisant. Les différentes étapes du circuit, pré-analytique à post-analytique, sont insuffisamment cloisonnées.

#### Maîtrise des risques liés à la matière première

La qualité de l'échantillon est particulièrement importante en bactériologie et repose sur le processus complexe de la phase pré-analytique impliquant également les services de soin.

## 2. Contrôles internes de qualité (CQI)

Les textes de référence émanant de sociétés savantes bactériologiques sont peu nombreux au sujet du CQI : citons le REMIC, le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM) (4, 5). Ils sont peu indicatifs en termes de nombre de souches à tester, de fréquence de passage, de conduite à tenir lors d'écart... Pour l'antibiogramme, le CA-SFM désigne cinq souches de référence et précise les moyennes et écart-type des diamètres d'inhibition obtenus par diffusion en gélose (5). Le LAB GTA 06, « Les contrôles de la qualité analytique en biologie médicale » édité en juillet 2005, est plus explicite : « [Le] CIQ [est] actuellement limité aux analyses fréquentes de Bactériologie *stricto sensu* », comme en particulier :

- la réalisation des cytologies urinaires dans le cadre des ECBU,
- les identifications bactériennes en méthodes classiques ou automatisées,
- les techniques d'antibiogramme et les examens assimilés (CMI) » (6).

« La finalité d'un contrôle de qualité en bactériologie [...] est de s'assurer de la pérennité des techniques choisies lors de la validation de méthodes. En pratique, l'objectif principal est de définir les circonstances ainsi que les fréquences des contrôles à effectuer.[...] Le passage régulier de souches de référence pour chaque technique sera fait selon une fréquence définie par le biologiste » (6). A ma connaissance, il n'existe pas une "autorité" qui fasse référence en bactériologie pour mettre en place des modalités consensuelles, notamment en terme de fréquence, sur la pratique du CQI. Lorsque la question a été posée par mail à la SFM, le président m'a renvoyée à la collégiale de Bactériologie, c'est-à-dire à mon chef de service. C'est donc localement à chaque équipe de biologistes de définir ses exigences.

### 2.1 Situation existante

Au début de ce travail, aucun CQI n'a été mis en place en bactériologie standard au sein du laboratoire. Les seuls contrôles de qualité régulièrement pratiqués sont ceux organisés par l'AFSSAPS, le contrôle de qualité national, à caractère obligatoire ; ces contrôles sont peu fréquents et limités à certains domaines. Le contrôle de qualité est donc vaguement perçu par l'équipe comme un outil d'évaluation du couple technicien/biologiste qui le prend en charge.

Il s'agit d'expliquer au préalable aux techniciens que le CQI se démarque de l'évaluation externe de la qualité (EEQ) puisqu'il constitue la validation continue du

processus analytique : il permet de vérifier la fiabilité des réactifs au laboratoire tout au long de leur utilisation. Concrètement, alors que l'EEQ consiste à identifier une souche inconnue, (ou un mécanisme de résistance inconnu) à l'aide des réactifs du laboratoire, le CQI consiste à utiliser une souche de référence connue pour valider des réactifs avant ou pendant leur utilisation.

L'activité « bactériologie standard » est le plus gros secteur du laboratoire par rapport à celui des mycobactéries, de la sérologie bactérienne et de l'hygiène ; il est subdivisé en quatre paillasse correspondant à des activités cliniques différentes :

- Chirurgie et pneumologie, dont deux réanimations
- Services de médecine
- Urologie et néphrologie, dont une unité de soins intensifs
- Gynécologie, obstétrique, néo-natologie

Lorsqu'un réactif est déstocké, les techniciens ont le plus souvent l'habitude de noter la date d'ouverture sur le conditionnement. Il n'existe par contre aucune traçabilité : durée d'utilisation, paillasse d'attribution... Il est donc impossible de relier le résultat d'un dossier patient à un lot de réactif. On ne connaît pas la durée de vie moyenne d'un réactif à une paillasse. Il arrive que plusieurs réactifs identiques soient ouverts par mégarde à une même paillasse. La date de péremption indiquée sur le conditionnement fait l'objet d'une attention particulière, mais la notion de validité à partir de l'ouverture n'est généralement pas repérée.

En ce qui concerne les antibiogrammes effectués exclusivement par diffusion sur géloses Mueller-Hinton, les CQI ne sont jamais pratiqués en dépit des recommandations du CA-SFM.

## **2.2 Préparation**

L'équipe est progressivement sensibilisée à l'entrée dans une démarche vers l'accréditation selon la norme EN 15189, dans laquelle s'inscrit la mise en place des contrôles de qualité. Des réunions hebdomadaires "qualité" de courte durée sont instaurées dans le laboratoire à partir de mai 2011 : elles sont l'occasion d'échanges au sein de l'équipe, entre biologistes et techniciens. Un compte-rendu est remis à chacun tous les mois.

### 2.2.1 Tests de sensibilité aux antibiotiques

Idéalement, le CQI doit être pratiqué à chaque changement de lot de réactifs (géloses et disques d'antibiotiques). La pratique de l'antibiogramme par diffusion sur gélose de Mueller-Hinton rend actuellement impossible la traçabilité des réactifs utilisés, puisque les antibiotiques ne sont pas reliés entre eux dans un même lot, comme c'est le cas pour une galerie en milieu liquide. En diffusion, chaque antibiotique constitue une référence. Or il peut y avoir jusqu'à 32 molécules testées par antibiogramme et le fournisseur actuel ne propose pas de solution informatique pour enregistrer tous les n° de lots d'antibiotiques utilisés. L'expérience prouve qu'il est illusoire de synchroniser la consommation des disques d'antibiotiques pour constituer localement un lot regroupant x unités de 32 antibiotiques.

Les disques d'antibiotiques sont disposés en cartouches stockées dans un petit container à +2-8°C au sec avec dessicant. Ces cartouches sont placées dans un distributeur pour l'application à la surface d'une gélose Mueller-Hintonensemencée par la souche à étudier. Le fournisseur préconise de placer une capsule de dessicant dans le distributeur rangé au réfrigérateur... mais les vieux modèles dont nous disposons n'ont pas d'emplacement prévu pour cette capsule. Une fois le container ouvert, la stabilité des cartouches est limitée à 6 semaines maximum, 2 seulement pour certains antibiotiques instables. Le turn-over des cartouches est inconnu, il faut l'estimer en traçant le renouvellement d'un antibiotique par distributeur.

La détermination des CMI se fait grâce à des bandelettes commercialisées Etest® imprégnées d'antibiotique selon un gradient de concentration. La conservation de ces bandelettes Etest est de plusieurs mois à condition qu'elles soient stockées à l'abri de l'humidité (dessicant) dans un pot de conservation à -20°C. Les Etest sont pratiqués ponctuellement pour certains antibiotiques, en complément de l'antibiogramme : la vancomycine et la téicoplanine chez des souches de *S. aureus* ; la Benzylpénicilline, l'amoxicilline et le céfotaxime chez des souches de *S. pneumoniae* ; la colistine chez des souches de *P. aeruginosa*.

En ce qui concerne les géloses Mueller-Hinton, le SH GTA 01 préconise que « en bactériologie [...], pour les milieux commercialisés, le certificat de conformité du fournisseur est suffisant ». Cet argument laisse la possibilité de ne pas exécuter de CQI à chaque changement de lot de géloses.

Dans une phase de sensibilisation de l'équipe à la qualité, il est décidé de tester, à un rythme mensuel trois souches de référence recommandées par le CA-SFM : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Ces trois espèces cultivent sans difficulté sur milieux ordinaires et sont très fréquemment isolées en clinique. Ces souches de référence sont de phénotype sauvage (sensible) et présentent donc de grands diamètres d'inhibition. *Providencia stuartii* est une espèce plus rarement isolée en pathologie infectieuse, qui présente naturellement une résistance à la gentamicine. La souche ATCC 33672 a été achetée au laboratoire parce que celle préconisée par le CA-SFM (CIP 107808) n'était pas disponible. Enfin *Streptococcus pneumoniae* est une espèce exigeante en facteurs de croissance. Le CA-SFM recommande de mesurer les CMI de trois  $\beta$ -lactamines sur la souche CIP 104485. Au laboratoire, nous disposons de la souche *S. pneumoniae* ATCC 49619 préconisée par le CLSI.

### **2.2.2 Suivi des réactifs d'identification bactérienne**

Il est nécessaire au préalable de définir les grandes étapes du circuit du réactif, de la livraison au laboratoire à l'élimination. Le logigramme résumant le cycle de vie d'un réactif (cf. annexe II) est un support pédagogique pour expliquer aux techniciens comment s'inscrit la démarche de validation du processus qualité. Il est incomplet puisque les documents de références (modes opératoires, fiches techniques...) relatifs à chaque étape ne sont pas encore finalisés. Une difficulté apparaît dans notre laboratoire où le flux des réactifs est géré sans l'aide d'un logiciel, donc sans possibilité de tracer de façon systématique et exhaustive la consommation des réactifs, ni les dates de stockage et de déstockage. De plus, une même référence peut comporter plusieurs unités identiques (appartenant au même lot) qui seront déstockées à des moments différents et utilisées à des paillasse différentes. C'est bien chaque unité qui, subissant des conditions de conservation différentes, devra faire l'objet d'un suivi dans le temps par le CQI. Pour favoriser l'adhésion de l'équipe technique à cette nouvelle démarche et aux contraintes de la traçabilité, les références (ou réactifs) sont choisies en quantité limitée (n=7) ; ce sont des réactifs très usuels contribuant à l'identification bactérienne, qui ne présentent pas de difficulté technique, utilisés à différents postes simultanément, à une fréquence élevée. Comme ils sont utilisés fréquemment, ces réactifs sont souvent ouverts/fermés, et quelquefois "oubliés" sur la paillasse alors qu'ils devraient être

stockés au réfrigérateur. Parmi eux, certains doivent être utilisés à température ambiante (tests d'agglutination). La nouveauté n'est donc pas technique mais uniquement d'ordre organisationnel.

D'après le SH GTA 01, « Le laboratoire peut qualifier ses matériels, notamment réactifs, lors de leur utilisation, sans être obligé de les tester à réception. Dans le cas de la vérification des réactifs, cette vérification peut passer par la mise en œuvre de l'analyse elle-même, à l'aide de contrôles internes de qualité (CIQ).» (3). Il est donc approprié de qualifier un réactif à l'ouverture du flacon (et non pas à réception au moment du stockage), puis de vérifier sa stabilité au cours du temps. C'est pourquoi il est proposé un CQI à l'ouverture, puis un CQI mensuel avec une souche de référence appropriée. Après une lecture attentive des recommandations d'utilisation des réactifs préconisées par les fournisseurs (température de stockage, durée de validité, modalités du CQI), un tableau est établi pour chacun des réactifs à chaque paillasse où il est utilisé. Avant leur mise en œuvre, ces tableaux ont été modifiés à la demande des techniciens. L'annexe III répertorie les têtes de tableaux de 4 réactifs, à titre d'exemple. Ces tableaux sont répertoriés dans le système documentaire comme formulaires pour enregistrements. Ils sont intégrés dans un classeur « qualité », accompagné du mode opératoire exposant la gestion des CQI.

### **2.2.3 Galeries commerciales d'identification**

Elles permettent d'identifier les bactéries au niveau du genre et de l'espèce. Leur gestion en tant que réactif est plus simple puisqu'une galerie regroupe plusieurs tests sous une même référence, ce qui facilite la traçabilité du lot. Chaque galerie est stockée sous blister individuel à +4°C avant utilisation,ensemencée par un inoculum bactérien puis incubée à 37°C avant lecture et révélation ; enfin elle est éliminée. En théorie, le certificat de conformité du fournisseur est donc suffisant pour prouver la maîtrise de la qualité de ce réactif "fermé". Il est décidé que cinq de ces galeries feront l'objet d'un CQI mensuel, en même temps que les tests de sensibilité : deux galeries pour les entérobactéries : ID32E et API20E (BioMerieux); deux galeries pour *P. aeruginosa* : ID32GN et API 20 NE (BioMerieux) ; une galerie pour *S. pneumoniae* : rapid ID32 Strept (BioMerieux).

## 2.3 Résultats

### 2.3.1 Suivi des antibiogrammes et Etest.

Les tests de sensibilité aux antibiotiques sur les souches de référence ont été intégrés à l'activité de routine : ils sont répartis aux quatre paillasses et pris en charge comme s'il s'agissait de souches cliniques. Il n'y a pas nécessairement de suivi par le même technicien d'un jour à l'autre, encore moins d'un mois à l'autre. L'inoculum bactérien doit être préparé à partir d'une ou de plusieurs colonies identiques ; cet inoculum est standardisé ( $10^6$  UFC/ml) grâce à l'usage d'un densitomètre, et étalé uniformément sur gélose Mueller-Hinton à l'aide d'un écouvillon. Les géloses sont incubées 18h à 37°C. Les antibiogrammes sont lus par une caméra, enregistrés et analysés par un logiciel expert. Le biologiste analyse le phénotype de résistance avant de valider l'antibiogramme, en tenant compte, dans la mesure du possible, de l'expertise proposée : au final, c'est le biologiste qui a la maîtrise de l'analyse phénotypique. Le CA-SFM publie des fourchettes de valeurs cible pour quelques antibiotiques majeurs (borne inf./borne sup.) (5).

Antibiogrammes : les résultats de 4 mois de suivi sont présentés dans les annexes IV à VII pour les souches de référence *E. coli*, *P. stuartii*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Plutôt que de suivre les diamètres des antibiotiques un par un, il est intéressant de considérer l'évolution de l'ensemble des antibiotiques en parallèle, ce qui permet de relativiser la part de l'effet de l'inoculum par rapport à d'autres paramètres.

*E. coli* : les résultats sont satisfaisants à l'exception du mois de juillet où la majorité des diamètres d'inhibition sont trop grands. L'hypothèse la plus probable est que l'inoculum bactérien n'était pas assez élevé lors du test de juillet. Les résultats sont satisfaisants les autres mois.

*P. stuartii* : la reproductibilité est très bonne d'un mois sur l'autre, ce qui signifie que les modalités techniques sont bien maîtrisées par l'ensemble des techniciens.

*P. aeruginosa* : les diamètres d'inhibition sont chaque fois globalement trop grands à l'exception notable de l'imipénème. Probablement, l'inoculum était systématiquement trop faible. Il est très fréquent que l'inoculum de souches cliniques de *P. aeruginosa* soit trop lourd alors que les recommandations pour le préparer sont identiques à celles des entérobactéries ; c'est pourquoi les techniciens ont l'habitude de ne pas respecter exactement les recommandations, et préparent un inoculum un

peu plus léger. Les souches de référence lyophilisées ou congelées n'ont pas les mêmes caractères culturels. L'imipénème semble moins sensible à l'effet inoculum.

*S. aureus* : les diamètres d'inhibition sont le plus souvent trop grands à l'exception du mois d'août, et à l'exception de certains antibiotiques. Là encore, l'inoculum bactérien est probablement en cause.

Etest : en ce qui concerne la détermination des CMI par Etest, le tableau ci-dessous répertorie les valeurs obtenues de trois  $\beta$ -lactamines avec la souche de *S. pneumoniae* ATCC 49619, ainsi que les fourchettes de valeurs cible. Les résultats de CMI sont satisfaisants à une exception près : la CMI de la pénicilline G en août a été sous-estimée, soit à cause d'un problème technique (glissement de la bandelette sur une gélose mal séchée), soit à cause d'un problème de lecture par le biologiste (confusion fréquente entre la zone d'hémolyse et la zone de culture).

Suivi du CQI pour la souche *S. pneumoniae* ATCC 49619

<i>S. pneumoniae</i>	mai	juin	juillet	août	borne inf	borne sup
péniG	0,25	0,38	0,38	0,023	0,25	1
AM	0,047	0,047	0,064	0,047	0,032	0,125
CTX	0,064	0,064	0,094	0,047	0,032	0,125

Péni G = pénicilline G ; AM = ampicilline ; CTX = céfotaxime

### 2.3.2 Réactifs d'identification bactérienne, galeries

Les tableaux de traçabilité de l'utilisation des réactifs usuels d'identification bactérienne sont remplis de façon irrégulière par les techniciens, ce qui rend difficile leur exploitation. Une minorité, habituellement réfractaire au changement, "oublie" notamment de tester les réactifs à l'ouverture du flacon. Il s'avère que la gestion des souches ATCC de référence est difficile puisqu'elles ne peuvent être entretenues à la pailleuse par repiquages successifs (5 repiquages maximum). Il faudrait donc anticiper l'ouverture d'un flacon en mettant en culture la veille une souche sortie du congélateur à -80°C. Dans certains cas, le résultat du test n'est connu d'ailleurs qu'après 24h de subculture (ex : sensibilité de *S. pneumoniae* à l'optochine) ; c'est pourquoi il y a au moins 48h de délai entre le repiquage d'une souche et le résultat d'un test. A moins d'avoir en permanence toutes les souches de référence fraîches à disposition, il est impossible de pratiquer le CQI à l'ouverture. C'est pourquoi, il est

proposé d'utiliser une souche clinique récemment isolée (1 ou 2 jours), préalablement identifiée à la paillasse, comme souche de « référence » pour le test à l'ouverture du flacon. Le LAB GTA 06 préconise d'ailleurs l'utilisation conjointe de « souches cliniques (...), correspondant à des souches isolées en pathologie infectieuse, bien identifiées, et correspondant à la pathologie courante observée chez des patients mais pas obligatoirement publiées » (6).

Le suivi durant 4 mois des CQI sur les réactifs usuels d'identification bactérienne n'a pas permis de mettre en évidence une défaillance de l'un d'entre eux, auquel cas il aurait été éliminé. Il a permis cependant de constater que le turnover des réactifs était très variable d'une paillasse à l'autre et que certains arrivaient à péremption avant consommation de la totalité : par exemple, l'oxydase principalement utilisée pour identifier *P. aeruginosa* n'a pas sa place à la paillasse gynéco-obstétrique ; si nécessaire le test est pratiqué à la paillasse d'à côté. Il a été décidé avec les techniciens de restreindre l'usage de certains réactifs à un nombre limité de paillasses.

Enfin les CQI effectués sur les galeries API sont excellents sur les deux entérobactéries (*E. coli* et *P. stuartii* : plus de 99% d'identification sur les deux galeries ID 32E et API 20E), satisfaisants sur *P. aeruginosa* (plus de 99% d'identification sur la galerie ID 32GN, 95% d'identification sur la galerie API 20 NE) plus aléatoires sur *S. pneumoniae* (de 50 à 99% d'identification avec la galerie rapid ID32 Strept).

#### **2.4 Analyse des résultats : apport du CQI à la maîtrise de la qualité**

En préambule, il faut souligner que le premier avantage de la mise en place de CQI a été la prise de conscience que de nombreuses dérives s'étaient installées dans l'utilisation des réactifs, et qu'il y avait donc une marge de manœuvre non négligeable pour améliorer la qualité. La phase de préparation qui a consisté à lire des fiches techniques de tests quasiment immuables, pratiqués pluri-quotidiennement par les techniciens, s'est révélée très instructive, notamment concernant les modalités de conservation des réactifs une fois entamés. L'impact réel de ces dysfonctionnements sur la qualité du résultat est cependant difficile à estimer.

## 2.4.1 Tests de sensibilité aux antibiotiques

### Antibiogrammes par diffusion :

• **effet inoculum** : On a vu que les résultats étaient disparates : plutôt satisfaisants pour *E. coli* et *P. stuartii*, plutôt non satisfaisants pour *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Globalement, les techniciens maîtrisent bien la technique de l'antibiogramme des entérobactéries... qui n'est pas différente de celle de *P. aeruginosa* et des staphylocoques. La pratique mensuelle des CQI n'a jamais permis de mettre en évidence une défaillance d'un disque d'antibiotique (diamètre effondré = antibiotique dégradé). Lorsque les conditions de conservation des antibiotiques sont respectées, la difficulté des tests de sensibilité aux antibiotiques réside dans la maîtrise de l'inoculum bactérien par le technicien. La qualité de l'inoculum repose sur trois paramètres :

- le densitomètre : il ne fait pas l'objet de contrôles.
- L'homogénéisation de l'inoculum : les techniciens disposent d'un vortex. Est-il utilisé systématiquement ?
- La bactérie elle-même qui ne se disperse pas toujours facilement en suspension, par exemple à cause de la production d'une capsule (ce n'est pas le cas des souches de référence)

• **système de lecture** : on peut également remettre en cause le système de lecture de l'antibiogramme : la caméra repère la différence de densité bactérienne à la périphérie d'un diamètre d'inhibition. Le diamètre lu par la caméra et transmis au logiciel doit être vérifié visuellement par le technicien à l'aide d'un pied à coulisse car la zone limite est parfois un peu floue, "en dentelles", et le diamètre d'inhibition surestimé. Les techniciens ont lu les antibiogrammes sans connaître les valeurs cible, et il est possible qu'un certain nombre d'entre eux n'aient pas corrigé la lecture brute faite par la caméra, par négligence comme c'est quelquefois le cas avec des souches cliniques.

• **lecture interprétative de l'antibiogramme** : le biologiste observe l'antibiogramme essentiellement pour repérer les mécanismes de résistance aux antibiotiques, et traduire l'estimation d'une activité *in vitro* en une catégorisation clinique S, I ou R selon le risque d'échec thérapeutique *in vivo*. Le très grand avantage de la méthode de diffusion par rapport à celles de dilution en milieu liquide, est que le biologiste un peu entraîné peut analyser de façon très fine le phénotype de

résistance aux différentes familles d'antibiotiques, voire peut détecter des mécanismes de résistance émergents. Devant une souche qui n'exprime pas de mécanisme de résistance, ni naturelle, ni acquise, le biologiste s'attarde peu sur la valeur des diamètres d'inhibition.

#### Détermination des CMI par Etest :

Comme pour l'antibiogramme par diffusion, la qualité de l'inoculum est un paramètre critique. D'autres difficultés techniques se surajoutent : conservation délicate des bandelettes, nécessité de bien laisser sécher la surface de la gélose avant de déposer la bandelette (risque de glissement), difficulté de lecture. Contrairement aux diamètres d'inhibition sur l'antibiogramme, les CMI mesurées par Etest constituent des données brutes qui ne feront pas l'objet d'une interprétation en fonction du mécanisme de résistance identifié. Les cliniciens se servent directement de cette valeur de CMI pour adapter la posologie de l'antibiotique lors d'infections graves (ex : méningite à pneumocoque). Il est donc primordial que la valeur rendue soit précise et juste, et les CQI effectués sur des souches de référence permettent de s'assurer de la validité de la technique et de la lecture.

Les CQI effectués sur la souche de *S. pneumoniae* sont presque tous compris dans les valeurs cible, ce qui est *a priori* satisfaisant pour la qualité du résultat rendu. Cependant, l'observatoire régional du pneumocoque d'Ile-de-France soulignait récemment que tous les laboratoires qui mesuraient les CMI des pneumocoques par Etest étaient souvent discordants de la méthode de référence (dilution en milieu gélosé de Mueller-Hinton additionné de 5% de sang), par excès ou par défaut, et jamais systématiquement dans le même sens pour un laboratoire donné. En fait, la distance sur la bandelette Etest qui sépare la borne inférieure de la borne supérieure des valeurs cible est importante (environ 7 mm), ce qui laisse une grande marge de variation lors de la lecture du test de la souche de référence.

En conclusion, il semblerait que ce n'est pas parce que les résultats du CQI sont corrects d'après le CA-SFM, que les résultats rendus sont fiables. De nombreux laboratoires qui pratiquent l'antibiogramme par méthode de diffusion en milieu gélosé ont recours aux Etest par commodité parce que la méthode de référence est impraticable en routine. La maîtrise de la qualité passe probablement par un changement de méthode.

#### 2.4.2 Identification bactérienne

La pratique régulière de CQI sur "seulement" sept références de réactifs usuels d'identification bactérienne, et 5 galeries API, est extrêmement laborieuse et pas toujours bien suivie par les techniciens. De la même façon, il est difficile de noter de façon exhaustive sur les feuilles de travail à la paillasse tous les tests effectués qui ont contribué à l'identification des bactéries, y compris, quand elle est faite, la coloration de Gram sur colonies. L'élargissement du CQI à l'ensemble des réactifs du laboratoire est donc impossible sans le recours à un logiciel qui permet de tracer l'utilisation de chacun d'entre eux. Cette obligation de traçabilité est clairement formulée dans le document SH GTA 01 : « Le résultat d'une analyse est **systematiquement** relié aux différents lots de réactifs, étalons et contrôles de qualité employés pour son obtention, ainsi qu'aux différents équipements utilisés et aux personnes intervenues (traçabilité) » (3).

Les CQI effectués sur les galeries API ont confirmé un phénomène bien connu des bactériologistes : les performances de ces galeries sont inégales d'un groupe bactérien à l'autre ; certaines espèces bactériennes sont identifiées sans ambiguïté au niveau de l'espèce (ex : *E. coli* chez les entérobactéries), d'autres non (ex : *S. pneumoniae* parmi les streptocoques  $\alpha$ -hémolytiques commensaux de l'oropharynx). La technologie API est amenée à disparaître, et sera remplacée notamment par la spectrométrie de masse : elle ne sera probablement plus d'actualité en 2016 lorsque tous les LBM seront accrédités...

### **3. Bilan de cette première approche du CQI au laboratoire.**

#### **3.1 Pédagogie collective**

Il est indéniable que la mise en place de CQI au laboratoire a une vertu pédagogique auprès de l'équipe : le travail de réflexion préalable sur la gestion des réactifs, la maîtrise de risques de différents paramètres impliqués dans la qualité des réactifs et des milieux de culture, a été l'occasion d'un travail collectif au laboratoire. Notamment, le cadre logisticien a mis en place un système de surveillance du flux de réactifs dont la validité peut être critique dans le temps : réactifs soit rapidement périssables après réception, soit d'usage peu fréquent. Le but est d'éviter la perte de produits périmés avant usage, mais aussi d'éviter la rupture de stock. On a ainsi réalisé que certains réactifs avaient une date de péremption trop courte au moment de la livraison, par rapport au contrat établi par l'AGEPS avec les fournisseurs. Malheureusement, cette surveillance est très chronophage puisqu'elle nécessite la saisie dans un tableur Excel du volume de réactifs à la livraison, avec leur date de péremption, ainsi qu'un inventaire régulier (hebdomadaire) du stock principal en chambre froide, et des stocks secondaires dans les réfrigérateurs de pailleuse (exemple en annexe VIII).

Les CQI contribuent certainement à améliorer la qualité de la gestion des réactifs, mais le système artisanal mis en place au laboratoire ne peut pas être étendu à l'ensemble des activités sans le recours à des outils logistiques et informatiques modernes.

Par ailleurs, il me semble souhaitable qu'un groupe de travail, par exemple émanant de la SFM, élabore des recommandations plus approfondies pour réaliser les CQI (validation de réactifs) : lister les souches de référence incontournables, exposer les modalités, fréquence, la gestion de l'alternance souches cliniques/souches de référence. Tous les laboratoires de bactériologie ont le même problème d'anticipation pour valider un coffret au moment de l'ouverture ; des recommandations de la SFM permettraient d'homogénéiser les pratiques.

#### **3.2 Intensification du CQI en vue de l'habilitation**

En ce qui concerne l'antibiogramme, l'amélioration continue de la qualité passe par une intensification du CQI. Apparemment il est d'usage, en effet, que chaque technicien s'autocontrôle en pratiquant régulièrement, une fois par semaine, les

antibiogrammes d'un panel de souches de référence. C'est ainsi que chaque technicien peut réagir à sa propre pratique, en analysant et en corrigeant les facteurs déviants face à des diamètres en dehors des limites (7). La traçabilité individuelle des CQI nécessite que chaque technicien soit identifié par l'automate de lecture des antibiogrammes, ce qui n'est pas le cas dans notre laboratoire. L'augmentation de la fréquence de passage des souches de référence permettrait également de tester tous les lots de géloses et antibiotiques. Enfin, la traçabilité individuelle du CQI sur les antibiogrammes pourrait entrer dans la grille d'habilitation du technicien. Cela représente un volume non négligeable de travail supplémentaire, donc un coût à intégrer.

### **3.3 Antibiogrammes par diffusion : attention à la « sur-qualité »**

Néanmoins, on a vu que la pratique de l'antibiogramme par diffusion en gélose Mueller-Hinton offrait la possibilité d'une analyse très fine des phénotypes de résistance que la variation de l'inoculum contrarie peu, à quelques exceptions près. Il faut garder en tête que l'objectif final de l'antibiogramme est d'identifier les molécules actives pour traiter un patient atteint d'une infection bactérienne. Parmi les infections les plus graves, les septicémies sont traitées en probabiliste alors que l'antibiogramme n'est pas encore à disposition. Pour gagner du temps dans l'adaptation thérapeutique, tous les laboratoires effectuent des antibiogrammes à partir de bouillons d'hémocultures, donc à partir d'un inoculum non standardisé, à l'encontre des recommandations de bonne pratique. Il y a donc de grands risques que les diamètres d'inhibition soient différents de ceux que l'on observerait 24h plus tard si l'on refaisait l'antibiogramme à partir de colonies sur géloses. Cette discordance s'observe régulièrement chez des patients atteints de pyélonéphrite : la même souche est présente dans les urines et dans le sang ; l'interprétation du phénotype de résistance est la même alors que les diamètres ont parfois des différences importantes. Et pourtant, il est indéniable que l'antibiogramme effectué avec 24h d'avance sur un inoculum non maîtrisé rend un service réel au patient. L'exigence de qualité analytique ne doit pas prendre le pas sur l'urgence thérapeutique.

### **3.4 Antibiogrammes : cibler les CQI sur les antibiotiques critiques.**

La pratique régulière d'antibiogrammes de souches multi-résistantes, pour lesquelles l'offre thérapeutique est réduite, démontre que la catégorisation clinique S, I ou R des quelques molécules potentiellement actives est assez délicate parce que l'analyse phénotypique ne répond pas, à elle seule, à la question de la sensibilité et donc à celle de l'efficacité thérapeutique. Le problème se pose régulièrement, par exemple pour l'association pipéracilline+tazobactam (TZP) chez les souches d'entérobactéries du groupe 3 qui produisent leur céphalosporinase chromosomique à haut niveau. L'exigence de justesse lors de la détermination du diamètre d'inhibition de TZP est alors importante : un CQI ciblé semble approprié pour vérifier la robustesse des résultats rendus. Un autre cas de figure est la résistance isolée d'un antibiotique au sein de sa famille : c'est le cas de l'imipénème chez *P. aeruginosa*, par exemple, qui est parfois la seule  $\beta$ -lactamine inactive par perte d'une porine sélective. Là encore, il semble nécessaire de s'assurer de la robustesse du résultat rendu grâce au CQI. Une autre possibilité est de mesurer la CMI de l'antibiotique potentiellement sensible par une méthode alternative, notamment par Etest.

Ces considérations sur la criticité d'un résultat de CMI, estimée ou mesurée, d'un antibiotique doivent être nuancées par l'existence de désaccords au sujet de la catégorisation clinique entre le NCCLS et l'EUCAST, instances respectivement américaines et européennes (8).

### **3.5 Détermination des CMI par Etest**

Dans l'antibiogramme par diffusion, les CMI sont estimées par le biais des diamètres. Certains antibiotiques diffusent mal sur la gélose et leur diamètre d'inhibition est mal corrélé avec la CMI. Il est donc nécessaire de la mesurer par une autre méthode pour prédire l'activité de l'antibiotique lorsque celui-ci est utilisé en thérapeutique (ex : colistine chez *P. aeruginosa*). La méthodologie Etest est adaptée pour répondre facilement en routine, à condition qu'un CQI sur une souche de référence adaptée soit pratiqué en parallèle à chaque fois qu'une souche clinique est testée.

Malgré cela, la méthodologie Etest ne donne pas entièrement satisfaction et il faudrait envisager un changement de méthode. Des systèmes automatisés ont été évalués dans la littérature. En ce qui concerne le pneumocoque par exemple, le

système Vitek 2 (BioMerieux) a montré une concordance de 91 à 94%, selon la  $\beta$ -lactamine, avec la méthode de référence, alors que le système Dade MicroScan MicroSTREP obtient une concordance de 99% (9).

#### **4. Conclusion**

La mise en place d'une démarche qualité concernant la phase analytique de l'examen bactériologique est ressentie assez favorablement par l'ensemble du laboratoire. La difficulté principale de la mise en place de CQI sur des méthodes qualitatives consiste à bien adapter la nature et la fréquence de ces CQI en fonction de l'analyse de risques, particulièrement ceux liés à la méthode et à la main-d'oeuvre. La bactériologie est une discipline biologique en pleine évolution technologique (PCR temps réel, spectrométrie de masse, automatisation de l'ensemencement, cytométrie...) et il est probable que les exigences de qualité vont accélérer l'abandon de techniques manuelles.

Après une phase d'implantation qui a présenté un intérêt pédagogique, il me semble difficile de généraliser la pratique artisanale du CQI (fiches d'enregistrement manuscrites dans des classeurs) dans notre laboratoire tant que des systèmes informatisés de traçabilité n'auront pas été mis en place pour relier des examens à des réactifs, des techniciens, et des biologistes. Il est peut-être plus facile, et du coup urgent, d'accélérer l'implantation de nouvelles méthodologies pour être en mesure de prouver que la qualité analytique, notamment par le biais de CQI, est satisfaisante. En attendant, c'est surtout sur la maîtrise de risques que notre laboratoire doit intensifier son travail pour progresser vers la démonstration de la qualité.

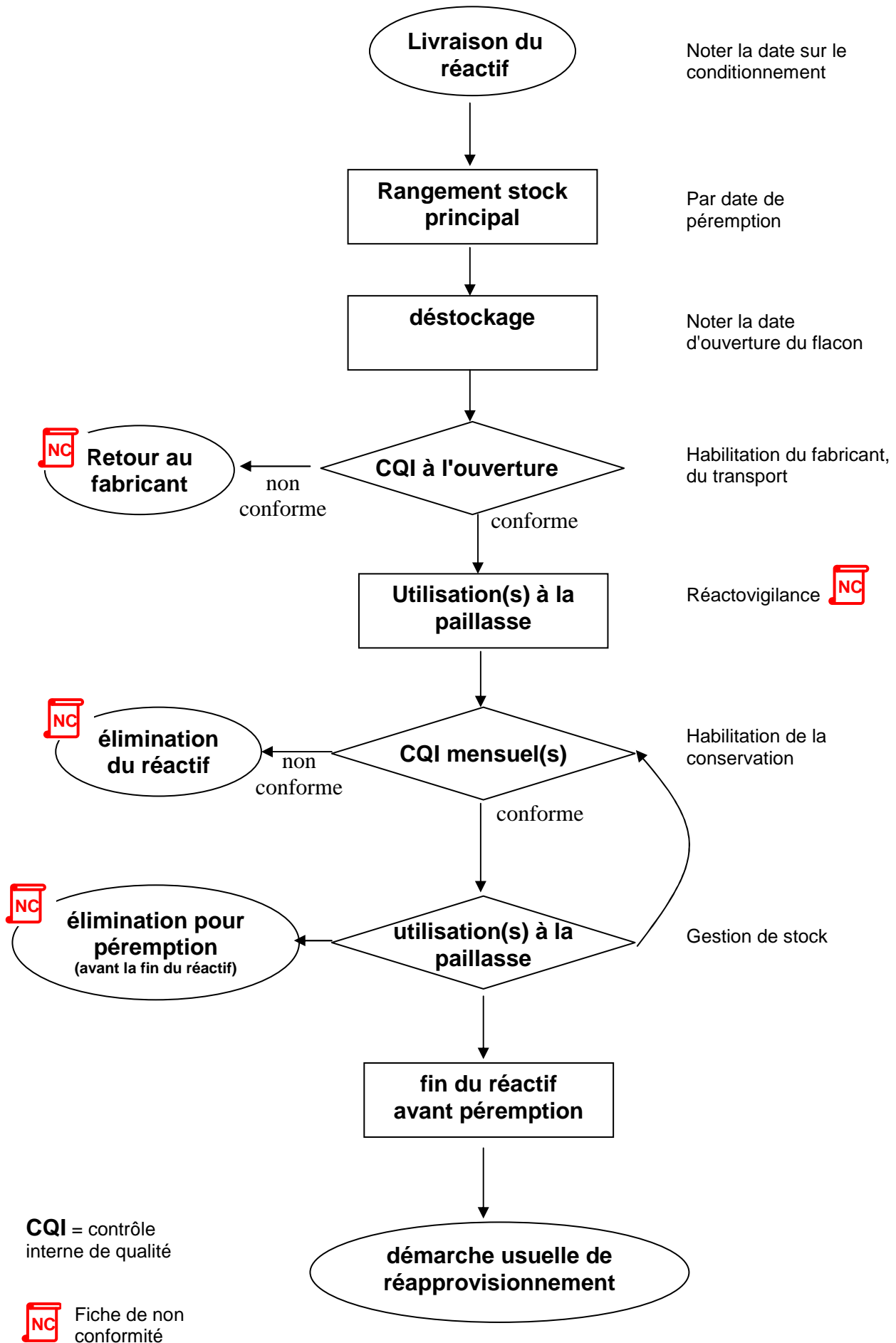
## Références bibliographiques

1. Norme NF EN ISO 15189, Août 2007.
2. LAB GTA 14, Guide d'évaluation des incertitudes de mesures des analyses de biologie médicale, Novembre 2006, COFRAC Section Laboratoires.
3. SH GTA 01, Guide technique d'accréditation en biologie médicale, mai 2011, COFRAC Section Santé humaine.
4. Société Française de Microbiologie, « Système de management de la qualité », REMIC Référentiel en microbiologie médicale, SFM, 2010, p. 37-45
5. Société Française de Microbiologie, « Contrôle de qualité interne », Comité de l'antibiogramme de la SFM, recommandations 2011, p. 8.
6. LAB GTA 06, Les contrôles de la qualité analytique en biologie médicale, juillet 2005, COFRAC Section Laboratoires
7. Nicolas-Chanoine, Marie-Hélène, « Contrôle de qualité », Antibiogramme, Editions ESKA, 2006, p. 73-77
8. Doern, Gary v., « Antimicrobial Susceptibility testing », Journal of Clinical Microbiology, Sept. 2011, Vol. 49, No. 9 Suppl., S4.
9. Bingen, Edouard, «  $\beta$ -lactamines et streptocoques (pneumocoques) », Antibiogramme, Editions ESKA, 2006, p. 125-132.

# **ANNEXES**

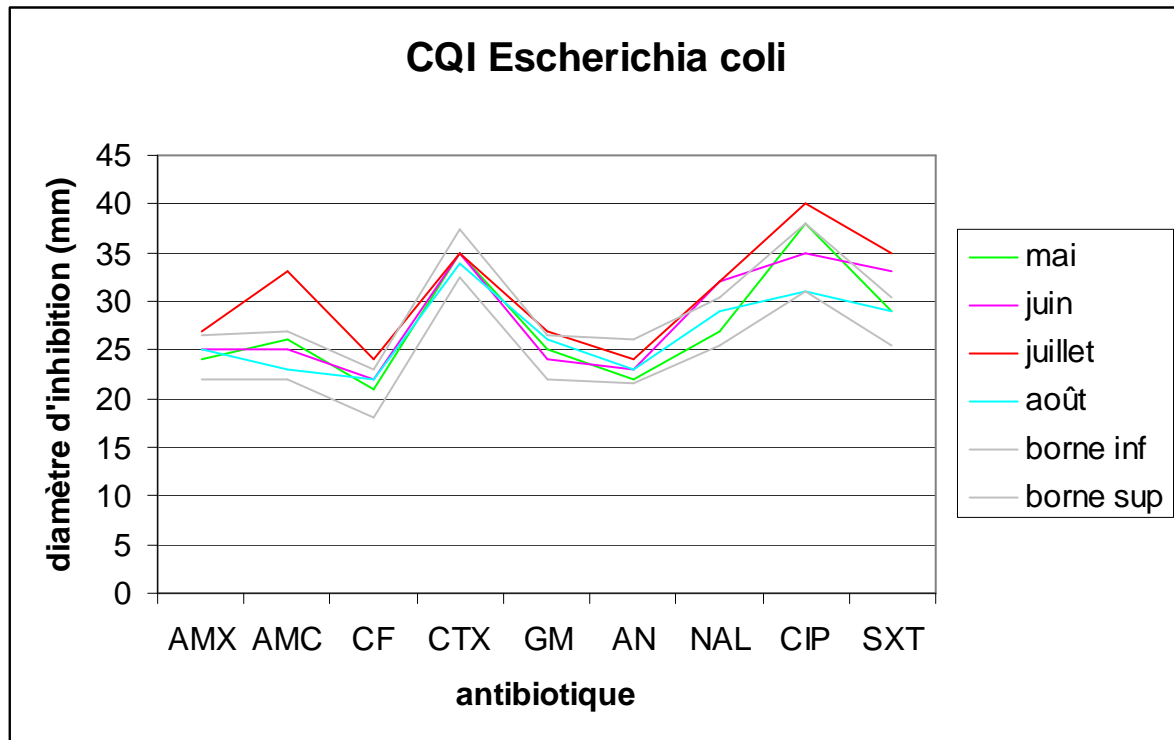


## Annexe II : Logigramme résumant le cycle de vie d'un réactif





## Annexe IV : Suivi du CQI pour la souche *E. coli* ATCC 25922



E. coli	mai	juin	juillet	août	borne inf	borne sup
AMX	24	25	27	25	22	26,5
AMC	26	25	33	23	22	27
CF	21	22	24	22	18	23
CTX	35	35	35	34	32,5	37,5
GM	25	24	27	26	22	26,5
AN	22	23	24	23	21,5	26
NAL	27	32	32	29	25,5	30,5
CIP	38	35	40	31	31	38
SXT	29	33	35	29	25,5	30,5

AMX = amoxicilline

AMC = amoxicilline + acide clavulanique

CF = céfalotine

CTX = céfotaxime

GM = gentamicine

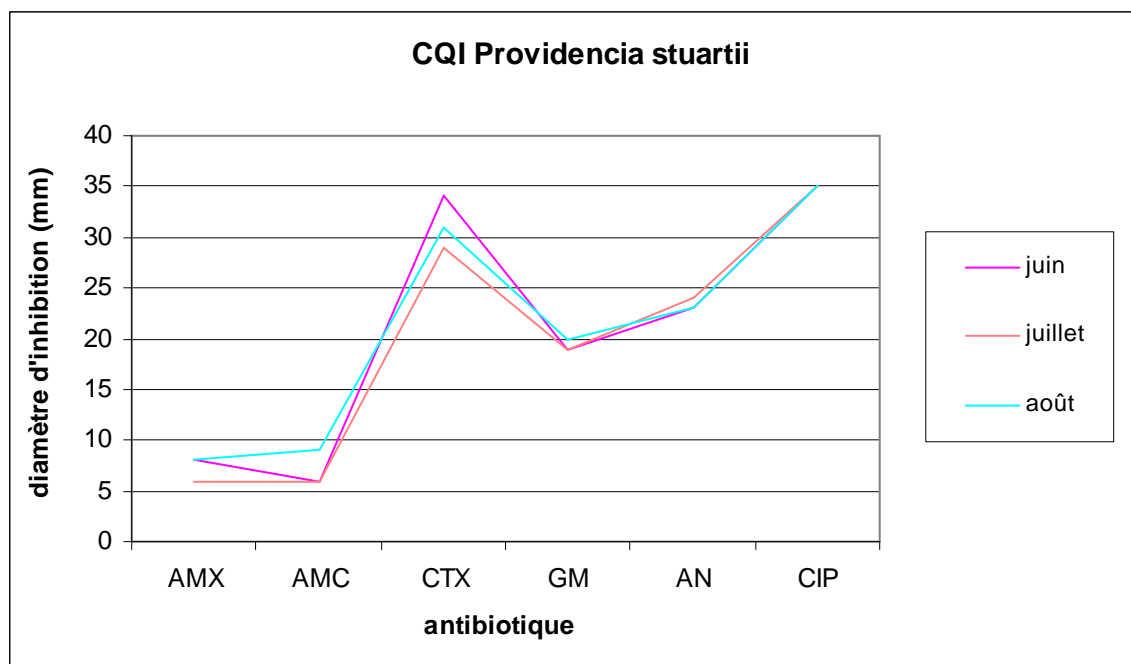
AN = amikacine

NAL = acide nalidixique

CIP = ciprofloxacine

SXT = sulfaméthoxazole + triméthoprime

## Annexe V : Suivi du CQI pour la souche *P. stuartii* ATCC 33672



<i>P. stuartii</i>	juin	juillet	août
AMX	8	6	8
AMC	6	6	9
CTX	34	29	31
GM	19	19	20
AN	23	24	23
CIP	35	35	35

AMX = amoxicilline

AMC = amoxicilline + acide clavulanique

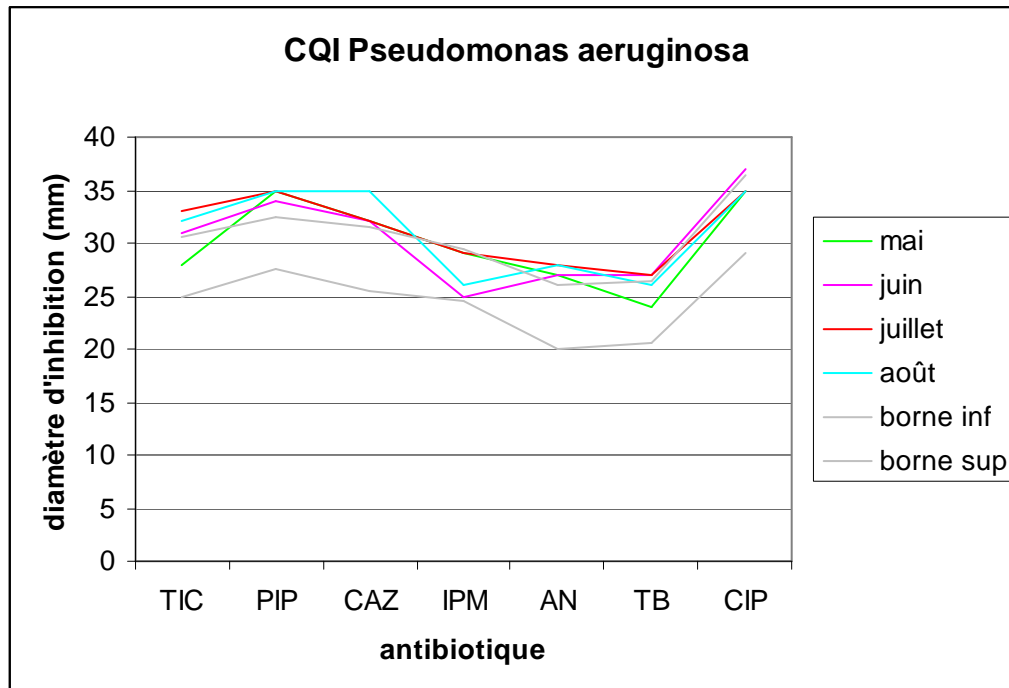
CTX = céfotaxime

GM = gentamicine

AN = amikacine

CIP = ciprofloxacine

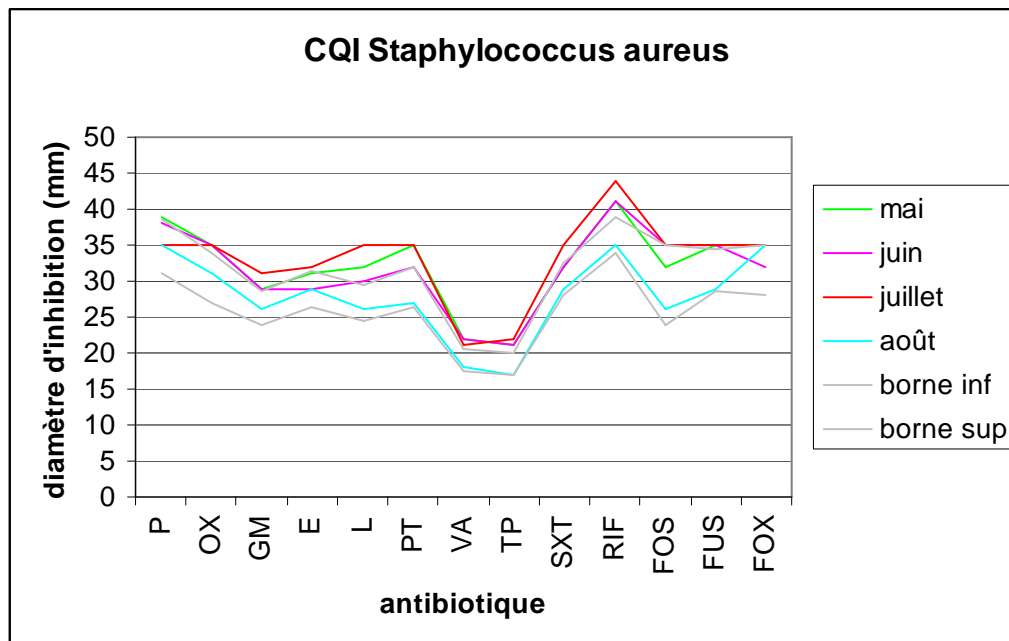
## Annexe VI : Suivi du CQI pour la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853



pyo	mai	juin	juillet	août	borne inf	borne sup
TIC	28	31	33	32	25	30,5
PIP	35	34	35	35	27,5	32,5
CAZ	32	32	32	35	25,5	31,5
IPM	29	25	29	26	24,5	29,5
AN	27	27	28	28	20	26
TB	24	27	27	26	20,5	26,5
CIP	35	37	35	35	29	36,5

TIC = ticarcilline  
 PIP = pipéracilline  
 CAZ = ceftazidime  
 IPM = imipénème  
 AN = amikacine  
 TB = tobramycine  
 CIP = ciprofloxacine

## Annexe VII : Suivi du CQI pour la souche *S. aureus* ATCC 25923



S. aureus	mai	juin	juillet	août	borne inf	borne sup
P	39	38	35	35	31	38,5
OX	35	35	35	31	27	34
GM	29	29	31	26	24	28,5
E	31	29	32	29	26,5	31,5
L	32	30	35	26	24,5	29,5
PT	35	32	35	27	26,5	32
VA	22	22	21	18	17,5	20,5
TP	21	21	22	17	17	20
SXT	32	32	35	29	28	32,5
RIF	41	41	44	35	34	39
FOS	32	35	35	26	24	35
FUS	35	35	35	29	28,5	34,5
FOX	35	32	35	35	28	35

P = penicillin G

OX = oxacilline

GM = gentamicine

E = érythromycine

L = lincomycine

PT = pristinamycine

VA = vancomycine

TP = teicoplanine

SXT = sulfaméthoxazole + triméthoprime

RIF = rifampicine

FOS = fosfomycine

FUS = acide fusidique

FOX = céfoxitine

# Annexe VIII : fichier Excel de suivi des réactifs

Fournisseur	Référence	Libellé commercial	LOT	Date Péréemption	Qté reçue	Date Reception	Jours péréemption	Jours de péréemption restant	Date du jour	Etat	Périmé à 7 jours	Qté non utilisée
AES Chemunex	AEB110391	EAU PHYSIO 0,85% STERILE TUBE 5 ML / 100	120304	21-juil-12	4	07-sept-11	314	299	22/09/2011			
AES Chemunex	AEB110370	EAU PURIFIEE STERILE TUBE 10 ML / 100	123103	18-aout-12	20	30-aout-11	348	326	22/09/2011			
AES Chemunex	AEB110370	EAU PURIFIEE STERILE TUBE 10 ML / 100	123520	22-aout-12	20	07-sept-11	345	330	22/09/2011			
AES Chemunex	AEB520360	ENTEROSEL gelose / 20	119438	12-oct-11	5	03-aout-11	69	20	22/09/2011			
AES Chemunex	AEB520360	ENTEROSEL gelose / 20	120233	20-oct-11	5	30-aout-11	50	28	22/09/2011			
AES Chemunex	AEB520360	ENTEROSEL gelose / 20	121652	03-nov-11	5	07-sept-11	56	41	22/09/2011			
ALERE	852-000	NOW LEGIONELLA ( 22 test )	049432	07-févr-13	3	01-juil-11	576	495	22/09/2011			
ALERE	852-000	NOW LEGIONELLA ( 22 test )	049608	18-févr-13	3	03-aout-11	555	506	22/09/2011			
ALERE	852-000	NOW LEGIONELLA ( 22 test )	049957	18-févr-13	3	30-aout-11	528	506	22/09/2011			
ALERE	710-012	NOW STREP Pneumoniae ( 12 tests )	049432	05-janv-13	5	01-juil-11	544	463	22/09/2011			
ALERE	710-012	NOW STREP Pneumoniae ( 12 tests )	049432	05-janv-13	3	01-juil-11	544	463	22/09/2011			
ALERE	710-012	NOW STREP Pneumoniae ( 12 tests )	049432	05-janv-13	5	03-aout-11	512	463	22/09/2011			
ALERE	710-012	NOW STREP Pneumoniae ( 12 tests )	049719	26-janv-13	5	30-aout-11	506	484	22/09/2011			
BECTON	245122	BACTEC MGIT FL 7 ML / 100	1007476	30-juin-12	4	05-juil-11	355	278	22/09/2011			
BECTON	245122	BACTEC MGIT FL 7 ML / 100	1043608	03-aout-12	4	03-aout-11	360	311	22/09/2011			
BECTON	245115	BACTEC MGIT PZA TUBE / 25	1043609	04-aout-12	1	05-juil-11	389	312	22/09/2011			
BECTON	245124	BACTEC MGIT SUPPLEMENT FL 7 ML / 1	1068399	29-juin-12	4	05-juil-11	354	277	22/09/2011			
BECTON	245124	BACTEC MGIT SUPPLEMENT FL 7 ML / 1	1088904	27-juil-12	2	03-aout-11	354	305	22/09/2011			
BECTON	231650	CEFINASE DISK / 50	1024069	31-janv-12	4	06-juil-11	205	129	22/09/2011			
BECTON	231650	CEFINASE DISK / 50	1035074	29-févr-12	1	03-aout-11	206	157	22/09/2011			
BECTON	254094	GARDNERELLA geloses / 20	1124217	21-juil-11	1	25-mai-11	56	-61	22/09/2011	périmé	alerte	
BECTON	254094	GARDNERELLA geloses / 20	1145532	10-aout-11	1	06-juil-11	34	-42	22/09/2011	périmé	alerte	
BECTON	254094	GARDNERELLA geloses / 20	1187697	20-sept-11	2	14-aout-11	36	-2	22/09/2011	périmé	alerte	40
BECTON	254094	GARDNERELLA geloses / 20	1193988	30-sept-11	1	14-aout-11	46	8	22/09/2011			
BECTON	254094	GARDNERELLA geloses / 20	1180949	15-sept-11	1	14-aout-11	31	-7	22/09/2011	périmé	alerte	
BECTON	254094	GARDNERELLA geloses / 20	1200063	06-oct-11	1	31-aout-11	36	14	22/09/2011			
BECTON	254094	GARDNERELLA geloses / 20	1172982	09-sept-11	1	03-aout-11	36	-13	22/09/2011	périmé	alerte	