

Université Pierre et Marie Curie
Sorbonne Universités

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

MISE EN PLACE DE L'ANTIBIOGRAMME AUTOMATISÉ
MICROSCAN WALK-AWAY® : VÉRIFICATION INITIALE DES PERFORMANCES
DU PANEL NEG MIC 39

Bleunven Sophie-Charlotte
Année 2015

NOTE AU LECTEUR

Les mémoires des stagiaires du Diplôme Universitaire « Assurance Qualité au 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.

AUTEUR

Dr BLEUNVEN Sophie-Charlotte
Biologiste Médicale Spécialisé en Microbiologie
Praticien attaché
Laboratoire de Biologie Médicale Hôpital Henri Mondor
51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil



REMERCIEMENTS

Je remercie Dr. Vincent FIHMAN et Pr. Jean-Winoc DECOUSSER d'avoir accompagné mon travail.

Je remercie Sylvie et Chantal les techniciennes référentes de cet automate. Elles ont réalisé notamment la partie technique. Merci pour le temps qu'elles m'ont accordé et pour leur patience.

Je remercie l'ensemble des intervenants de ce Diplôme Universitaire pour la qualité de leur enseignement.

Je remercie les membres du Jury qui me font l'honneur de juger ce travail.

Enfin, je remercie mes parents, ma soeur Gladys, Dr Thomas Mignot, le reste de ma famille et mes amis pour leur soutien dans ces choix parfois difficiles du post-internat.

SOMMAIRE

I. Présentation du travail	6
1. Objectifs	6
2. PDCA	6
II. Contexte générale et présentation du laboratoire	7
1. Contexte général	7
2. Présentation du laboratoire : organisation, activité, qualité.....	8
III. Présentation du test de sensibilité aux antibiotiques Microscan	9
1. Généralités	9
2. Principe	10
3. La méthode Microscan au laboratoire	10
IV. Planifier (PLAN)	11
1. QQQQCP : définitions des actions à mener	11
2. Plan d'action.....	12
V. Résultats (DO) : vérification initiale des performances	13
1. Méthodologie.....	13
2. Résultats : Description de la méthode	16
3. Résultat : Révision bibliographique	16
4. Résultat : Analyse des points critiques et maîtrise des risques	17
5. Résultat : Vérifications initiales expérimentales <i>in situ</i>	23
VI. Discussion (CHECK)	25
1. Vérification initiale des performances : conclusion aptitude de la technique	25
2. Documentation et formation initiale du personnel	26
VII. Nouvelle planification (ACT)	27
1. Vérification continue des performances : les objectifs	27
2. Bilan : fait et à faire	27

GLOSSAIRE

Définitions (1)

Accord de catégorie : accord des résultats interprété S, I ou R

Ecart très majeur : résultat d'essai par la méthode de référence interprété R et résultat du dispositif interprété S

Ecart majeur : résultat d'essai par la méthode de référence interprété S et résultat du dispositif interprété R

Ecart mineur : résultat d'essai par la méthode de référence interprété R ou S et résultat du dispositif interprété I ou résultat d'essai par la méthode de référence interprété I et résultat du dispositif interprété S ou R

Abréviations

AST : Test de Sensibilité aux Antibiotiques

BMR : Bactérie Multi Résistante

BHRe : Bactérie Hautement Résistante émergente

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

DM-DIV : Dispositif Médical de Diagnostique In Vitro

EEQ : Evaluation Externe de la Qualité

LBM : Laboratoire de Biologie Médicale

S, I et R : Sensible, Intermédiaire et Résistant

I. Présentation du travail

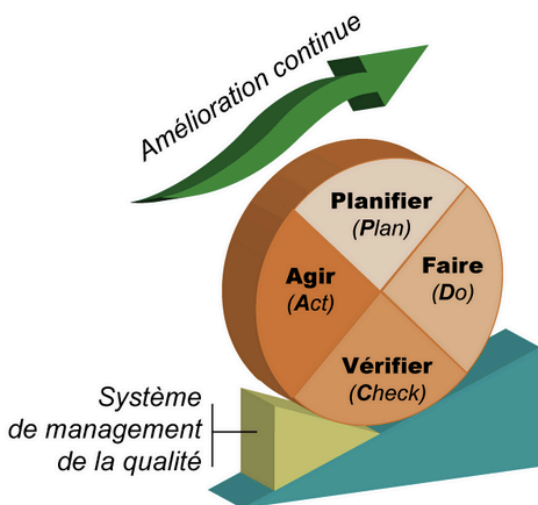
1. Objectifs

L'objectif principal de ce travail est de permettre l'utilisation en routine du test automatisé de sensibilité aux antibiotiques (AST) Microscan nouvellement implanté dans notre laboratoire et ce dans le respect des exigences du management de la qualité (norme ISO 15189).

Ce mémoire se concentre notamment sur la vérification initiale du panel NEG MIC 39 utilisé dans notre laboratoire pour la détermination de la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries.

Ce travail initial permettra d'apporter certains éléments de la rédaction du dossier de vérification des performances (SH FORM 43), les données de vérification continue viendront le compléter. Pour le laboratoire, les autres objectifs sont l'évaluation approfondie des performances de cette technique d'antibiogramme encore peu utilisée dans les LBM français. A titre personnel, les objectifs sont l'acquisition d'une expérience en terme d'accréditation et d'automatisation dans le domaine de la bactériologie.

2. PDCA



Ce mémoire est construit selon le modèle d'amélioration continue PDCA (Plan, Do, Check, Act) : il expose dans un premier temps la planification des actions à mener, puis la méthodologie et les résultats de la vérification initiale des performances pour le panel NEG MIC 39. Enfin, l'état des lieux en ce mois de septembre ainsi que la planification des actions à mener pour les prochains mois seront présentés.

II. Contexte générale et présentation du laboratoire

1. Contexte général

a. Contexte règlementaire

La réforme de la biologie médicale de l'ordonnance du 13 janvier 2010 a rendu obligatoire l'accréditation des Laboratoires de Biologie Médicale (LBM) (2). L'accréditation permet une reconnaissance de la compétence du LBM et son objectif est de garantir la conformité des examens de biologie médicale ainsi que la qualité de la prestation médicale offerte aux différents usagers. Cet objectif de qualité est établi dans le seul intérêt du patient.

L'accréditation des LBM est établie par la norme internationale NF EN ISO 15189 qui en précise les exigences particulières (3). Le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) est le seul organisme en France habilité à délivrer l'accréditation d'un LBM. A compter du 1er novembre 2016, les laboratoires de biologie médicale ne pourront fonctionner sans disposer d'une accréditation portant sur 50 % des examens de biologie médicale qu'ils réalisent. Pour cela les LBM devaient déposer leur dossier de demande avant le 30 mai 2015 (4). Tous les LBM, publics et privés devront être accrédités sur la totalité de leur activité au plus tard le 31 octobre 2020.

b. L'automatisation, l'accréditation en bactériologie

Dans ce contexte réglementaire, on observe une accélération de la mise en place de plateaux techniques de bactériologie, un des derniers secteurs de la biologie où l'automatisation était minime. Ceci répond à des objectifs de qualité (standardisation, traçabilité, amélioration des délais de rendu, diminution du risque d'erreur notamment) et de productivité (réduction des tâches répétitives à faibles valeurs ajoutées afin de consolider des étapes plus importantes). Ainsi, des outils aujourd'hui essentiels tels que les automates d'ensemencement, d'identification rapide ou de réalisation d'antibiogramme sont proposés aux microbiologistes.

L'accréditation de la bactériologie, en raison de sa spécificité est difficile à mettre en œuvre : elle s'intéresse à des organismes vivants qui subissent des modifications génotypiques et phénotypique, de plus le résultat d'une analyse bactériologique est souvent la conclusion de l'expertise de plusieurs étapes analytiques automatisées

ou non, qualitative ou quantitative. La vérification des performances dans cette famille repose en grande partie sur l'analyse bibliographique et la maîtrise des risques mais aussi sur des vérifications expérimentales *in situ*. Pour chaque analyse il existe une méthodologie propre de vérification des performances. Ces méthodologies ne sont pas encore toutes précisées et en ce qui concerne les AST elle n'est pas clairement décrite par la Société Française de Microbiologie (SFM) ni par le Comité Européen de l'Antibiogramme (EUCAST).

2. Présentation du laboratoire : organisation, activité, qualité

a. Le GH Henri Mondor

Le laboratoire de biologie médicale du CHU Henri Mondor constitue le seul laboratoire du groupe hospitalier Henri Mondor. Ce groupement hospitalier de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (APHP) regroupe cinq établissements du sud est de Paris. Le centre hospitalo-universitaire Henri Mondor et l'hôpital de soins de suite et de réadaptation (SSR) Albert Chenevier situés à Créteil offrent environ 1000 lits de court séjour et SSR. Ils sont en partie spécialisés dans la prise en charge médico-chirurgicale des greffes et transplantations. Les trois autres établissements se situent dans le Val de Marne et l'Essone : l'hôpital Emile Roux, l'hôpital Joffre Dupuytren et l'hôpital Georges Clemenceau. Ils offrent une importante filière gériatrique composée d'environ 2000 lits.

b. L'activité du laboratoire

Le laboratoire du pôle biologie-pathologie réalise une activité de près de 126 millions de B et BHN soit plus de 4 millions d'actes par an. Il s'organise en différents services : biochimie-génétique ; pharmacologie-toxicologie ; anatomo-cytologie ; histo-embryologie ; bactériologie-hygiène-virologie-parasitologie-mycologie ; hématologie médicale ; immunologie biologique et centres de tri inter-sites.

L'unité de bactériologie-hygiène dirigée par le Dr JW. Decousser se trouve dans le service de microbiologie dont le chef de service est le Pr JM. Pawlotsky. L'unité comprend 5,5 biologistes en équivalent temps plein, 3 internes du DES de biologie médicale et environ quinze techniciens de laboratoire.

c. Le management de la qualité au laboratoire

Au 1^{er} septembre 2015 le laboratoire de Biologie Médicale du groupe Hospitalier Henri Mondor est accrédité pour les activités d'examens/analyses de biologie médical en biochimie, hématologie, hématologie, immunologie et microbiologie (sérologie infectieuse). Pour répondre aux objectifs du 30 mai 2015, la stratégie mise en place par le pôle est que chaque secteur spécialisé, en fonction de la famille auquel appartiennent les analyses, dépose une demande d'accréditation pour 50 % de leur activité. L'unité de bactériologie-hygiène a pour cela constitué son dossier sur l'antigénurie Légionnelle et la cytologie urinaire. L'installation de la démarche au sein de l'unité de bactériologie est maintenant entamée. Les analyses candidates au prochain dépôt de dossier pour notre unité sont : l'identification bactérienne par spectrométrie de masse Andromas®, l'antibiogramme par test automatisé Microscan® et l'ensemencement par technique automatisée Wasp®.

III. Présentation du test de sensibilité aux antibiotiques Microscan

1. Généralités

L'AST Microscan est un DM-DIV (marquage CE) commercialisée par la société Beckman Coulter. Les performances analytiques ont été évaluées et corrélées à la méthode de référence selon la norme en vigueur NF EN ISO 20776-2 (1). La méthode est basée sur l'analyse des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en milieu liquide. Elle représente une alternative à la technique de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé (ou méthode des disques). Trois AST aux caractéristiques différentes dominent actuellement le marché : Microscan Walk-Away (Beckman Coulter), Vitek (bioMérieux) et Phoenix (Becton Dickinson). L'automate Microscan est actuellement utilisé dans une trentaine de laboratoires de microbiologie médicale Français. Cette technique est partiellement automatisée : les étapes de préparation de l'inoculum bactérien et d'inoculation des plaques sont manuelles alors que les étapes d'incubation, lecture par turbidimétrie et expertise sont automatisées. Un tableau résumant les avantages et inconvénients de ce test est présenté en Annexe 1.

2. Principe

Ce test de sensibilité aux antibiotiques est une micro-méthode de la technique de référence de l'antibiogramme en milieu liquide. Les antibiotiques testés à différentes concentrations sont présents à l'état déshydraté dans les puits des plaques à usage unique. Après inoculation et réhydratation de la plaque avec une suspension standardisée de bactéries et après incubation à 35°C pendant une durée de 18h, la CMI est déterminée par la plus basse concentration d'antibiotique montrant une inhibition de croissance (figure 1). Les résultats des CMI de chaque antibiotique testé sont interprétés selon les recommandations actuelles du CA-SFM et rendus S,I ou R.

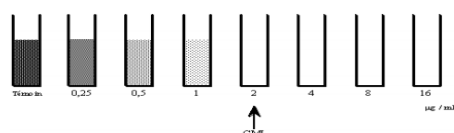


Figure 1 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) illustration

3. La méthode Microscan au laboratoire

a. Domaine d'application

Le laboratoire réalise, en moyenne, chaque jour 58 antibiogrammes dont 25 dans le secteur des ECBU (données 2014). Jusqu'au mois de mai 2015, la détermination de la sensibilité aux antibiotiques reposait en routine, sur la technique de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé (automate SirScan, I2A). Le laboratoire s'est équipé en février 2015 de l'AST Microscan. Son utilisation en routine est effective depuis la fin de la période vérification *in situ* dont les résultats sont présentés dans ce mémoire. Cette nouvelle technique est dans un premier temps, uniquement destinée aux entérobactéries, staphylocoques et entérocoques du secteur des ECBU.

b. Mode opératoire

En Annexe 2 un extrait du mode opératoire illustre les différentes étapes permettant l'obtention d'un antibiogramme à partir d'une culture bactérienne. Le matériel et les réactifs utilisés pour cette méthode sont présentés en Annexe 3.

IV. Planifier (PLAN)

1. QQQQCP : définitions des actions à mener

Afin de définir les actions à mener en priorité pour permettre l'utilisation en routine du Microscan, la méthode de questionnement systématique (QQQQCP) a été adoptée. Les résultats sont présentés ci dessous :

Quoi	Nouvelle technique - nouvel automate Deux panels : NEG MIC 39 et POS MIC 33 Exigences norme ISO 15189 Conforme pour une utilisation en routine ?
Qui	Deux biologistes référents (définition des actions à mener, révision bibliographique, définition des protocoles d'expérimentation, analyse des résultats, participation à la rédaction de la documentation, formation du personnel médical) Deux techniciens référents (réalisation des expérimentations, rédaction de la documentation, formation du personnel technique)
Où	Unité de bactériologie, secteur ECBU dans un premier temps
Quand	Février 2015 : réception, qualification et formation par le fournisseur Février à septembre 2015 : vérification initiale indépendante, formation, documentation Objectif mai 2015 : utilisation du panel NEG MIC 39 pour la réalisation des antibiogrammes des entérobactéries en routine Objectif septembre 2015 : utilisation du panel POS MIC 33 pour les staphylocoques et entérocoques
Comment	3 axes à développer en priorité : Vérification initiale des performances (bibliographie, analyse de risque et vérification expérimentale initiale)

Documentation (base documentaire technique)

Formation initiale du personnel

Pourquoi Respect des exigences normatives (norme ISO 15189) (3)

Vérification initiale des performances : ce point est abordé dans la version actuelle de la norme aux chapitres 5.3 et 5.5 qui concernent le matériel et le processus analytique. « Le laboratoire doit vérifier, lors de l'installation et avant utilisation, que le matériel est capable d'atteindre les performances nécessaires et qu'il est conforme aux exigences relatives aux examens concernés ».

Documentation : ce point est abordé dans la version actuelle de la norme aux chapitres 4.3, 5.5 et 5.5.3. « les procédures analytiques doivent être documentées. Elles doivent être écrites dans une langue généralement comprise par le personnel du laboratoire et être disponibles dans les lieux appropriés ».

Formation du personnel : ce point est abordé dans la version actuelle de la norme aux chapitres 4.14 et 5.1. « Le laboratoire doit assurer la formation pour l'ensemble du personnel, qui inclut les domaines suivants : b) les processus de travail et procédures attribuées ».

2. Plan d'action

Dés le mois de février, mois de réception, qualification de l'automate et formation des référents par le fournisseur, nous avons défini un plan d'action.

Un planning détaillant les trois axes prioritaires à développer, les acteurs impliqués et les échéances est présenté ci-dessous (Figure 2).

Quoi :	Comment :	Qui :	Quand :
Vérification initiale des performances	Révision bibliographique Analyse et maîtrise des risques Définition des critères et protocoles Vérification expérimentale <i>in situ</i> Synthèse et analyse des résultats Conclusion	Biologistes et techniciens référents	Mai et septembre 2015 (selon panel)
Rédaction d'une base documentaire technique	Mode opératoire de réalisation Mode opératoire de maintenance Formulaire de maintenance Mode opératoire gestion des pannes Mode opératoire CQI/CQE	Biologistes et techniciens référents	Mai 2015
Formation initiale	Formation des référents Formation interne par les référents	Fournisseur Biologiste Technicien	Mai 2015

Figure 2 : Planning mise en place de l'antibiogramme Microscan

V. Résultats (DO) : vérification initiale des performances

1. Méthodologie

a. Documentation utilisée

La méthodologie à suivre pour effectuer une vérification est décrite dans le SH GTA 04 le guide technique de vérification / validation des méthodes en biologie médicale et dans le SH FORM 43 la fiche type de vérification / validation d'une méthode (5) (6). La procédure interne au laboratoire reprend les éléments de ces documents. Le Quamic, édité par la Société Française de Microbiologie, constitue une aide précieuse pour accompagner le biologiste dans sa démarche d'accréditation (7). Ce référentiel fixe le niveau d'exigences et de compétences requis en bactériologie. Un chapitre « Etude qualitative de la sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme automatisé en milieu liquide » détaille les différents points à évaluer pour notre méthode. Le Cumitech 31A édité par la Société Américaine de Microbiologie (ASM) et la norme NF EN ISO 20776-2 ont aussi été consultés (8) (1).

b. Les différentes étapes mise en œuvre

Etape 1 : Description de la méthode

Définition de la ligne de portée d'accréditation selon le SH INF 50 et description telle qu'elle est exigée dans le SH FORM 43.

Etape 2 : Révision bibliographique

Cette technique est une méthode qualitative, la vérification bibliographique comme indiquée dans les différents référentiels prend toute son importance.

Elle est réalisée à l'aide de documents pertinents : recommandations du CA-SFM, documentation fournisseur et bibliographie Pubmed.

Etape 3 : Analyse des points critiques et maîtrise des risques

Dans le cadre d'une vérification de méthode qualitative, la vérification expérimentale sur site est réduite et doit s'appuyer fortement sur des études de risque. Après cartographie du processus de la réalisation d'un antibiogramme, les facteurs de risque sont identifier et classer selon la méthode des 5M ou diagramme d'Ishikawa. Ils sont synthétisés dans un tableau, enfin les moyens de maîtrise à appliquer sont présentés.

Etape 4 : Vérifications expérimentales in situ

Détermination des critères de performance pertinents à évaluer

Les critères à évaluer dans le cadre du dossier de vérification des performances d'une méthode qualitative sont détaillés dans le guide technique SH GTA 04 (Annexe 4), le Quamic apporte des précisions spécifiques pour la méthode de détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Le tableau en Annexe 5 présente les critères énoncés dans le guide technique SH GTA 04 et les critères de performance que nous avons jugés pertinents pour la méthode Microscan.

Dans le cadre de la vérification initiale, pour son utilisation dans notre laboratoire, il est pertinent d'effectuer les essais suivants :

- 1) Essais de comparaison de méthode
- 2) Essais de robustesse afin de valider le travail hors recommandation fabricant sur colonies âgées de plus de 24h

3) Essais de robustesse afin de valider la relecture visuelle hors recommandation fabricant des plaques à 24h ou 48h

4) Essais de fidélité intermédiaire et exactitude (reproductibilité intra-laboratoire et étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie d'un mesurande respectivement)

Mise au point de protocoles d'expérimentation et définition des objectifs

Le Quamic recommande de suivre les préconisations fournisseur sinon d'argumenter les choix effectués. Le Comité de Microbiologie Américain dans son Cumitech 31A propose des protocoles dans le cadre des vérifications de ces automates. Les protocoles du fournisseur semblent en partie basés sur ces recommandations.

Ainsi nos protocoles et leurs objectifs ont été déterminés selon les préconisations du fournisseur, de la Société Française de Microbiologie, de la Société Américaine de microbiologie, selon la norme NF EN ISO 20776-2 et adaptés aux contraintes propres de notre laboratoire (7) (8) (1).

Réalisation des vérifications expérimentales

La mise en application des protocoles d'expérimentation est faite par les techniciens référents. Les souches choisies sont représentatives des espèces retrouvées dans les prélèvements notamment urinaires. Les échantillons à disposition sont des souches cliniques, des CIQ ou des EEQ. Les profils de résistance sélectionnés sont variés et comptent des profils complexes (dont BMR et BHRe).

Synthèse, analyse et conclusion

La synthèse, l'analyse et les conclusions sont réalisées par les deux biologistes référents dont je fais partie. Pour la plus part des essais, l'analyse fait appel à l'étude des concordances et l'étude des discordances. Les définitions de l'accord de catégorie, des écarts mineurs et majeurs ont été rappelées au début de ce mémoire.

Etape 5 : Conclusion sur l'aptitude de la technique

2. Résultats : Description de la méthode

Cette examen appartient au sous domaine microbiologie, famille bactériologie (BACTH), son code tel que défini dans le SH INF 50 est BA6.

Cette méthode est une méthode qualitative. En effet le résultat rendu est une interprétation en catégorie sensible, intermédiaire ou résistant (S, I ou R). La variable mesurée est une concentration minimale inhibitrice (CMI) rendue sous la forme de $<$ ou $= X$; X ; $> X$ (mg/L). Cette variable est à éléments quantifiables discrétisés, de type logarithmique (base de 2) avec un domaine de mesure entourant les seuils de catégorisation édictés par la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). La lecture interprétative intègre aussi un contrôle de cohérence des profils de résistance. La description de la méthode est présentée en Annexe 6 sur le modèle du SH FORM 43 (6).

3. Résultat : Révision bibliographique

Cette révision bibliographique est formalisée dans le document « Révision bibliographique : antibiogramme technique Microscan - panel NEG MIC 39 entérobactéries », elle est présentée en Annexe 8. Les points abordés sont les suivants : la méthode de vérification adoptée par le fabricant pour l'obtention du marquage CE, la vérification de la conformité des molécules testées et des CMI testées au regard des recommandations du CA-SFM utilisées au laboratoire, l'analyse bibliographique (documentation fournisseur et littérature PubMed) des performances concernant la sensibilité et la spécificité ciblée sur certains tests. Pour ce dernier point, la révision s'intéresse à la détection des mécanismes de résistance des bactéries multi résistantes (BMR) et des bactéries hautement résistantes émergentes (BHRe). En effet ces nouveaux mécanismes de résistances posent des problèmes de détection, dans les LBM. Le CHU Henri Mondor accueille des patients soumis une pression de sélection importante de ces BMR et BHRe. Les moyens mis en œuvre au sein de notre laboratoire doivent être capables de détecter ces phénotypes et de fournir des CMI fiables pour un succès thérapeutique et une bonne surveillance épidémiologique.

4. Résultat : Analyse des points critiques et maîtrise des risques

a. Identification des facteurs de risque

Les facteurs de risque sont identifiés et classés selon la méthode des 5M ou diagramme d'Ishikawa en Annexe 8. Ces facteurs sont ceux qui participent à l'obtention d'un résultat faux de sensibilité à un antibiotique et potentiellement responsables de l'administration, chez le patient, d'un antibiotique inapproprié.

b. Points critiques et moyens de maîtrise

Pour les points critiques identifiés les éléments à maîtriser sont spécifiés et les moyens de maîtrise à mettre en œuvre sont présentés dans les tableaux suivants classés par élément d'association 5 M :

Élément d'association 5 M : milieu

Points critiques	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
Exigences environnementales pour le matériel et pour les opérateurs	Respect de la températures des pièces automate et technique Luminosité Alimentation électrique	Climatiseur Surveillance des installations et des conditions ambiantes (SIRIUS) Poste technique lumineux, lumière du jour disponible pour la lecture manuelle des plaques Automate sur onduleur Documentation associée : Procédure surveillance des installations et des conditions ambiantes
Contamination de l'environnement	Air Bionettoyage Gestion des déchets	Travail sous PSM pour les étapes de préparation de l'inoculum et réhydratation des plaques Documentation associée : Instruction Nettoyage des surfaces Procédure Hygiène, Sécurité et Entretien de l'environnement de travail Procédure Gestion des déchets

Élément d'association 5 M : matériel (Automate Microscan)

Points critiques	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
Automate Microscan : Installation	Connexion Paramétrage	Qualification initiale de l'installation par le fournisseur Vérifications expérimentales initiales <i>in situ</i> des performances Documentation associée : Livret de vérification fournisseur Dossier de vérification
Automate Microscan : Maintenances	Préconisations du fournisseur (périodicité et technique)	Respect des recommandations fournisseur : maintenance journalière, hebdomadaire, mensuelle Matériel dédié Traçabilité des maintenances Contrat de maintenance Documentation associée : Mode opératoire (MOP) : Maintenances Microscan ; Enregistrement : Maintenance Microscan
Automate Microscan : Pannes	Gestion des pannes automate Microscan Traçabilité	Lecture manuelle des plaques, en double possible et technique « back up » : antibiogramme par diffusion en milieu solide Contrat SAV avec le fournisseur Documentation associée : Contrat d'intervention fournisseur SAV Classeur de vie automate MOP : gestion des pannes Microscan

Élément d'association 5 M : matériel (Informatique)

Points critiques	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
Informatique : Logiciel d'expertise Sirscan	Réglage et mise à jour du logiciel d'expertise SirScan Validation des mises à jour logiciel Sirscan	Vérification initiale des règles d'expertise Traçabilité des mises à jour Modification : accès limité et sécurisé EEQ Actualisation des règles d'expertises selon les recommandations CA-SFM Veille technologique Documentation associée Dossier de vérification Contrat de mise à jour Cahier de vie MOP EEQ et CIQ antibiogramme
Informatique :	Pannes	Gestion des pannes informatiques

Connexions informatiques	informatiques Intégrité des résultats transmis	Saisie manuelle + /- expertise, en double Vérification initiale des transmissions informatiques puis périodique Documentation associée : MOP : panne Microscan Qualifications informatiques dont SIL et serveur MEDIWEB
--------------------------	---	--

Élément d'association 5 M : matériel (Autres matériels et réactifs)

Points critiques	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
Plaques, système Renok, et système Prompt	Conformité des réactifs Transport Acceptation à la réception des réactifs Conservation, stockage Contrôle de conformité avant utilisation Réactovigilance Gestion des stocks	Marquage CE EEQ et CIQ Application conforme à la notice Validation à réception Confrontation Bon de Livraison / Bon de commande Conservation des plaques, des systèmes Renok et Prompt à température ambiante, zone propre dédiée, à l'abri de la lumière Suivi des températures (SIRIUS) Contrôle de date de péremption, d'intégrité des systèmes avant utilisation Diffusion des alertes de réactovigilance, Techniques « back up » en cas de rupture de stock Documentation associée : Classeur automate Fiche de stress du transporteur Notice Procédure gestion des commandes de réactifs et gestion des stocks Procédure sélection et gestion des réactifs et consommables Procédure surveillance des installations et des conditions ambiantes, logiciel SIRIUS Procédure analyse et bilan des consignes d'exigences thermiques des conditions ambiantes par pièce/enceinte
Densitomètre DensiChek	Maintenance, Contrôle	Maintenance conforme aux recommandations fournisseur, EEQ, CIQ Documentation associée : MOP Maintenance

Élément d'association 5 M : matière (souches cliniques, de CIQ et EEQ)

Points critiques	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
Identification	Erreur d'identification de plaque, de souche ou d'isolement parallèle	Poste technique dédié Étiquettes adaptés aux plaques (maintenance de l'imprimante/ gestion panne) et nombre d'étiquettes suffisant Conservation des échantillons primaires et des souches pour contrôle éventuel Validation biologique au regard du dossier bactériologique complet Documents associés : Procédure de Gestion des Ressources Humaines du Personnel Médical et non Médical Fiche d'habilitation poste ECBU MOP : Réalisation de l'antibiogramme Microscan
Age des cultures > 24h	Travail hors recommandations fournisseur	Pour les lundi, lendemain de jours fériés ou autres situations : vérification essais de robustesse Documents associés : Dossier de vérification initiale Microscan
Milieu de culture gélosé	Choix de la colonie sur un milieu non recommandé (milieux inhibiteurs)	Formation initiale et continue au poste ECBU Spécification dans la documentation technique Documents associés : MOP : Réalisation de l'antibiogramme Microscan Fiche d'habilitation poste ECBU
Conservation des souches (cliniques et CIQ / EEQ)	Maîtrise de la conservation des souches	Formation et information du personnel Documentation Documents associés : MOP : Conservations des souches cliniques MOP : EEQ et CIQ antibiogramme Microscan Fiche d'habilitation poste ECBU
Réception et reconstitution des EEQ	Gestion des EEQ	Formation et information du personnel Documentation Documents associés : MOP : EEQ et CIQ antibiogramme Microscan Fiche d'habilitation poste ECBU

Élément d'association 5 M : méthode

Points critiques	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
Vérification des performances	Vérification initiale des performances avant utilisation en routine Vérification continue des performances	Qualification par le fournisseur Vérification indépendante bibliographique et expérimentale in situ avant utilisation EEQ (AGLAE, CTCB, ANSM) CIQ conformes aux recommandations CASFM, espèces représentatives Confrontation régulière : des deux techniques d'antibiogramme, aux résultats des CNR, aux résultats de biologie moléculaire Documentation associée : Analyse bibliographique Dossier de vérification Microscan Quamic et Rémic Recommandations CA-SFM et EUCAST Procédure générales : vérification/validation d'une méthode ; gestion des CIQ ; évaluation externe de la qualité Mode opératoire : EEQ et CIQ antibiogramme
Système documentaire	Elaboration d'une documentation adaptée à l'usage du laboratoire Accessibilité Connu des utilisateurs Mise à jour	Rédaction, vérification et approbation des documents (techniciens et biologistes) Intégration dans Kalilab Suivi des attestations Kalilab Révision paramétrée tous les 6 mois Contrôle des notices à l'ouverture des kits Documentation associée : Procédure générale gestion documentaire Classeurs à la paillasse : bleu, blanc et rouge
Plaque	Utilisation conforme Choix de plaque Contamination des plaques	Respect de la mise à température ambiante, contrôle date de péremption et intégrité avant utilisation Antibiogramme solide si bactérie non valide pour cette technique Identification bactérienne préalable : spectrométrie, Gram ou autres tests, lecture en double des cultures (biologiste + technicien) Validation par l'automate du choix de plaque au regard de l'identification Conservation unitaire, ouverture au moment de l'utilisation Validation en triple par système expert, technicien et biologiste

		Documentation associée : MOP réalisation antibiogramme Microscan Notice
Inoculum	Maîtrise de l'inoculum : pureté, richesse	Qualification du système Prompt Délai et température de conservation de l'inoculum avant utilisation respecté Travail sur colonie isolée Utilisation de matériel à usage unique, Utilisation du Prompt conforme Isolement parallèle systématique avec quantification afin de confirmer la validité de la plaque Documentation associée : MOP réalisation antibiogramme Microscan
Incubation	Maîtrise de l'incubation	Délais entre préparation et chargement des plaques respecté Température et hygrométrie suivies par le logiciel de l'automate, système d'alarme si non conforme Temps d'incubation : gestion automatique Documentation associée : MOP réalisation antibiogramme Microscan Guide d'utilisation logiciel Labpro
Vérification technique et validation biologique	Validation des résultats rendus par le système expert	Etape de vérification technique Etape de validation biologique Système expert approuvé par l'ensemble des biologistes Contrôle visuelle des plaques possible Contrôle par antibiogramme solide ou autres techniques (E test ou biologie moléculaire) formalisé pour les situations les plus fréquentes dans le mode opératoire Validation au regard du dossier bactériologique complet en ayant à disposition plaque, isolement parallèle et isolement de départ. Documentation associée : MOP réalisation antibiogramme Microscan

Elément d'association 5 M : main d'œuvre

Points critiques	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
Compétence et maintien de compétence du personnel	Formation et évaluation des compétences du personnel	4 référents Formation initiale et continue technicien Formation initiale et continue biologiste EEQ Evaluation par un quizz Procédures de Gestion des ressources

		humaines du personnel médical et non médical Fiche d'habilitation du personnel Procédure maintien des compétences Procédure évaluation de la formation Fiche de postes ECBU Matrice des compétences
Non conformité	Gestion des non conformités analytiques liées a des erreurs de manipulation ou erreurs technique	Traçabilité : identifiant automate, identifiant Glims, traçabilité feuille de paillasse Déclaration et traitement des non conformités Révision régulière des non conformités

5. Résultat : Vérifications initiales expérimentales *in situ*

a. Essais de comparaison de méthode

Mode opératoire : pour 30 souches d'entérobactéries (cliniques, CIQ ou EEQ) l'antibiogramme est réalisé en double avec la technique Microscan et la technique de diffusion en milieu gélosé utilisée au laboratoire.

Objectifs : la concordance est conforme si l'accord de catégorie global est supérieur ou égal à 90 % et si il y a moins de 5% d'écart majeur (8) (1)

Résultats :

Caractéristiques des souches testées :

- *E. cloacae* (n=3), *E. aerogenes* (n=1), *P. vulgaris* (n=2), *P. mirabilis* (n=4), *K. pneumoniae* (n=7), *K. oxytoca* (n=1), *E. coli* (n=8), *P. stuartii* (n=1), *M. morganii* (n=2), *C. koseri* (n=1)
- Phénotypes variés : sauvage, Groupe 3 céphalosporinase déréprimée (n=4), céphalosporinase DHA1 (n=1), BLSE (n=6), carbapénémase (1 OXA 48, 1 NDM, 1 VIM)

Détection des BLSE et carbapénèmases : pour ces profils 100 % de phénotypes ont été détectés ou ont impliqués des tests complémentaires

Analyse des concordances et discordances : l'accord de catégorie global est de 92,4 % et les écarts majeurs s'élèvent à 2,6 %, l'analyse des discordances est illustrée en Annexe 9.

Conclusion : La comparaison avec la technique de diffusion en milieu gélosé est nécessaire afin d'assurer la cohérence biologique des dossiers. L'essai de concordance des deux techniques est conforme. Les méthodes en milieu solide et

liquide ne sont pas exactement corrélées entre elles. Ceci est confirmé par notre essai. L'étude des discordances a montré des résultats qui nécessitent d'être investigués.

b. Essais de robustesse : antibiogramme sur colonies âgées de plus de 24h

Mode opératoire : pour 12 souches l'antibiogramme Microscan a été réalisé conformément aux recommandations du fabricant (souches à 18h-24h de pousse). Ces souches ont été conservées à 4 °C pendant 24h supplémentaires et l'antibiogramme Microscan à nouveau réalisé.

Objectif : la concordance est conforme si l'accord de catégorie global est supérieur ou égal à 95 % (condition de conformité pour la reproductibilité) (8) (1).

Résultats : l'accord de catégorie global est de 96,9 % et les écarts majeurs s'élèvent à 0,9 %, l'analyse des discordances est illustrée en Annexe 11.

Conclusion : Cet essai de robustesse est conforme. Les conditions testées correspondent aux pratiques de notre laboratoire, en effet le dimanche les antibiogrammes du secteur des ECBU ne sont pas réalisés. Les souches incubées jusqu'à 24h à 35°C sont ensuite conservées à 4°C 24h supplémentaires et analysées le lundi. Ces pratiques opératoires ne respectent pas les conditions précisées par le fournisseur. L'échantillon étudié est restreint, l'analyse des discordances montre de mauvais résultats pour le nitrofurane et la fosfomycine deux molécules clefs du traitement des infections urinaires. Ces résultats nécessitent des études complémentaires via les CIQ par exemple.

c. Essais de robustesse : relecture visuelle des plaques à 24h ou 48h

Mode opératoire : pour 40 et 20 souches respectivement l'antibiogramme est réalisé et lu par l'automate dans les conditions recommandées par le fournisseur. Pour un premier essai, les 40 plaques sont conservées à 4°C et relues 24h plus tard visuellement. Pour le deuxième essai les 20 plaques sont conservées à 4°C et relues 48h plus tard visuellement.

Objectif : la concordance est conforme si l'accord de catégorie global est supérieur ou égal à 95 % (condition de conformité pour la reproductibilité) (8) (1).

Résultats : pour les essais de relecture des plaques à 24h et 48h l'accord de catégorie global est de 99,5 et 100 % et les écarts majeurs s'élèvent à 0,1 et 0 % respectivement. L'analyse des discordances est illustrée en Annexe 12 et 13.

Conclusion : Ces essais de robustesse sont conformes pour une relecture visuelle des plaques conservées jusqu'à 48h à 4°C. Les conditions testées correspondent aux pratiques de notre laboratoire, en effet le dimanche les antibiogrammes du secteur des ECBU ne sont pas validés. Les plaques incubées jusqu'à 18h à 35°C sont ensuite conservées à 4°C 24h et analysées le lundi. En cas de jour férié suivant le lundi elles peuvent être conservées 24h supplémentaires.

d. Essais de fidélité intermédiaire et d'exactitude

En accord avec les préconisations du fabricant et des sociétés de microbiologie nous avons effectué une vérification initiale de ces paramètres. Les données récoltées sont restreintes elle seront complétées par les résultats des CIQ et EEQ pour une analyse pertinente. Ces essais sont seulement résumés ci-dessous.

Fidélité intermédiaire (reproductibilité) : pour cette approche nous avons réalisé des passages sur 3 jours, en triple de 3 souches (souches ATCC qui seront utilisées pour les CIQ). L'accord de catégorie était conforme (> 95 %).

Exactitude : pour cette approche nous avons analysé 10 souches dont le phénotype est déterminé par la méthode de référence (souches ATCC et EEQ), la plus part de ces souches étaient des BMR et BHRe (carbapénémases). L'accord de catégorie et les écarts majeurs et très majeurs était conformes (>90 % et <3% respectivement)

VI. Discussion (CHEK)

1. Vérification initiale des performances : conclusion aptitude de la technique

La vérification initiale des performances du panel NEG MIC 39 utilisé dans le cadre de la détermination de la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries est conforme aux objectifs initialement fixés pour notre laboratoire. Une étape de révision bibliographique s'est additionnée à une étape expérimentale grâce à laquelle le laboratoire a vérifié la conformité dans son environnement propre. Cette

évaluation *in situ* a permis notamment d'évaluer la concordance globale de nos deux méthodes d'étude de la sensibilité aux antibiotiques à 92,4%. Elle a aussi permis de vérifier la conformité de pratiques qui ne répondent pas aux recommandations du fournisseur, cette vérification était essentielle pour répondre à des objectifs d'ordre organisationnel (travail le dimanche et jours fériés).

La mise en application de la maîtrise des risque est actuellement partielle et doit être améliorée dans les mois qui arrivent.

La mise en routine de la technique pour le panel NEG MIC 39 est effective depuis le mois de mai 2015 sur les entérobactéries du secteur ECBU.

2. Documentation et formation initiale du personnel

Nous avons mis en place une base documentaire avant l'utilisation du Microscan en routine. Les documents rédigés en priorité sont : le mode opératoire de réalisation de l'antibiogramme Microscan, le mode opératoire de maintenance, le mode opératoire des EEQ / CIQ. Le mode opératoire de réalisation est terminé. Les autres documents sont partiellement écrits. Ceci a représenté un travail important : cette méthode est partiellement automatisée et il existe plusieurs mises en application possibles (préparation de l'inoculum manuelle ou via le Prompt, lecture manuelle ou automatisée, plusieurs modèles d'automate possible, plusieurs modèles d'organisation informatique possible etc.). Une documentation propre au laboratoire précisant les spécificités a été mise au point (notices et guides techniques seules pas adaptées car trop généralistes). Nous avons de plus veillé à y inclure des points essentiels dans le cadre de la maîtrise des risque : reisolement parallèle systématique pour contrôle de la pureté et qualité de l'inoculum par exemple dans le mode opératoire de réalisation. Pour la rédaction et vérification de cette documentation nous avons respecté la procédure générale de « Gestion documentaire » du laboratoire. Son intégration dans le système de gestion documentaire du laboratoire Kalilab est en cours.

Les techniciens et biologistes référents ont reçu une formation par le fournisseur. L'ensemble du personnel concerné a ensuite été formé par les référents. Ces formations n'ont pas encore été formalisées. Une présentation des résultats de la

vérification initiale et de la mise en place de la méthode est prévue le 1 octobre 2015. Elle sera destinée aux référents et biologistes, à cette occasion les suggestions de l'ensemble du personnel concerné seront enregistrer et étudier.

VII. Nouvelle planification (ACT)

1. Vérification continue des performances des AST : les objectifs

La vérification initiale des performances à l'installation se poursuit ensuite dans le temps par l'intermédiaire des CQI et des EEQ.

Les objectifs spécifiques de cette évaluation continue des performances pour ce test de sensibilité aux antibiotiques sont :

*d'agrémenter les données pour une analyse pertinente de l'exactitude et de la fidélité intermédiaire de cette méthode

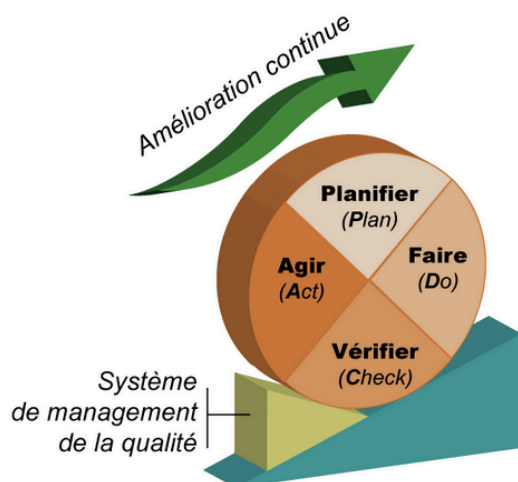
*d'agrémenter les données de comparaison de nos deux méthodes (même programme de CQI et CQE)

*de vérifier les performances des réactifs (plaques surtout)

*de vérifier les performances du système d'expertise

*de vérifier les compétences du personnel technique (maîtrise de la technique dont inoculum) et médical (maîtrise de la validation et interprétation des profils de résistance).

2. Bilan : fait et à faire



Le tableau fait un état des lieux en ce mois de septembre de la mise en place de cette nouvelle technique. La deuxième colonne présente les prochaines actions à mener.

Quoi	Fait	A faire
ANALYTIQUE	<u>Vérification initiale des performances</u> Panel NEG MIC 39 Révision bibliographique Analyse et maîtrise des risques Vérification expérimentale <i>in situ</i> Synthèse-analyse des résultats Conclusion Panel POS MIC 33 Révision bibliographique Analyse et maîtrise des risques Vérification expérimentale <i>in situ</i> <u>Vérification continue des performances</u> Passage de CIQ et EEQ	<u>Vérification initiale des performances</u> Panel POS MIC 33 Synthèse-analyse des résultats Conclusion (Octobre 2015) <u>Vérification continue des performances</u> EEQ et CQI : méthode d'analyse des résultats, d'analyse d'impact et les conduites à tenir – à formaliser CQI : définir un planning commun de passage des CQI sur les deux méthodes (Octobre 2015)
DOCUMENTATION	<u>Rédaction de la base documentaire technique :</u> Mode opératoire de réalisation Formulaire / planning de maintenance	<u>Rédaction documentaire technique à finir</u> Mode opératoire de maintenance Mode opératoire gestion des pannes Mode opératoire CQI/CQE <u>Intégration des documents fournisseur dans Kalilab</u> A discuter : notices, guide d'utilisation des logiciels (Octobre 2015)
PERSONNEL	<u>Formation initiale du personnel technique et médical</u> Formation des référents Formation interne par les référents	<u>Formation initiale du personnel technique et médical</u> Formalisation en incluant l'antibiogramme liquide dans les fiches de poste technicien/biologiste secteur ECBU Présentation des résultats de vérification initiale des performances aux techniciens référents et biologistes (1er octobre 2015) Enregistrement et évaluation des suggestions d'amélioration proposés pour mise en œuvre si approprié (1er octobre 2015) Formation continue : A voir

Figure 3 : Septembre 2015, « fait » et « à faire » pour la méthode Microscan

BIBLIOGRAPHIE

1. Norme NF EN ISO 20776-2 Systèmes d'essais en laboratoire et de diagnostic in vitro - Sensibilité in vitro des agents infectieux et évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes - Partie 2 : évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes. AFNOR, [s.l.], octobre 2007.
2. Ordonnance N° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale. Journal Officiel de la République Française n°0012, [s.l.], 15 janvier 2010.
3. Norme ISO EN 15189 Laboratoires d'analyses de biologie médicale: exigences particulières concernant la qualité et la compétence. AFNOR, [s.l.], décembre 2012.
4. Décret n° 2015-205 du 23 février 2015 relatif aux modalités de dépôt des demandes d'accréditation des laboratoires de biologie médicale prévues en application du I de l'article 7 de l'ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale. Journal Officiel de la République Française n°0047, [s.l.], 25 février 2015.
5. SH GTA 04 Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes de biologie médicale. COFRAC. Révision : #01 - 04/2015.
6. SH FORM 43 FICHE TYPE - Vérification (portée A) / Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale. COFRAC. Révision : #01 - 04/2015.
7. QUAMIC recommandations 2014. Comité Qualité de la Société Française de Microbiologie. Janvier 2014.
8. Cumitech 31A. Verification and validation of procedures in the clinical microbiology laboratory. American society for microbiology (ASM). 2009.
9. Recommandations 2013. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Juin 2013.

10. Jorgensen JH, McElmeel ML, Fulcher LC, Zimmer BL. 2010. Detection of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBLs) by testing with MicroScan overnight and ESBL confirmation panels. *J Clin Microbiol* 48:120–123.
11. Jang W, Park Y-J, Park KG, Yu J. 2013. Evaluation of MicroScan WalkAway and Vitek 2 for determination of the susceptibility of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates to cefepime, cefotaxime and ceftazidime. *J Antimicrob Chemother* 68:2282–2285.
12. Woodford N, Eastaway AT, Ford M, Leanord A, Keane C, Quayle RM, Steer JA, Zhang J, Livermore DM. 2010. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan Automated Systems for Detection and Inference of Mechanisms Responsible for Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 48:2999–3002.
13. Bulik CC, Fauntleroy KA, Jenkins SG, Abuali M, LaBombardi VJ, Nicolau DP, Kuti JL. 2010. Comparison of meropenem MICs and susceptibilities for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by various testing methods. *J Clin Microbiol* 48:2402–2406.

ANNEXES

Annexe 1 : Avantages et inconvénients de la méthode Microscan	32
Annexe 2 : Détail des opérations pour l'obtention d'un antibiogramme Microscan, extrait du mode opératoire.....	33
Annexe 3 : Matériel utilisé pour le test de sensibilité aux antibiotiques Microscan ...	34
Annexe 4 : Tableau résumé des performances à évaluer lors d'une vérification / validation de méthode quantitative ou qualitative (extrait de SH GTA 04) (5).....	35
Annexe 5 : Détermination des critères de performance pour la vérification initiale méthode d'antibiogramme Microscan.....	36
Annexe 6 : Description de la méthode antibiogramme Microscan selon le SH FORM 43 (6)	37
Annexe 7 : Révision bibliographique : Antibiogramme Microscan Panel NEG MIC 39 – Entérobactéries	38
Annexe 8 : Diagramme d'Ishikawa ou des 5 M pour la méthode antibiogramme Microscan	42
Annexe 9 : Résultats de l'essai de comparaison de méthode antibiogramme technique Microscan et technique de diffusion en milieu gélosé (30 souches).....	43
Annexe 10 : Résultats de l'essai de robustesse : antibiogramme sur des colonies âgées de plus de 24h (conservation à 4°C) (12 souches).....	43
Annexe 11 : Résultats de l'essai de relecture visuelle des plaques conservées 24h à 4°C (N=40).....	44
Annexe 12 : Résultats de l'essai de relecture visuelle des plaques conservées 24h à 4°C (N=40).....	44



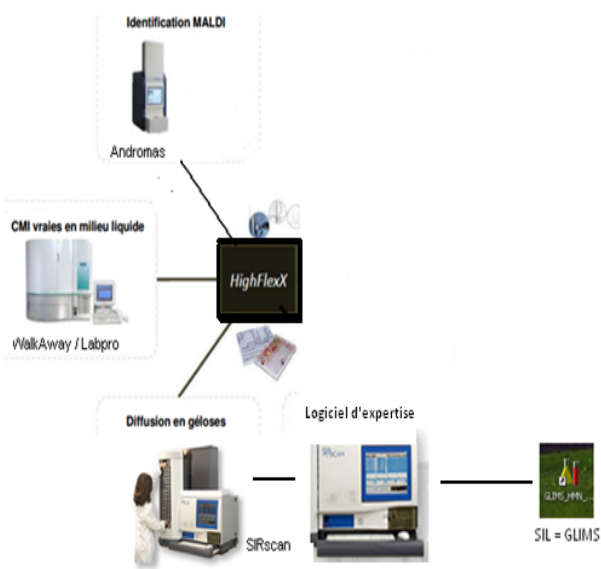
Annexe 1 : Avantages et inconvénients de la méthode Microscan

Avantages	Inconvénients
<p>Justesse : les résultats rendus bruts correspondent à des CMI vraies (lecture en point finale, contrairement au milieu gélosé qui estime la CMI à partir du diamètre d'inhibition) corrélées à la méthode de référence selon la norme en vigueur (1). Des trois automates actuellement disponibles, cette technique détermine les CMI dans les conditions les plus proches de la méthode de référence. Les CMI sont ensuite interprétées (S, I ou R) par un logiciel expert conforme aux recommandations en vigueur (9).</p> <p>Fidélité : la lecture des résultats des CMI est automatisée, ce qui évite la subjectivité d'un opérateur (problème de l'ajustement des diamètres dans la méthode des disques). La connexion à l'informatique assure une interprétation standardisée automatique grâce à un système expert ajusté et validé par l'ensemble des biologistes du laboratoire.</p> <p>Rapidité : un gain de temps est observé sur les étapes de lecture et interprétation automatisée</p> <p>Traçabilité : les traçabilités des réactifs (code barre), des anomalies techniques (erreur de température d'incubation, mauvaise durée d'incubation, alarmes de maintenances par exemple) et des résultats patient sont améliorées.</p> <p>Contrôle visuelle possible : le contrôle des plaques lues automatiquement reste possible en cas de profil de résistance incohérent par exemple.</p>	<p>Automatisation partielle : certaines étapes restent manuelles et donc source de variation.</p> <p>Utilisation restreinte à certaines bactéries : actuellement cette technique ne permet pas d'étudier les bactéries exigeantes et même si le fabricant la considère valide sur les bacilles non fermenteurs et les pneumocoques des discordances par rapport à la méthode de référence ont été rapportées. Les panels d'antibiotiques proposés essayent de répondre aux dernières normes internationales ainsi certaines couples bactérie/antibiotique ne sont pas interprétables selon les recommandations françaises en vigueur ou ne sont pas testés. Ainsi la méthode par diffusion est souvent nécessaire pour vérifier ou compléter certains profils de résistance notamment émergents. Ceci implique que les laboratoires qui possèdent cette technique conservent des réactifs et l'expertise nécessaire à la méthode de diffusion en milieu gélosé.</p> <p>Quantité de réactifs important : déchets importants</p>

Annexe 2 : Détail des opérations pour l'obtention d'un antibiogramme Microscan, extrait du mode opératoire

Quand	Qui	Quoi : Antibiogramme Microscan	Comment : Documentation
J1	Technicien 1 Biologiste	Colonies bactériennes + demande d'antibiogramme	MOP : ECBU
J1	Technicien 1	Etape 1 : Enregistrement informatique et édition d'étiquettes	Guide utilisateur logiciel Labpro Guide utilisateur HighFexX Liste : code d'identification HighFexX
J1	Technicien 1	Etape 2 : Préparation de l'inoculum 0,5 McF Etape 3 : Inoculation de la plaque de microdilution, souche et isolement parallèle	MOP : CQI et CQE antibiogrammes MOP : Stockage et conservation des réactifs MOP : Conservation des souches bactériennes
J1 avant 15h	Technicien 1 Automate Walk Away Logiciel Labpro	Etape 4 : Chargement pour incubation des plaques	Guide utilisateur logiciel Labpro MOP : maintenance Microscan MOP : gestion des pannes Microscan
J2 Entre 8h et 10h	Technicien 2 Logiciel Sirscan	Etape 5 : Verification technique et expertise automatisée logiciel Sirscan	Guide utilisateur logiciel Sirscan MOP : réalisation antibiogramme Microscan Liste : panel NEG MIC 39 Liste : panel POS MIC 33
J2	Biologistes Internes Logiciel Glims	Etape 6 : Validation biologique	Guide validation biologique Microscan Recommandations CA-SFM 2013
J2	Biologistes Internes	Antibiogramme: S, I ou R et CMI (< ou égal X , = X ou > X)	Procédure générale validation biologique Procédure générale transmission des résultats

Annexe 3 : Matériel utilisé pour le test de sensibilité aux antibiotiques Microscan

Automate	 <p>Microscan Walk-Away 96 plus modèle de 96 places, il possède les fonctions d'incubateur et de lecteur automatique des CMI. Il comprend 8 tours d'incubation et un système optique de lecture (turbidimétrie).</p>
Réactifs	 <p>Plaques d'antibiogramme : deux panels sont disponibles, le panel NEG MIC 39 pour les entérobactéries et le panel POS MIC 33 pour les staphylocoques et entérocoques. Système Prompt et Renok : pour inoculation simple et standardisée des plaques. Système DensiCheck : densitomètre et flacons de solution pour préparation de l'inoculum Géloses au sang et Uri4: pour la vérification parallèle de la pureté et richesse de l'inoculum Petit matériel de laboratoire : pipette de 100 microlitres dédiée, embouts, oses de 10 microlitres, gélose pour souche</p>
Logiciels - informatique	 <p>Logiciel Labpro : logiciel de l'automate Microscan Logiciel SirScan : logiciel d'expertise et d'épidémiologie commun aux deux techniques d'antibiogramme disponible au laboratoire, il est relié au SIL : logiciel Glims Logiciel HighFlexX : middleware reliant l'automate d'identification par spectrométrie de masse Andromas, l'automate de l'antibiogramme Microscan et le logiciel d'expertise SirScan</p>

Annexe 4 : Tableau résumé des performances à évaluer lors d'une vérification / validation de méthode quantitative ou qualitative (extrait de SH GTA 04) (5)

CRITERES A EVALUER	Vérification (portée A)		Validation (portée B)	
	Méthode quantitative	Méthode qualitative	Méthode quantitative	Méthode qualitative
<i>Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>
<i>Justesse/exactitude (approche)</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>
<i>Incertitudes/facteurs de variabilité et évaluation</i>	<i>Essai</i>	<i>Maîtrise des facteurs de variabilité</i>	<i>Essai</i>	<i>Maîtrise des facteurs de variabilité</i>
<i>Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire (appareil en miroir⁹, EBMD) et analyse des discordances¹⁰</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>
<i>Intervalle de mesure (Limite de quantification et limites de linéarité)</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>/</i>	<i>Essai</i>	<i>/</i>
<i>Interférences (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments, ...)</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>
<i>Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>
<i>Robustesse</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>
<i>Stabilité réactifs (après ouverture, embarqués)</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>
<i>Intervalle de référence (valeurs usuelles)</i>	<i>Bibliographie (fournisseur ou autre, s'assurer de la cohérence avec l'état de l'art)</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>
<i>Limite de détection</i>	<i>/</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>/</i>	<i>Essai</i>
<i>Spécificité/sensibilité analytique</i>	<i>/</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>/</i>	<i>Essai</i>
Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude¹¹ de la méthode ou du système analytique.				

Annexe 5 : Détermination des critères de performance pour la vérification initiale de la méthode d'antibiogramme Microscan

Critère à évaluer	Vérification portée A, méthode qualitative selon le SH GTA 04	Vérification initiale Microscan	Commentaire
Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Essai	Essai initial (fournisseur)	Incertitude : absence de pertinence clinique et méthodologique des essais (Quamic, R. Leclerc, 2012). Continue : fidélité intermédiaire et justesse via les CIQ et les EEQ
Justesse/exactitude	Essai	Essai initial (fournisseur)	
Incertitude/facteurs de variabilité	Maitrise des variabilités	Maitrise des risques	
Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire	Essai	Essai initial	Continue : CIQ et EEQ,
Interférence	Non applicable	Non applicable	Non applicable
Intervalle de mesure, limite de quantification et de linéarité	Non applicable	Non applicable	Non applicable
Contamination	Bibliographie	Maitrise des risques : essai systématique de pureté	Pour chaque souche testée un isolement parallèle de l'inoculum est réalisé. Prélèvement en fin de préparation de la plaque, dans le bac d'inoculation, pour couvrir la plus part des étapes à risque.
Robustesse	Bibliographie	Essai initial : Travail sur colonie de plus de 24h Relecture des plaques après 24h	Travail hors recommandation du fabricant, les antibiogrammes n'étant ni lus ni réalisés le dimanche et les jours fériés.
Stabilité des réactifs	Bibliographie	Bibliographie	
Intervalle de référence	Bibliographie	Bibliographie	Recommandations CA-SFM pour la lecture interprétative de l'antibiogramme
Limite de détection	Bibliographie	Non applicable	
Sensibilité/spécificité analytique	Bibliographie	Bibliographie	Concordance avec la méthode de référence

Annexe 6 : Description de la méthode antibiogramme Microscan selon le SH FORM 43 (6)

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande :	Souche bactérienne* : détermination de la sensibilité aux antibiotiques *Entérobactéries (panel NEG MIC 39), Staphylocoques et entérocoques (panel POS MIC 33)
Principe de la Méthode :	Inhibition de croissance en milieu liquide en présence d'une certaine concentration d'antibiotiques, après incubation Méthode automatisée qualitative (éléments quantifiables discrétisés)
Type d'échantillon primaire :	Culture bactérienne
Type de récipient, additifs :	Milieu de culture gélosé non sélectif
Prétraitement de l'échantillon :	Préparation d'un inoculum 0,5 McF
Unités :	S, I ou R et < ou égal X ; X ou > X en mg/L
Critères d'interprétation :	Recommandations CA-SFM 2013 (9)
Marquage CE (Oui/Non) :	Oui
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	BAC
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	Automate Microscan Walk-Away 96 plus Beckman Coulter
Référence du réactif :	Plaque Panel NEG MIC 39 référence Beckman Coulter : B1016-155, Notice : 3251-1239A Plaque Panel POS MIC 33 référence Beckman Coulter : B1016-173, Notice : 3251-1238A
Matériau d'étalonnage (références) :	Souches ATCC : <i>E. coli</i> 25922, <i>S. aureus</i> 29213, <i>E. faecalis</i> 29212
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	NA

Annexe 7 : Révision bibliographique : Antibiogramme technique Microscan Panel NEG MIC 39 – Entérobactéries

I. Objet

Cette révision de la bibliographie a pour objectif de faire un point sur les performances actuelles de la technique.

II. Définitions / mots clés

Sensibilité : capacité du test à détecter les résistants

Spécificité : capacité du test à ne pas détecter de faux résistants

ECBU: Examen Cyto-Bactériologique des Urines

S / I / R : Sensible / Intermédiaire / Résistant

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

EUCAST : Comité Européen de l'Antibiogramme

III. Contenu du document

1. Une technique validée : marquage CE

Cette technique constitue une micro-méthode de la technique de référence (la microdilution en bouillon). Après inoculation, réhydratation avec une suspension standardisée de bactéries et après incubation, la CMI est déterminée par la plus basse concentration d'antibiotique montrant une inhibition de croissance. Les résultats bruts correspondent à des CMI vraies (lecture en point finale par turbidimétrie). Cette technique au marquage CE (Conforme aux Exigences) est un Dispositif Médical de Diagnostic In Vitro (DM-DIV) corrélé à la méthode de référence. La validation des performances par le fournisseur a été réalisée selon la norme en vigueur NF EN ISO 20776.

2. Conformité des molécules et CMI testées au regard des recommandations du CA-SFM

Le tableau 1 présente la révision de la conformité du panel d'antibiotiques testé au regard des recommandations actuellement appliquées au laboratoire (Recommandations CA-SFM 2013). A titre informatif la conformité avec les recommandations EUCAST 2015 est évoquée afin d'appréhender les changements potentiels.

Antibiotique testés	CMI testées (mg/L)	Concentrations critiques (mg/L) CASFM 2013		Concentrations critiques (mg/L) EUCAST 2015		Conclusion	Rendu labo	Rendu clinicien
		S <=	R >	S <=	R >			
Amikacine	4 ; 8 ; 16	8	16	8	16	Conforme	Oui	Oui
Amoxicilline	1 ; 2 ; 4 ; 8	4	8	8	8	Conforme	Oui	Oui
Amoxicilline – K clavulanate	2/1 ; 4/2 ; 8/4	4/2	8/2	8/2	8/2	Réglage (Problème 2015 à voir)	Oui	Oui
Aztréonam	1 ; 2 ; 4 ; 8 ; 16	1	8	1	4	Conforme	Oui	Oui
Céfépime	0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8	1	4	1	4	Conforme	Oui	Oui
Céfixime	1 ; 2	1	2	1	1	Conforme	Oui	Oui
Céfotaxime	0,5 ; 1 ; 2 ; 16	1	2	1	2	Conforme	Oui	Oui
Cefoxitine	2 ; 4 ; 8 ; 32	8	32	8	16	Conforme	Oui	Oui
Ceftazidime	0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8	1	4	1	4	Conforme	Oui	Oui
Céfalotine	8 ; 16 ; 32	8	32	-	-	Conforme	Oui	Oui
Ciprofloxacin	0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2	0,5	1	0,5	1	Conforme	Oui	Oui
Colistine	2	2	2	2	2	Conforme	Oui	Non
Doripénème	1 ; 4	1	4	1	2	(Problème 2015 à voir)	Oui	Non
Ertapénème	0,5 ; 1	0,5	1	0,5	1	Conforme	Oui	Non
Fosfomycine	32	32	32	64	128	(Problème 2015 à voir)	Oui	Oui
Gentamycine	1 ; 2 ; 4	2	4	2	4	Conforme	Oui	Oui
Imipénème	0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8	2	8	2	8	Conforme	Oui	Oui
Mécillinam	8	8	8	8	8	Conforme	Oui	Oui
Ac. Nalidixique	8 ; 16	8	16	16	16	Conforme	Oui	Non
Nitrofurantoine	64	64	64	64	64	Conforme	Oui	Oui
Norfloxacin	0,5 ; 1	0,5	1	0,5	1	Conforme	Oui	Oui
Ofloxacin	0,5 ; 1 ; 2 ; 4	0,5	1	0,5	1	Conforme	Oui	Oui
Pipéracilline	8 ; 16 ; 64	8	16	8	16	Conforme	Oui	Oui
Pipéracilline/Tazobactam	4 ; 8 ; 16 ; 64	8	16	8	16	Conforme	Oui	Oui
Ticarcilline	8 ; 16 ; 32 ; 64	8	16	8	16	Conforme	Oui	Oui
Ticarcilline/K clavulanate	8 ; 16 ; 32 ; 64	8	16	8	16	Conforme	Oui	Oui
Tigécycline	1 ; 2 ; 4	1	2	1	2	Conforme	Oui	Oui
Tobramycine	1 ; 2 ; 4	2	4	2	4	Conforme	Oui	Oui
SXT	2/38 ; 4/76	2/38	4/76	2/38	4/76	Conforme	Oui	Oui

Tableau 1 : Analyse de la conformité du panel NEG MIC 39 - entérobactérie selon les recommandations CA-SFM actuelles.

Rendu laboratoire : toutes les molécules de la plaque sont testées mais toutes ne sont pas rendues et ne sont donc pas visibles sur le logiciel du laboratoire (SIL). Les couples entérobactérie / molécule testés suivants ne sont pas rendus car lors des études de performance du fabricant, les concordances obtenues sont apparues non acceptables par rapport à la méthode de référence :

<i>C. koseri</i> et pipéracilline	<i>Salmonella</i> spp. et colistine
<i>E. cloacae</i> et acide nalidixique	<i>K. pneumoniae</i> et acide nalidixique
<i>E. cloacae</i> et colistine	<i>M. morganii</i> et cefotaxime
<i>Klebsiella</i> spp. et mécillinam	<i>Serratia</i> spp. et cefotaxime
<i>P. mirabilis</i> et tigécycline	

Concernant les couples *M. morganii* et *Serrata spp.* / cefotaxime : au regard de l'intérêt thérapeutique de cette molécule une règle d'interprétation est paramétrée au laboratoire pour une interprétation du cefotaxime alignée sur la ceftazidime.

Rendu clinicien : en fonction de l'intérêt thérapeutique ou impact sur la consommation locale d'antibiotique les résultats sont rendus ou non au prescripteur. Ces sensibilités analytiquement conformes restent visibles sur le logiciel du laboratoire (SIL).

Conclusion : toutes les molécules et CMI testées sont conformes aux recommandations actuellement appliquées au laboratoire. Pour les molécules « non rendu labo » une autre méthode de détection de sensibilité disponible au laboratoire peut être utilisée (méthode des disques ou E test).

3. Performances des tests de détection de BLSE

Principe du test :

Suspicion de BLSE

Une bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) est suspectée en cas de résultat I ou R pour les céphalosporines de 3^{ème} génération ou monobactam (cefotaxime, ceftazidime, céfépime et/ou aztréonam).

Confirmation BLSE

Le test de confirmation est basé sur la combinaison de deux tests : céfotaxime / K clavulanate et ceftazidime / K clavulanate. En présence de BLSE on observe une baisse de CMI > ou égale à 3 dilutions de raison géométrique 2 en présence d'une concentration fixe d'acide clavulanique, par rapport à la valeur de CMI de l'antibiotique testé seul. Le test de confirmation est interprété : positif, négatif ou ininterprétable selon les séquences de dilution. Cette interprétation est faite par le logiciel expert (Figure 1)

CAZ / CAZ+1	< ou = 0,25	2	> 2
< ou = 0,5	INI	NEG	NEG
1	INI	NEG	NEG
2	POS	NEG	NEG
4	POS	NEG	NEG
8	POS	POS	NEG
> 8	POS	POS	INI

Test ceftazidime et ceftazidime + K clavulanate

CFT / CFT+1	< ou =0,5	4	> 4
< ou = 0,5	INI	NEG	NEG
1	INI	NEG	NEG
2	INI	NEG	NEG
16	POS	POS	NEG
> 16	POS	POS	INI

Test céfotaxime et céfotaxime + K clavulanate

Figure 1 : Interprétation du test de détection des BLSE de la plaque NEG MIC 39

Données fabricant :

Suspicion de BLSE

Les essais ont été menés sur 93 souches BLSE (80 *E. coli*, *K pneumoniae* et *K.oxytoca* et 13 souche de *P. mirabilis*). La sensibilité du test de suspicion était de 100 % pour *E. coli* et *Klebsiella spp.* et de 92,3 % par *P. mirabilis*. La spécificité n'est pas bonne puisque ce test est un dépistage. Il se positive notamment chez les entérobactéries productrices d'enzyme de type AmpC.

Confirmation BLSE

Les essais ont été menés sur 95 souches suspectes de BLSE (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *K. oxytoca* et *P. mirabilis*). 42 souches étaient productrices de BLSE (confirmation par biologie moléculaire) et 53 souches ne l'étaient pas. La sensibilité rapportée est de 93% et la spécificité de 96% (Manuel d'utilisation des plaques conventionnelles pour Gram négatifs. Notice).

Données de la littérature : Il existe assez peu de données. Une équipe américaine a trouvé une sensibilité du test de confirmation de 95 % (n=64), les 5 % restant étaient classés ininterprétables (10). Une publication coréenne récente conduite sur 103 souches d' *E. coli* et 117 souches de *K. pneumoniae* produisant principalement des BLSE de type CTX-M a montré que Microscan était capable de détecter 80.5% des BLSE (11). Dans cette même étude la détermination des CMI au C3G était fiable pour le céfotaxime mais pas pour céfépime et ceftazidime. Aucune donnée sur la Tazocilline n'est disponible.

Conclusion : Bonne sensibilité du test de suspicion, rester prudent en cas de *P. mirabilis*. Le test de confirmation présente une spécificité et sensibilité acceptables. Confronter les résultats avec les antécédents si disponibles. En cas de test ininterprétable ou en cas de doute la réalisation d'un antibiogramme en milieu solide est pertinente : boîte bétalactamine + boîte cloxacilline en parallèle.

4. Performance des tests détection de la diminution de sensibilité aux carbapénèmes

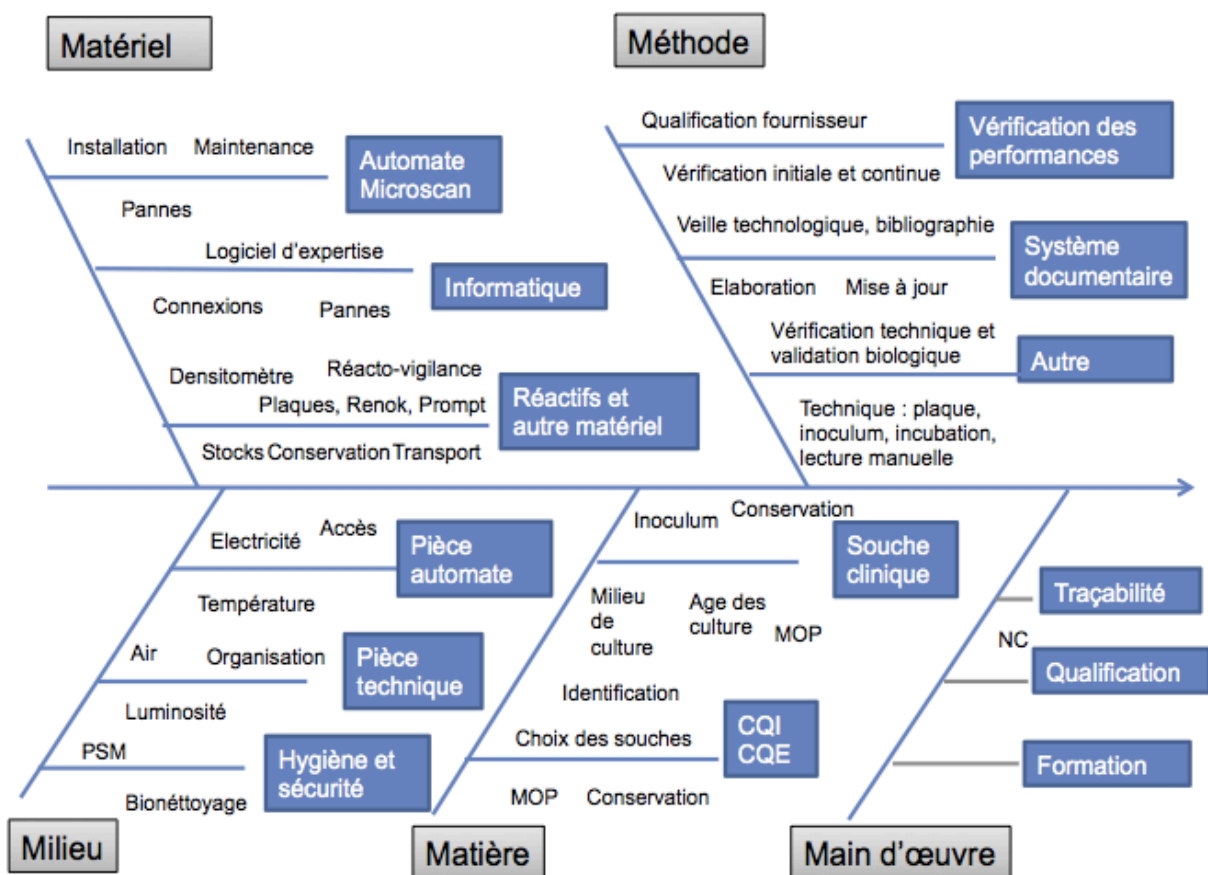
Principe : la diminution de sensibilité aux carbapénèmes est évaluée par les tests ertapénème, imipénème et doripénème. Ces tests, confrontés au l'ensemble du profil de résistance doivent faire évoquer la présence d'une entérobactérie productrice de carbapénémase (EPC).

Donnés fabricant : le fabricant n'a pas communiqué d'information à ce sujet

Donnés de la littérature : Une publication anglaise portant sur 39 EPC (dont 11 OXA 48) et 19 entérobactéries résistantes par un autre mécanisme montrait une sensibilité de détection pour le Microscan de 85% (12). La spécificité était médiocre. Une étude américaine a montré que cette technique permettait de déterminer une CMI fiable aux carbapénèmes (pas d'écart majeur) (13).

Conclusion : la détection de la diminution de sensibilité aux carbapénèmes présente une sensibilité correcte. La CMI est fiable pour les carbapénèmes. En cas de résistance, le recours à l'antibiogramme solide (boîte bétalactamines avec disque de témocilline + boîte cloxacilline) ou à une autre technique de détection des carbapénémases disponible au laboratoire est justifié. En cas de forte suspicion d'OXA 48, du fait de l'absence de témocilline dans le panel, préférer l'antibiogramme en milieu solide.

Annexe 8 : Diagramme d'Ishikawa ou des 5 M pour la méthode antibiogramme Microscan



Annexe 9 : Résultats de l'essai de comparaison de méthode antibiogramme technique Microscan et technique de diffusion en milieu gélosé (30 souches)

Molécule testée	N	C	C %	Em	Em %	EM	EM %	Conclusion
AMOXICILLINE	30	30	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
AMOXICILLINE + AC	30	29	96,7	0,0	0,0	1,0	3,3	conforme
TICARCILLINE	30	30	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
TICARCILLINE + AC	30	24	80,0	3,0	10,0	3,0	10,0	Qui a raison ? non utilisé en thérapeutique sur entérobactéries, disposition à prendre
PIPERACILLINE	30	28	93,3	2,0	6,7	0,0	0,0	conforme
PIPERACILLINE + TAZO	30	25	83,3	2,0	6,7	3,0	10,0	Qui a raison ? disposition à prendre
MECILLINAM	22	16	72,7	0,0	0,0	6,0	27,3	Qui a raison ? 1 seul cut off
CEFALOTINE	30	24	80,0	6,0	20,0	0,0	0,0	Du fait règle Pénicillinase Haut niveau et céfalosporinase de E. coli mieux détecté
CEFOXITINE	30	28	93,3	0,0	0,0	2,0	6,7	Qui a raison ?
CEFOTAXIME	30	26	86,7	4,0	13,3	0,0	0,0	Discordance sur les BLSE, céphalosporinases déréprimées, carbapénémases. Qui a raison ?
CEFTAZIDIME	30	28	93,3	2,0	6,7	0,0	0,0	conforme
CEFIXIME	30	29	96,7	1,0	3,3	0,0	0,0	conforme
CEFEPIME	30	27	90,0	2,0	6,7	1,0	3,3	conforme
AZTREONAME	30	28	93,3	2,0	6,7	0,0	0,0	conforme
IMIPENEME	30	28	93,3	2,0	6,7	0,0	0,0	conforme
ERTAPENEME	30	28	93,3	1,0	3,3	1,0	3,3	conforme
TOBRAMYCINE	30	30	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
AMIKACINE	30	28	93,3	1,0	3,3	1,0	3,3	conforme
GENTAMICINE	30	29	96,7	1,0	3,3	0,0	0,0	conforme
TGC	30	21	70,0	8,0	26,7	1,0	3,3	Qui a raison ?
COLISTINE	27	27	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
SXT	30	29	96,7	1,0	3,3	0,0	0,0	conforme
FURANES	30	30	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
ACIDE NALIDIXIQUE	20	19	95,0	1,0	5,0	0,0	0,0	conforme
NORFLOXACINE	30	28	93,3	2,0	6,7	0,0	0,0	conforme
OFLOXACINE	30	30	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
CIPROFLOXANE	30	30	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
FOSFOMYCINE	30	28	93,3	0,0	0,0	2,0	6,7	Qui a raison ? 1 seul cut off
Total	819	757	92,4	41,0	5,0	21,0	2,6	Conforme

Annexe 10 : Résultats de l'essai de robustesse : antibiogramme sur des colonies âgées de plus de 24h (conservation à 4°C) (12 souches)

Molécule testée	N	n C	% C	n Em	% Em	n EM	% EM	CONCLUSION
AMOXICILLINE	12	11	91,7	1,0	8,3	0,0	0,0	conforme
AMOXICILLINE + AC	12	11	91,7	1,0	8,3	0,0	0,0	conforme
TICARCILLINE	12	12	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
TICARCILLINE + AC	12	11	91,7	1,0	8,3	0,0	0,0	conforme
PIPERACILLINE	12	12	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
PIPERACILLINE + TAZO	12	12	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
MECILLINAM	7	7	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
CEFALOTINE	12	11	91,7	1,0	8,3	0,0	0,0	conforme
CEFOXITINE	12	12	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
CEFOTAXIME	12	12	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
CEFTAZIDIME	12	12	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
CEFIXIME	12	12	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
CEFEPIME	12	12	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
AZTREONAM	12	12	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
IMIPENEME	12	12	100,0	1,0	8,3	0,0	0,0	conforme
ERTAPENEME	12	11	91,7	1,0	8,3	0,0	0,0	conforme
TOBRAMYCIN	12	12	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
AMIKACINE	12	11	91,7	1,0	8,3	0,0	0,0	conforme
GENTAMICIN	12	12	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
TGC	12	11	91,7	1,0	8,3	0,0	0,0	conforme
COLISTINE	11	11	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
SXT	12	12	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
FURANES	12	11	91,7	0,0	0,0	1,0	8,3	1 seul cut-off EM > 5 %
ACIDE NALIDIXIQUE	6	6	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
NORFLOXACINE	12	12	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
OFLOXACINE	12	12	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
CIPROFLOXACINE	12	12	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
FOSFOMYCINE	12	10	83,3	0,0	0,0	2,0	16,7	1 seule cut-off EM > 5 %
Total	324	314	96,9	8,0	2,5	3,0	0,9	conforme

Annexe 11 : Résultats de l'essai de relecture visuelle des plaques conservées 24h à 4°C (N=40)

Molécule testée	N	n C	% C	n Em	% Em	n EM	% EM	CONCLUSION
AMOXICILLINE	40	40	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
AMOXICILLINE + AC	40	40	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
TICARCILLINE	40	40	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
TICARCILLINE + AC	40	39	97,5	1,0	2,5	0,0	0,0	conforme
PIPERACILLINE	40	40	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
PIPERACILLINE + TAZO	40	40	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
MECILLINAM	32	32	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
CEFALOTINE	40	39	97,5	1,0	2,5	0,0	0,0	conforme
CEFOXITINE	40	40	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
CEFOTAXIME	38	38	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
CEFTAZIDIME	40	39	97,5	1,0	2,5	0,0	0,0	conforme
CEFIXIME	40	40	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
CEFEPIME	40	40	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
AZTREONAM	40	40	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
IMIPENEME	40	39	97,5	1,0	2,5	0,0	0,0	conforme
ERTAPENEME	40	40	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
TOBRAMYCINE	40	40	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
AMIKACINE	40	40	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
GENTAMICINE	40	40	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
TGC	40	40	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
COLISTINE	38	38	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
SXT	40	40	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
FURANES	40	40	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
ACIDE NALIDIXIQUE	32	32	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
NORFLOXACINE	40	40	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
OFLOXACINE	40	40	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
CIPROFLOXACINE	40	40	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
FOSFOMYCINE	40	39	97,5	0,0	0,0	1,0	2,5	1 seul cut-off
Total	1100	1095	99,5	4,0	0,4	1,0	0,1	conforme

Annexe 12 : Résultats de l'essai de relecture visuelle des plaques conservées 24h à 4°C (N=40)

Molécule testée	N	n C	% C	n Em	% Em	n EM	% EM	CONCLUSION
AMOXICILLI	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
AMOXICILLINE + AC	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
TICARCILLINE	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
TICARCILLINE + AC	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
PIPERACILLINE	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
PIPERACILLINE + TAZO	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
MECILLINAM	17	17	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
CEFALOTINE	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
CEFOXITINE	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
CEFOTAXIME	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
CEFTAZIDIME	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
CEFIXIME	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
CEFEPIME	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
AZTREONAM	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
IMIPENEME	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
ERTAPENEME	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
TOBRAMYCINE	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
AMIKACINE	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
GENTAMICINE	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
TGC	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
COLISTINE	19	19	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
SXT	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
FURANES	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
ACIDE NALIDIXIQUE	17	17	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
NORFLOXACINE	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
OFLOXACINE	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
CIPROFLOXACINE	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
FOSFOMYCINE	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme
Total	553	553	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	conforme