

Université Pierre et Marie Curie
- Sorbonne Universités

MEMOIRE
POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE
« ASSURANCE QUALITE AU LABORATOIRE DE
BIOLOGIE MEDICALE »

VERIFICATION DE METHODE EN PORTEE A DE
L'ANALYSE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE
« *MTBDRplus* »

Lafeuille Emilie
Année 2016

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 n'engagent que leurs 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 :

Lafeuille Emilie

-Praticien attaché, laboratoire de bactériologie hygiène

Service du Pr Vincent Jarlier

Pôle de Biologie, CHU Pitié-Salpêtrière

49-87 Boulevard de l'hôpital 75013 Paris

Remerciements

Je remercie le comité pédagogique de m'avoir permis de suivre les enseignements de ce DU.

Je tiens à remercier, Messieurs les Professeurs Vincent Jarlier et Jérôme Robert, qui m'ont permis de trouver au sein de leur équipe, les conditions favorables à la réalisation de ce travail.

Je remercie également le Pr Alexandra Aubry, pour son encadrement, pour ses conseils judicieux et sa disponibilité.

J'adresse toute ma gratitude aux biologistes qui ont participé à ce travail et je les remercie pour le temps qu'ils ont pu y consacrer : les Docteurs Sougakoff, Drieux-Rouzet, Brossier, Veziris, et Bernard.

J'adresse de sincères remerciements à M Pierre Voujon pour son aide précieuse.

Merci également aux cadres du service et aux techniciens des secteurs de biologie moléculaire et des mycobactéries, en particuliers Lucas Gandy et Sophie Roussel, pour leur implication et leur aide.

Merci à Isabelle Joly, pour son aide et sa bonne humeur.

Sommaire

I.	Introduction.....	6
1.	Le GHU Pitié-Salpêtrière – Charles Foix	6
2.	Le pôle de Biologie médicale et Pathologie	6
3.	Le laboratoire de bactériologie hygiène.....	7
4.	Etat des lieux du déploiement de la démarche qualité.....	7
a.	Au sein du pôle de biologie médicale	7
b.	Au sein du laboratoire de bactériologie Hygiène.....	7
5.	Présentation du CNR MyRma.....	8
6.	Stratégie diagnostique d'un cas de tuberculose	9
a.	Méthodes de bactériologie conventionnelle :	9
b.	Place de l'analyse MTBDR <i>plus</i> dans la stratégie diagnostique	9
c.	Principe de la technique MTBDR <i>plus</i>	10
d.	Historique de l'analyse « MTBDR <i>plus</i> » au CNR-MyRma	12
7.	Particularités liées à la manipulation de souches de mycobactéries du complexe <i>tuberculosis</i>	13
II.	Objectifs et calendrier du projet 2016	13
III.	Rédaction d'un dossier de vérification de méthode pour l'analyse MTBDR <i>plus</i>	14
1.	Etat des lieux	14
a.	Liste des besoins en matériels et en réactifs	14
b.	Bilan documentaire	14
c.	Modalités de formalisation des compétences du personnel.....	14
2.	Analyse de risques.....	15
3.	Traçabilité des réactifs	21
4.	Mise en place du CQI MTBDR <i>plus</i> et gestion des EEQ	21
a.	CQI.....	21
b.	EEQ.....	22
5.	Choix de la portée d'accréditation	23
6.	Essais sur site.....	24
a.	Contamination inter-échantillon (item 11)	24
b.	Variabilité inter-opérateur (item 3)	24
c.	Corrélation entre les 4 thermocycleurs	24
d.	Répétabilité-reproductibilité (item 1 et 2).....	25
e.	Stabilité des réactifs (item 12)	25
f.	Facteurs de variabilité	25
g.	Robustesse de la méthode (item 12)	26
h.	Interférences (item 10)	26
i.	Comparaison avec une autre méthode utilisée au laboratoire (item 9).....	27
j.	Sensibilité et spécificité analytiques (item 6):	28
7.	Vérification des saisies manuelles.....	29
IV.	Discussion –Conclusion	29
	Références.....	31
	Documents associés	32
	Annexes	33
	Résumé.....	56

Glossaire

AMDEC : analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

BAAR : bacille acido-alcool résistant

BK : bacille de Koch

BM : biologie moléculaire

BMR : bactéries multirésistantes

BMS : bain marie sec

CNR-MyRma : Centre national de référence des mycobactéries et de la résistance aux antituberculeux

CIQ : contrôle interne de qualité

COFRAC : comité français d'accréditation

Dakks : Deutsche akkreditierungsstelle

ECDC : European center for disease prevention and control

EEQ : Evaluation externe de la qualité

ERLNET-TB : European laboratories network for tuberculosis

ETP : équivalent temps plein

GH : groupe hospitalier

LBM : laboratoire de biologie médicale

MCO : médecine, chirurgie, obstétrique

MO : mode opératoire

MOT : micro-organismes hautement pathogènes ou producteurs de toxines

MycoB : mycobactéries

NC : non conformité

PM : personnel médical

PNM : personnel non médical

PR : procédure

SGL : système de gestion du laboratoire

Tk : technique

TB-MDR : tuberculose multirésistante (résistante à la rifampicine et à l'isoniazide)

TB-XDR: tuberculose ultra résistante (MDR et résistante aux fluoroquinolones et à au moins un aminoside antituberculeux injectable)

WT : « wild type » (sauvage)

I. Introduction

Le laboratoire de bactériologie hygiène de la Pitié-Salpêtrière est le support technique du Centre national de référence des Mycobactéries et de la résistance aux antituberculeux (CNR MyRma). A ce titre, il fait l'objet de contrôles réguliers par les instances de l'ANSM, en particuliers de suivi, liés à l'utilisation de l'autorisation de détention et de mise en œuvre des micro-organismes et toxines hautement pathogènes (MOT). Le CNR est donc engagé de longue date dans une démarche qualité.

Dans le contexte de renouvellement des CNR qui aura lieu en 2017, le CNR-MyRma souhaite maintenant renforcer cette démarche qualité, selon la norme NF EN ISO 15189. Le principal objectif de ce travail a été la rédaction du dossier de validation de méthode pour l'analyse MTBDR*plus* sur la matrice « souches isolées en milieu de culture solide ». Il s'agit d'une analyse clé dans l'activité du CNR.

1. Le GHU Pitié-Salpêtrière – Charles Foix

L'hôpital universitaire Pitié-Salpêtrière (PSL) est un établissement de santé publique regroupé au sein d'un même GH avec l'hôpital Charles Foix (CFX). La capacité d'accueil des 2 sites est de 1715 et 474 lits respectivement. L'offre de soin permet de couvrir l'ensemble des activités de MCO sur le site PSL (à l'exception de la pédiatrie) et se décline en 11 pôles cliniques et médico-techniques dont le pôle de Biologie médicale et Pathologie. Le site CFX est dédié à la gériatrie.

2. Le pôle de Biologie médicale et Pathologie

Le pôle de Biologie Médicale et Pathologie a été créé en 2011, par le regroupement de l'ensemble des 15 laboratoires du GH. Il comprend pour le site Pitié-Salpêtrière, le centre de tri, les laboratoires de : biochimie métabolique et multidisciplinaire, biochimie endocrinienne et oncologique, hématologie biologique, génétique, cytogénétique et embryologie, biothérapies, anatomie et cytologie pathologique, coprologie fonctionnelle, virologie, parasitologie-mycologie, immunologie, et bactériologie hygiène. Sur le site Charles-Foix sont également réalisés des examens d'urgence de biochimie et d'hématologie ainsi que des examens de microbiologie et d'hygiène, où la prise en charge des échantillons est assurée par une réception commune.

En 2014, l'activité du pôle de biologie a représenté 6 876 356 actes.

3. Le laboratoire de bactériologie hygiène Le service assure les analyses de bactériologie médicale (24H/24, 7j/7), de dépistage de BMR, et de bactériologie de l'environnement hospitalier. Il assure également un rôle de conseil en matière de diagnostic et de thérapeutique des infections bactériennes, et dans la surveillance de la résistance aux antibiotiques. L'équipe Opérationnelle d'Hygiène (EOH) est implantée dans le service, qui en assure la coordination. Le service héberge le CNR MyRma et participe également au programme national BIOTOX. Pour cela, il dispose d'un laboratoire de confinement L3. L'activité de bactériologie médicale se répartit en 2 doubles secteurs de routine, ainsi qu'en 4 secteurs spécialisés : 1 secteur pour les mycobactéries, 1 secteur de biologie moléculaire, 1 secteur de dosages d'antibiotiques et 1 secteur d'hygiène hospitalière. Elle représente environ 26 000 000 B et BHN/an.

L'antenne du laboratoire de microbiologie présente sur le site de Charles-Foix héberge également une EOH et assure une activité de 2.6 millions de B et BHN/an.

L'équipe médicale et paramédicale de l'ensemble des 2 sites est composée de 14 biologistes (10,5 ETP), 5 internes, 1 cadre supérieur, 2 cadres, 39 techniciens de laboratoire, 3 secrétaires médicales, 3 aides soignants et 7 agents hospitaliers (annexe 1).

4. Etat des lieux du déploiement de la démarche qualité

a. Au sein du pôle de biologie médicale

Le pôle de Biologie médicale s'est doté d'une cellule qualité et de 2 responsables assurance qualité (RAQ), l'un biologiste, l'autre cadre. La cellule qualité est constituée des référents qualité (RQ) biologistes et cadres, issus de chacun des services qui composent le pôle (annexe 2). Elle définit un plan d'actions qualité, que les RQ vont adapter et mettre en œuvre dans leurs propres services. Depuis le début de la mise en place de la démarche assurance qualité, (visite S4 en janvier 2016) l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 a été obtenue pour 38,9% du volume total des analyses portant sur les 3 familles: biochimie-génétique, microbiologie, immunologie-hématologie-biologie de la reproduction. Les demandes d'ajouts d'analyses et d'extensions de portée devraient permettre d'atteindre 43% du volume total pour novembre 2016.

b. Au sein du laboratoire de bactériologie Hygiène

Le service est doté d'1 RQ et de 2 suppléants pour l'ensemble des analyses de bactériologie. Une cellule identique existe pour le pilotage de l'accréditation légionelle. Deux techniciens sont également référents métrologie. Depuis 2013, la cellule qualité s'attache à mettre en place le plan d'actions défini par la cellule qualité du pôle, notamment par l'organisation de réunions régulières et la constitution de groupes de travail:

- gestion du pré-analytique (non-conformités, mise à jour du manuel des prélèvements...)

- mise en place d'une procédure de gestion des habilitations du PM et PNM pour les secteurs de bactériologie de routine,

-mise en place et gestion d'indicateurs qualité (% de NC, délai de rendu des examens urgents),

-gestion du pré- post analytique : procédure de vérification des saisies manuelles

Le laboratoire a obtenu l'accréditation COFRAC selon la norme NF EN ISO 17025 pour l'activité de recherche et dénombrement des légionnelles dans les prélèvements environnementaux depuis 2012 (visite S4 en 2016).

Concernant l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189, nous avons déposé un dossier pour l'analyse « hémoculture » avec 5 lignes de portée :

-BA1 : examen microscopique à l'état frais et après coloration de Gram manuelle ou automatisée,

-BA2 : ensemencement,

-BA4 : culture avec détection de la croissance bactérienne sur automate BACTALERT 3D,

-BA5 : caractérisation par spectrométrie de masse (MALDI TOF),

-BA6 : inhibition de la croissance en présence d'une certaine concentration d'antibiotique(s) après incubation,

5. Présentation du CNR MyRma

Le CNR est un centre d'expertise à la fois microbiologique et thérapeutique. Il assure en effet le diagnostic, l'identification des souches difficiles, les tests de sensibilité aux antibiotiques, l'identification des gènes de résistance, et le génotypage des souches qui lui sont adressées. Il assure également une activité de conseil thérapeutique pour le traitement des cas de tuberculose multirésistante (TB-MDR) et des infections à mycobactéries atypiques. Il existe plus d'une 100^{ème} d'espèces de mycobactéries. Certaines sont des pathogènes stricts responsables de deux grandes maladies contagieuses : la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis* complex) et la lèpre (*Mycobacterium leprae*) Les mycobactéries atypiques sont impliquées pour leur part dans des d'infections opportunistes non contagieuses, les mycobactérioses.

L'activité du CNR s'appuie sur 2 secteurs spécialisés de notre laboratoire: celui de biologie moléculaire et celui des mycobactéries (L3).

Le CNR-MyRma s'est inscrit dans la démarche d'accréditation par l'intermédiaire du travail réalisé pour le LBM du groupe hospitalier, notamment pour l'ensemble des étapes pré- et post- analytiques. Il est également impliqué depuis 2003, dans l'organisation d'un contrôle de qualité externe (CQE) portant sur l'identification des mycobactéries et les tests de sensibilité phénotypiques aux antituberculeux. L'ensemble des laboratoires du réseau AZAY (réseau de

laboratoires hospitalo-universitaires réalisant des analyses de mycobactériologie) participe à ce CQE.

6. Stratégie diagnostique d'un cas de tuberculose

a. Méthodes de bactériologie conventionnelle :

Le diagnostic de certitude d'une tuberculose repose sur la mise en évidence d'une mycobactérie du complexe *tuberculosis* dans les prélèvements biologiques. Il s'agit de crachats le plus souvent, puisque 80% des cas sont des formes pulmonaires. Les techniques de bactériologie conventionnelle, toujours d'actualité, comprennent la réalisation d'un examen microscopique à partir d'un prélèvement, la culture, l'identification et l'antibiogramme phénotypique. Les limites des techniques conventionnelles sont liées au fait que moins de 50% des examens microscopiques sont positifs dans les cas de tuberculose avérée, et que le délai de pousse des cultures est souvent long (3 à 6 semaines) sur les milieux solides, un peu plus court sur milieux liquides (15 jours). L'obtention d'un antibiogramme nécessite 2 à 4 semaines supplémentaires à partir de la détection d'une culture positive. Malheureusement, le contexte actuel de la tuberculose est marqué par l'émergence de la résistance aux antibiotiques, avec 400 000 cas de TB MDR et 50 000 cas de TB-XDR déclarés en 2015 [1].

Aussi, l'OMS, dans son plan de lutte contre la tuberculose, a fixé 2 objectifs majeurs : 1) réduire le délai diagnostique pour limiter le nombre de cas contact, et donc la dissémination du bacille 2) accélérer la détection de la résistance aux antituberculeux [1].

Le développement de méthodes moléculaires permettant le diagnostic de la résistance aux antituberculeux a permis de réduire considérablement le délai de détection de la résistance (quelques heures *versus* plusieurs semaines) [2]. Mais les performances diagnostiques de ces outils ne permettent pas pour le moment, de s'affranchir des techniques conventionnelles. Elles sont donc réalisées systématiquement en parallèle.

b. Place de l'analyse MTBDR*plus* dans la stratégie diagnostique

En décembre 2014, le Haut Conseil de la santé publique a émis une série de recommandations concernant le diagnostic et la prise en charge des tuberculoses à bacilles résistants (annexe 3)[3]. Il est indiqué que tout patient pour lequel au moins un des prélèvements a un résultat d'examen microscopique BAAR positif (M+), ou pour lequel l'examen microscopique est négatif (M-) mais la culture positive, doit bénéficier :

a) d'un test moléculaire : permettant de confirmer qu'il s'agit bien d'une mycobactérie du complexe *tuberculosis*, b) d'une recherche de mutations dans le gène *rpoB* conférant la résistance à la rifampicine. Cette recherche peut être utilement couplée à la recherche de mutations conférant la résistance à l'isoniazide. Le résultat de ces tests doit pouvoir être

disponible dans un délai de 72H, et c) en cas de résistance détectée par une méthode moléculaire ou phénotypique, il est recommandé d'adresser la souche sans délai au CNR-MyRma, chargé de réaliser les tests complémentaires.

La technique MTBDR*plus* est l'une des techniques actuellement disponibles qui permet de répondre à ces exigences. Cette analyse occupe donc une place centrale dans la stratégie diagnostique des TB-MDR, et représente une part importante de l'activité du CNR.

c. Principe de la technique MTBDR*plus*

Le test Génotype MTBDR*plus* est une technique de biologie moléculaire utilisable, dans sa version V2.0, sur des souches isolées de cultures en milieux solides ou liquides, mais aussi directement à partir de prélèvements respiratoires, positifs ou négatifs à l'examen microscopique[4].

La technique peut être réalisée en 1 à 2 jours

Il s'agit d'un coffret marqué CE, basé sur une amplification multiplexe, suivi d'une hybridation inverse sur bandelette, qui va permettre de répondre à plusieurs questions :

- présence ou absence d'une mycobactérie du complexe *tuberculosis* dans l'échantillon
-détection de la multirésistance par la détection de la résistance à 2 antituberculeux majeurs :

- la rifampicine
- l'isoniazide

Le principe repose sur l'amplification de fragments de ces 3 gènes (fragment du gène *rpoB* pour la rifampicine et fragments des gènes *katG* et du promoteur du gène *inhA* pour l'isoniazide), sur l'hybridation des amplicons avec des sondes qui correspondent aux fragments sauvages ou mutés de ces gènes présents sur la bandelette, et sur une révélation. L'échantillon, une souche obtenue sur milieu de culture solide, est soumis au préalable à une étape de préparation qui consiste a) à préparer une suspension de bacille dans de l'eau stérile qui est inactivée 15 min à 95°C en secteur L3, puis b) à réaliser l'extraction d'ADN proprement dite par choc thermique (15 min 95°C puis 1H à -20°C) en secteur de BM. Cette 2^{ème} phase constitue également une 2^{ème} inactivation de sécurité.

Figure 1. Principe de la technique MTBDRplus

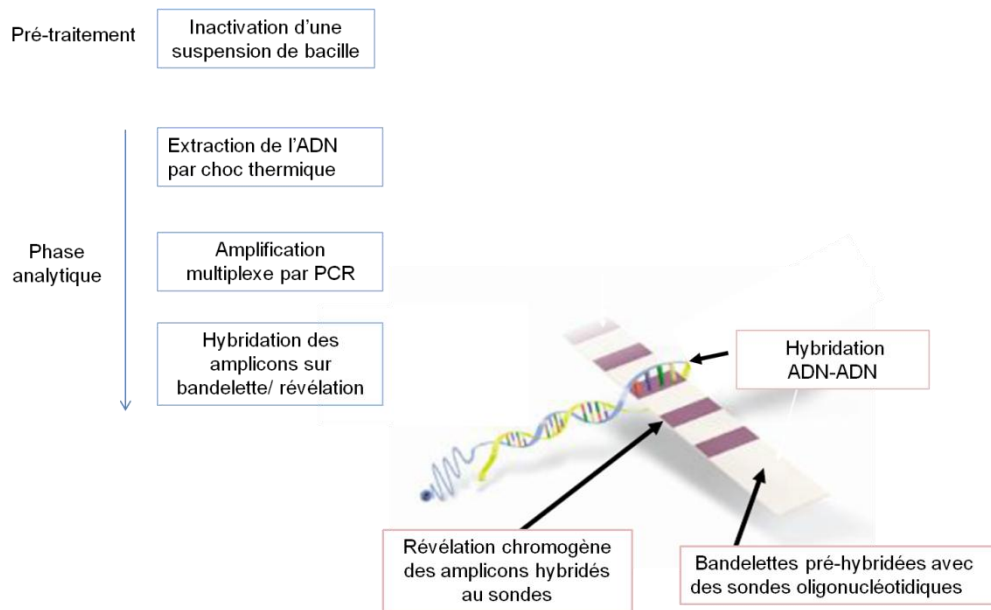
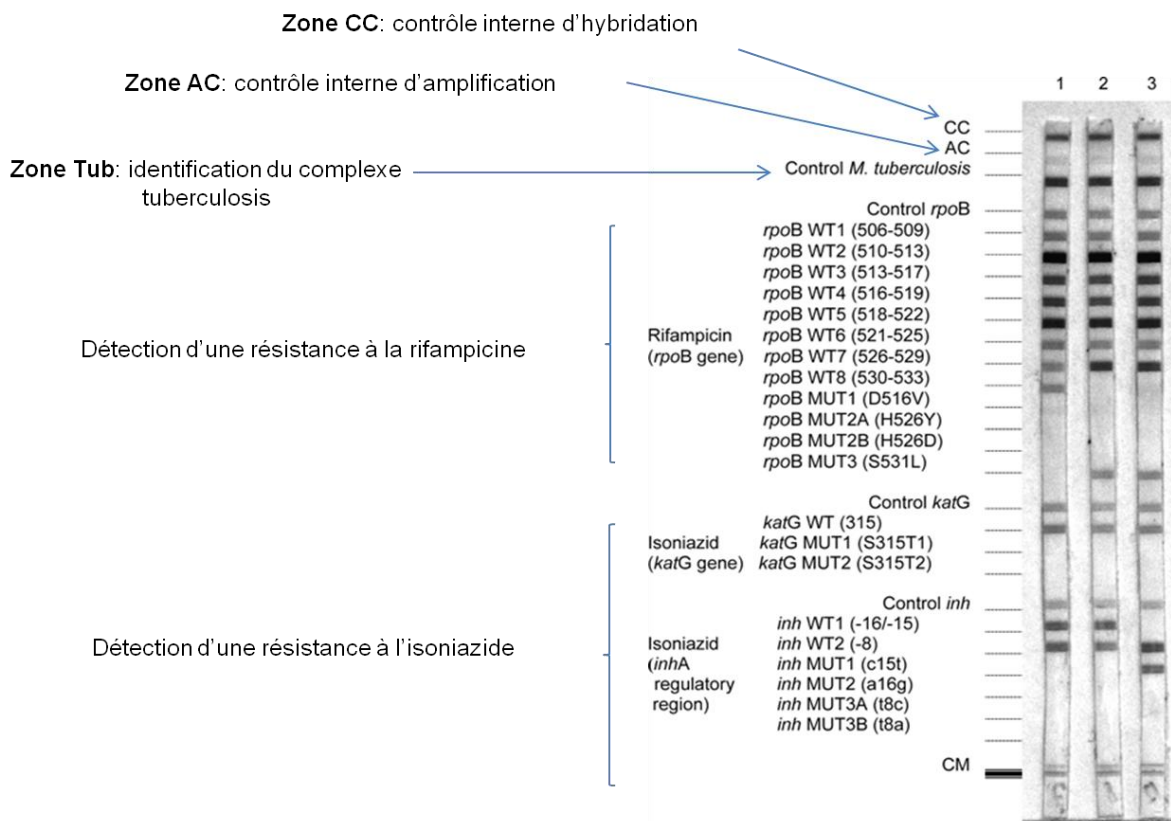


Figure 1. Exemple de résultats de bandelettes MTBDRplus



Interprétation des résultats (figure 2)

-zones AC et CC

Un résultat négatif valide se traduit par la présence des 2 bandes CC et AC uniquement. Une bande AC inexistante en cas de tests négatifs indique soit un problème dans la préparation ou la réalisation de la PCR, soit la présence d'inhibiteurs. Dans ce cas le test est

non valide et doit être recommencé. Dans le cas de tests positifs, la bande AC peut parfois présenter une intensité diminuée voire disparaître, due à des phénomènes de compétition lors de l'amplification. Dans ce cas, le test reste valide.

-zone TUB

Si la bande TUB est inexistante en l'absence d'un profil de résistance interprétable, l'échantillon ne contient pas de mycobactérie du complexe *tuberculosis*. Dans de rares cas la bande TUB peut être absente parallèlement au développement d'un profil de résistance évaluable. La présence d'une souche du complexe *tuberculosis* dans l'échantillon doit être alors fortement suspectée, et le test recommencé.

-zones des sondes sauvages et mutées

Les sondes sauvages (WT) comprennent les séquences non mutées de chaque région du gène impliqué dans la résistance. Lorsque toutes les sondes WT s'allument pour un gène donné, il n'y a pas de mutation détectée, la souche est sensible à priori à l'antibiotique correspondant. Tout profil déviant du profil sauvage indique la résistance de la souche testée. Les sondes mutées détectent quelques unes des mutations les plus fréquemment responsables de la résistance.

Les performances diagnostiques rapportées dans la littérature sont une spécificité de 96 à 100% pour la détection des mutations impliquées dans la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide, mais une sensibilité moins bonne notamment pour l'isoniazide, avec des valeurs variant entre 85% et 98%, et de 93% à 98% pour la rifampicine[5]

d. Historique de l'analyse « MTBDRplus » au CNR-MyRma

L'utilisation de la technique a débuté au laboratoire il y a plus de 10 ans, avec le test MTBDR[6] puis avec la version MTBDRplusV1.0 à partir de 2006. Cette version était applicable sur souches obtenues en culture et sur prélèvements respiratoires positifs à l'examen microscopique. Les performances de la technique V1.0 ont été testées au CNR et ont fait l'objet d'une publication[7]. En 2011, une nouvelle version, MTBDRplus V2.0, a été mise au point par le fournisseur : il s'agit d'une optimisation du kit V1.0 qui porte principalement sur une modification de la technique d'extraction d'ADN (Génolyse®). Cette nouveauté offre la possibilité d'appliquer la méthode sur le même type d'échantillons, avec en plus, les prélèvements respiratoires négatifs à l'examen direct. La sensibilité et la spécificité pour l'isoniazide et la rifampicine rapportées dans la littérature sont de 90% et 98%, et de 96% et 100% respectivement, pour les souches isolées en milieu de culture solide[5].

7. Particularités liées à la manipulation de souches de mycobactéries du complexe *tuberculosis*

La 1^{ère} particularité concerne la manipulation de souches appartenant au complexe *tuberculosis* : elle impose la réalisation du travail dans un laboratoire de confinement de niveau L3 et le respect de mesures de protection individuelle rigoureuses. Ceci permet d'atteindre le niveau de sécurité biologique requis en regard du pouvoir pathogène, et de prévenir une dissémination involontaire [8] [9]. C'est donc dans le secteur des mycobactéries qu'est réalisé le pré-traitement de l'échantillon, l'étape d'inactivation par la chaleur d'une suspension de germe. L'échantillon peut alors être transmis au secteur de BM, hors du L3, pour l'extraction d'ADN (choc thermique) et la réalisation de l'analyse. La 2^{ème} particularité concerne la manipulation de souches de TB-XDR, qui relève de la législation des MOT [9]. A ce titre, l'organisation du travail intègre le principe de sûreté biologique pour prévenir une possibilité de dissémination volontaire : accès restreints aux souches, soumis à autorisation (ANSM), conditions spécifiques de stockage et de conservation.

II. Objectifs et calendrier du projet 2016

L'objectif de ce travail était de vérifier que les performances de la méthode sont bien conformes à celles mentionnées par le fabricant, via la constitution d'un dossier de vérification de méthode pour le test MTBDR*plus* sur la matrice « souches isolées en milieu de culture solide ». Ce travail a été abordé en utilisant la méthode PDCA (plan, do, check, act)

Février : Etat des lieux du processus «MTBDR*plus*» : recensement des ressources existantes: établissement d'une liste du matériel et des réactifs utilisés, bilan documentaire (documents existants, documents externes), bilan des CIQ/EEQ, modalités de formalisation des compétences du personnel, choix de la portée d'accréditation de l'analyse MTBDR*plus*

Mars-avril : analyse de risques concernant la partie « analytique » MTBDR*plus*, AMDEC, élaboration d'un plan d'actions, construction d'un modèle de dossier « d'habilitation et maintien des compétences » pour les techniciens du secteur de BM, mise à jour des documents qualité reliés à l'analyse, mise en place de la traçabilité des réactifs, rédaction d'une procédure de gestion du CQI, évaluation des besoins en métrologie

Mai : rédaction d'une procédure de vérification de méthode pour l'analyse MTBDR*plus*, et validation par les biologistes responsables en réunion qualité

Juin : début de la mise en place de la surveillance métrologique du matériel critique

Juillet : vérification technique

Août : analyse des résultats; bilan des actions menées

Septembre : mise en place du CIQ

III. Rédaction d'un dossier de vérification de méthode pour l'analyse MTBDR*plus*

1. Etat des lieux

a. Liste des besoins en matériels et en réactifs

Les réactifs et solvants nécessaires sont listés dans la notice fournie par le fabricant (annexe4) [4].

Les fiches de données de sécurité sont disponibles dans le réseau partagé NAS-41, dossier partagé, MTBDR*plus*. Ce réseau a été mis à disposition par le pôle et permet un stockage sécurisé des données.

b. Bilan documentaire

Concernant l'analyse MTBDR*plus*, 17 documents (dont certains sont transversaux dans le secteur de BM) ont été mis à jour, ou rédigés (annexe 5). Ils sont en attente de vérification et approbation dans le circuit de relecture interne, et sont disponibles dans le réseau partagé NAS-41, dossier MTBDR*plus*, avant leur mise à disposition dans notre logiciel de gestion documentaire KALILAB.

c. Modalités de formalisation des compétences du personnel

Pour la réalisation de cette analyse, les techniciens de 2 secteurs spécialisés BM et MycoB sont impliqués. Tous ont une expérience d'au moins 2 ans d'occupation des postes dans leur secteur respectif.

Pour ceux du secteur MycoB, un dossier « papier » comprenant une grille d'habilitation initiale pour l'ensemble des activités du secteur, un « parcours de formation d'un nouveau technicien », et un « cahier des charges hebdomadaires » existaient. Trois documents identiques ont été rédigés pour ceux du secteur de BM, ainsi qu'un pool de questions qui serviront à la constitution de quizz pour les habilitations initiales ou le maintien des compétences des techniciens BM. Les preuves seront apportées par le relevé des numéros de dossiers des analyses réalisées par le personnel en formation, ainsi que par les réponses au quizz (exigence de la norme NF EN ISO 15189 § 5.1.6).

Concernant le maintien des compétences du PNM, la fréquence de réévaluation a été fixée par la cellule qualité du pôle, tous les 2 ans. Nous avons choisi 3 critères : la participation aux EEQ, pas d'absence supérieure à 6 mois dans le secteur, une évaluation des acquis grâce à un quizz. L'absence d'une gestion informatisée des plannings ne permet pas à ce jour de déterminer de façon rapide et fiable le taux d'occupation des postes. Concernant les

dossiers d'habilitation des biologistes du secteur de BM, une grille d'habilitation a été remplie. Leurs dossiers devront être complétés afin de rassembler les mêmes pièces justificatives nécessaires. L'ensemble de ces documents est en attente de vérification et approbation. Ils sont disponibles dans le NAS-41, dossier MTBDR $plus$. Les formations suivies par le personnel non médical sont tracées par la cadre du service en fichier excell (exigence de la norme NF EN ISO 15189 § 5.1.8) ; celles du PM sont également gérées de la même façon (PR gestion PM PXA-PG-010, et PXA-PG-036).

2. Analyse de risques

La technique MTBDR $plus$ est une méthode qualitative qui fournit des résultats de type « présence/absence » sans aucune valeur chiffrée. L'analyse de risque est donc importante puisqu'elle permet de mettre en évidence les points critiques qui devront être maîtrisés pour limiter les facteurs d'incertitudes susceptibles d'influencer les résultats. Nous avons réalisé cette analyse selon la méthode d'Ishikawa (5M) avec les techniciens des 2 secteurs impliqués, puis avec les biologistes au cours de 2 réunions distinctes (figure 3, tableau 1).

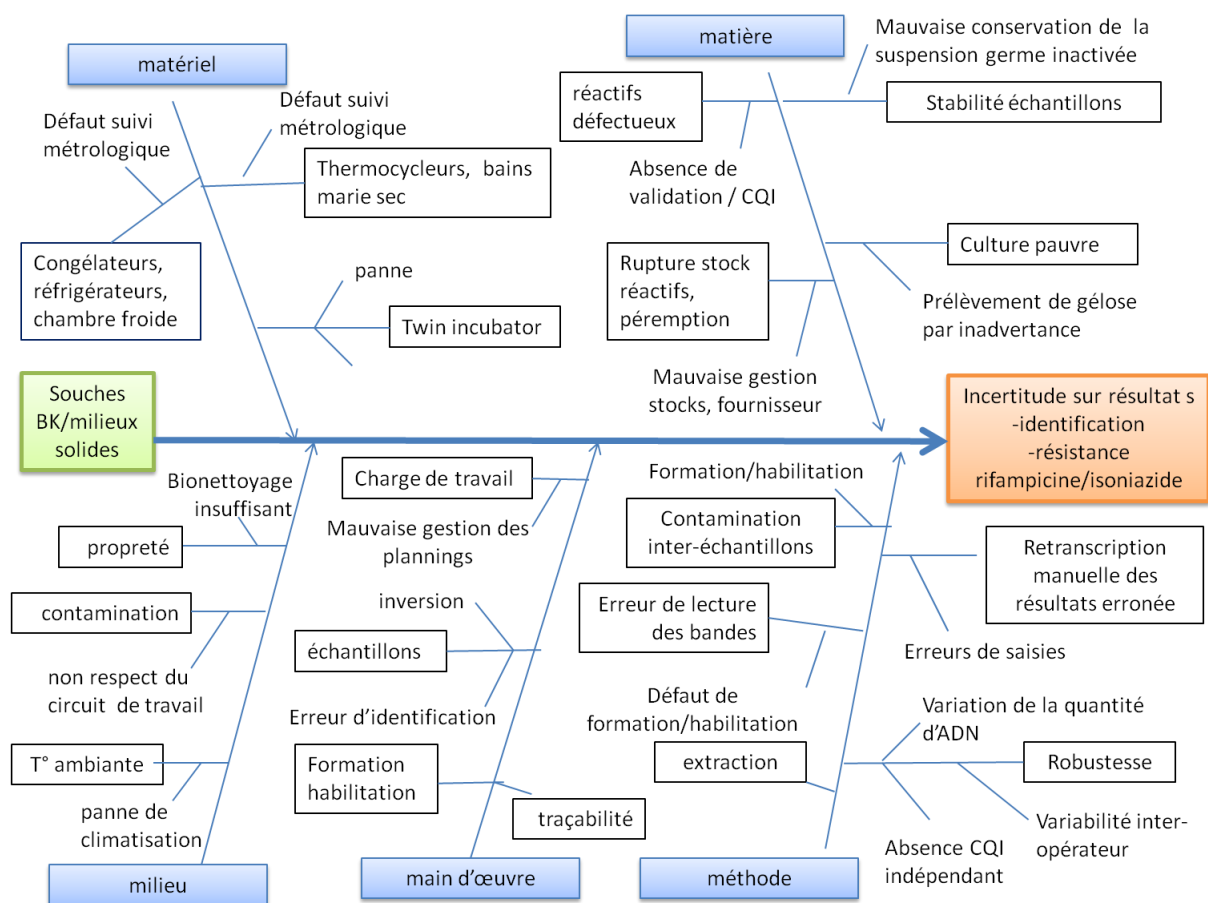


Figure 3. Diagramme d'Ishikawa: analyse de risques de la phase analytique de MTBDR $plus$

Tableau 1. Analyse de risque pour l'analyse MTBDRplus

Description de la méthode		
Types de risques concernant	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
l'échantillon	<ul style="list-style-type: none"> -souches de mycobactéries du complexe <i>tuberculosis</i> cultivées sur milieu solides (Lowenstein-jensen ou coletsos) pour la préparation d'une suspension de germe inactivée - sécurité personnel -quantité suffisante pour obtenir un résultat interprétable : 1 colonie -conservation de la suspension inactivée : -20°C avant analyse, jusqu'à 7jours 	<ul style="list-style-type: none"> -MO INACT CTH -Formation/ habilitation -étude d'inactivation : PXC-EN-069 -annexe 10: influence de la quantité d'échantillon prélevé -annexe 11: influence de la conservation des suspensions -20°C -suivi métrologique du congélateur 89CG43, du BMS n°201416551
Préparation de l'échantillon : choix de la technique d'extraction d'ADN sur les suspensions de germe inactivé	-qualité de l'ADN extrait	<ul style="list-style-type: none"> - MO EXT CT -bibliographie I[10] - suivi métrologique du BMS n° : J10522016 -annexe 12 : influence de la conservation des extraits à +4°C
Main d'œuvre		
Maîtrise des techniques	<ul style="list-style-type: none"> -biologistes et techniciens habilités -inversion d'échantillons -erreur d'identification 	Enregistrement maintien des compétences et docs associés, grill d'habilitation, preuves, fiche de poste
Charge de travail	-techniciens : surcharge de travail	-gestion des plannings
Traçabilité	-pas d'identification du technicien en cas de problème résultat	- parape sur la feuille de demande/ travail des techniciens des 2 secteurs
Milieu		
Thermocycleurs, Twin incubator	mauvais fonctionnement : T°ambiante trop élevée	-climatisation à 22°C T° ambiante de fonctionnement : 15°C < T° < 32°C
-résultats erronés par contamination	<ul style="list-style-type: none"> -respect du circuit de travail en secteur BM -bionettoyage 	<ul style="list-style-type: none"> -PR CIRC BM -formation habilitation - décontamination (Gigapur DNA Dekonta off, shimitek)
Matériel		
Thermocycleurs, Twin incubator	<ul style="list-style-type: none"> - dérive des températures -détérioration des performances de la méthode 	<ul style="list-style-type: none"> -qualification installation -cahiers de vie -maintenances internes -suivi métrologique des thermocycleurs -calibration annuel du Twin / Biocentric (accrédité Dakks)
Pipettes	-dérive trop importante des	- non critique

	volumes prélevés -détérioration des performances de la méthode	-calibration annuelle par le biomédical de l'établissement
Congélateurs, réfrigérateurs, chambre froide, BMS	-mauvaise conservation des réactifs, des échantillons -détérioration des performances de la méthode	-Suivi métrologique
Matière		
-kit MTBDR _{plus} -eau stérile Biomérieux -rupture de stock/péremption	Réactifs défectueux -retard délai rendu des résultats/ périmés -rupture fournisseur	Contrôle par CIQ/EEQ des n° lots -PR gestion CIQ -PR gestion EEQ Marquage CE MTBDR _{plus} Procédure de gestion des stocks -déclaration comme fournisseur critique
Méthode		
culture pauvre	-variation de la quantité d'ADN dans l'extrait	annexe 10 : encadrement de la quantité d'ADN -annexe 12
retranscription résultats	Erreur de retranscription manuelle dans le logiciel de gestion des résultats	double vérification : des résultats saisis PR SAIS BM
Vérification analytique des résultats	erreur d'interprétation techniciens et biologistes :	-formation habilitation Procédure de vérification analytique : PR VF MTBDR _{plus}

Le diagramme d'Ishikawa, puis le tableau 1, ont été réalisés en s'appuyant sur les items de l'analyse de risque du SH FORM43 dans un 1^{er} temps.

Nous avons également réalisé une analyse des modes de défaillances, de leurs effets et de leur criticité (méthode AMDEC) selon une procédure mise à disposition par la cellule qualité du pôle (annexe 6), ceci pour avoir une analyse plus fines des risques potentiels et des moyens de maîtrise.

Processus concerné	Etape	Dysfonctionnement-défaillance avéré ou potentiel	Risque	Fréquence	Gravité	Criticité potentielle= F*G	Cotation criticité potentielle	Moyens existants de maîtrise du risque	Niveau de maîtrise du risque	Criticité résiduelle	Cotation Criticité résiduelle
Réaliser examens / Pré analytique	Prétraiter échantillon avant analyse	Erreur d'aliquotage d'un échantillon/ inversion d'échantillon lors du dépôt d'ADN pour la PCR (tk manuelle)	résultat erroné	3	6	18	2	Formation - habilitation personnels --modes opératoires formalisés- traçabilité aliquotage, confrontation résultats phénotypiques	0,25	0,5	1
Réaliser examens / Pré analytique	Prétraiter échantillon avant analyse	Non respect des modalités de l'extraction et de l'inactivation	risque pour le personnel, risque de résultat erroné	3	6	18	2	Formation - habilitation personnels-modalités de préparation formalisées disponibles au poste de travail-étude d'inactivation	0,25	0,5	1
Réaliser examens / analytique	Analyser l'échantillon	Dérives des températures BMS, thermocycleurs, twin incubator)	résultat erroné, altération des performances de la méthode	3	6	18	2	pas de CQI indépendant du kit, absence maintenances internes tracées et suivies- Maintenances fournisseurs, comparaison aux résultats phénotypiques	0,4	0,8	2
Réaliser examens / analytique	Analyser l'échantillon	Réactifs défectueux, périmés	résultats erronés	2	6	12	2	pas de CQI indépendant du kit mis en place réactovigilance, gestion des stocks	0,4	0,8	2
Réaliser examens / analytique	Analyser l'échantillon	Erreur de transcription d'un résultat en saisie manuelle	résultat erroné	3	6	18	2	Formation - habilitation personnels- PR de vérification des saisies manuelles appliquée non formalisée, vérification validation biologique	0,4	0,8	2
Réaliser examens	Analyser l'échantillon	EEQ non conformes	existence d'un problème dans le processus analytique	3	6	18	2	pas de Suivi à long terme des EEQ avec retour des résultats à l'équipe, procédure de gestion non formalisée- étude d'impact	0,4	0,8	2
Réaliser examens / analytique	Valider techniquement	Non respect des conditions de validation technique	résultats erronés	3	6	18	2	Formation - habilitation personnel- PR VF MTBDRplus-validation biologique	0,25	0,5	1

Gérer équipements	Toutes les étapes	Mauvaise utilisation BMS, Thermocycleurs, twin incubator	résultats erronés	2	4	8	2	Formation-habilitation du personnel-suivi contrôles	0,25	0,5	1
Gérer équipements	phase analytique	Panne matériel: thermocycleur	impossibilité de réaliser l'analyse	2	6	12	2	Utilisation matériel back up (4 autres thermocycleurs utilisables)	0,25	0,5	1
Gérer équipements	Prétraiter échantillon avant analyse	Panne matériel: BMS BK	impossibilité de réaliser l'inactivation souche	2	6	12	2	BMS back up dans secteur MycoB en commande, à cartographier	0,4	0,8	2
Gérer équipements	Prétraiter échantillon avant analyse	panne matériel: BMS BM	impossibilité de réaliser l'analyse	2	6	12	2	2ème BMS BM en back up non cartographié	0,4	0,8	2
Gérer équipements	phase analytique	Panne matériel twin incubator	impossibilité réaliser l'analyse	2	6	12	2	contrat de maintenance annuelle, possibilité de prêt d'un automate par le fournisseur non formalisée	0,4	0,8	2
Gérer équipements	prétraitement échantillon, phase analytique	Matériel mal entretenu: thermocycleurs, twin incubator, BMS: défaut maintenance	altération des performances du matériel	2	4	8	2	Personnel formé habilité- Suivi planning maintenances internes et fournisseurs	0,25	0,5	1
Gérer équipements	prétraitement échantillon, phase analytique	absence de suivi métrologique thermocycleurs, BMS, twin incubator	Altération des performances du matériel/méthode	3	2	6	2	Contrôles de qualité interne à chaque réaction/ comparaison aux résultats phénotypiques	0,8	1,6	2
Gérer équipements	Toutes les étapes	absence de suivi métrologique congélateurs, réfrigérateurs, chambre froide	mauvaises conditions de conservation des réactifs, des échantillons	3	2	6	2	Contrôles de qualité interne à chaque réaction/ comparaison résultats phénotypiques	0,8	1,6	2
Gérer environnement de travail	Toutes les étapes	inactivation des suspensions inefficace	mise en danger du personnel	2	6	12	2	Risques identifiés affichés, mise à disposition des équipements de protection individuels, contrôle des installations, cloisonnement des activités incompatibles, accès aux zones techniques contrôlé, registre des visiteurs, étude d'inactivation : PXC-EN-069	0,25	0,5	1

Gérer environnement de travail	Toutes les étapes	Méconnaissance des risques	mise en danger du personnel	1	4	8	2	Formations des nouveaux personnels à l'hygiène, Risques identifiés affichés	0,25	0,5	1
Gérer environnement de travail	Toutes les étapes	Non respect des circuits d'élimination des déchets	danger pour le personnel traitant l'enlèvement et la destruction des déchets	2	2	4	1	Affiche "tri des déchets" formalisée affichée dans les laboratoires et dans le manuel de prélèvement	0,25	0,25	1
Gérer environnement de travail	Toutes les étapes	Non respect des circuits de travail en BM	contamination de l'environnement par des amplicons, et par conséquent des réactions/échantillons	2	2	4	1	Formation-habilitation personnel, PR de circulation entre les pièces pour le travail en BM	0,25	0,25	1
Gérer environnement de travail	phase analytique	T° des pièces PCR et post PCR trop élevée	altération performances thermocycleurs	3	2	6	2	climatisation des 2 pièces	0,25	0,5	1
Gérer les ressources humaines	Toutes les étapes	Manque personnel/ charge de travail	surcharge de travail, erreur dans les résultats	4	2	8	2	Définition des effectifs minimum-mise en adéquation des ressources disponibles en fonction de l'activité	0,25	0,5	1
Gérer les ressources humaines	Toutes les étapes	Défaut de compétence des personnels	erreur de réalisation technique, erreurs résultats	2	2	4	1	Formations-habilitations et suivi du maintien des compétences	0,4	0,4	1
Gérer les achats	Toutes les étapes	Rupture de stock (labo-fournisseur)	stock de kit insuffisant pour assurer le volume des analyses	2	6	12	2	Suivi stocks, analyse des consommations,- identification comme fournisseur critique	0,25	0,5	1
Gérer les achats	Toutes les étapes	Livraison non conforme à la commande	stock de kit insuffisant pour assurer le volume des analyses	2	4	8	2	Vérification des livraisons- Formalisation de fiches qualité en cas de non-conformité	0,25	0,5	1

T° : température

Le but de la méthode AMDEC est de hiérarchiser les actions d'amélioration à mener pour le processus étudié. A l'issue de cette analyse, aucun risque très élevé n'a pu être identifié. La mise en place d'un CIQ indépendant du coffret, et la cartographie des équipements critiques (enceintes froides, BMS, thermocycleurs) ainsi que leur suivi métrologique sont 2 axes d'amélioration qui permettent d'agir sur la moitié des risques modérés identifiés.

3. Traçabilité des réactifs

Nous avons réalisé la mise en place de la traçabilité des réactifs comme suit :

- 1) pour la préparation d'une suspension de germe inactivée : le n° de lot de l'eau stérile utilisée est noté dans le cahier de transmission entre les 2 secteurs MycoB/BM, pour chaque série préparée par le technicien du secteur des mycobactéries.
- 2) pour l'analyse MTBDR*plus* : pour le coffret MTBDR*plus*, le n° de lot est noté dans le cahier des témoins négatifs (1 témoin réalisé par série)

4. Mise en place du CQI MTBDR*plus* et gestion des EEQ

a. CQI

Depuis le début de l'utilisation de la technique MTBDR*plus* au laboratoire, les recommandations du fournisseur concernant les contrôles à mettre en oeuvre pour chaque série ont été respectées : un témoin négatif est réalisé (échantillon d'eau stérile qui a subi le même processus qu'une suspension de bactéries) dans chaque série. Il permet de repérer les éventuels problèmes de contamination. Il n'est pas recommandé d'utiliser un témoin positif dans chaque série, car des contrôles internes d'amplification (CA), d'hybridation (CC), et d'amplification de chacun des gènes testés sont intégrés dans chaque bandelette.

La mise en place d'un CQI indépendant du coffret a pour objectif de vérifier la fiabilité des réactifs, la robustesse de la méthode sur le long terme, le bon fonctionnement des équipements et la reproductibilité des techniques. Nous nous sommes appuyés sur le guide SH GTA 06 publié par le COFRAC.

Stratégie de mise en place du CQI et choix des souches

Deux autres coffrets reprenant la même technique mais ciblant d'autres gènes, sont actuellement utilisés au laboratoire. Il s'agit des tests MTBDR*s*/ pour le dépistage de la multirésistance (détermination de la sensibilité moléculaire aux fluoroquinolones, aux aminosides, à l'éthambutol) et MTBC (identification de l'espèce au sein du complexe *tuberculosis*). Compte tenu du coût des tests, et du temps technicien requis, nous avons souhaité optimiser la mise en place du CQI pour MTBDR*plus*, en faisant le choix de planifier un contrôle de qualité commun aux 3 coffrets.

Nous avons exclu la possibilité d'utiliser des souches multi-résistantes ou ultra-résistantes afin de respecter la législation relative à la manipulation d'agents pathogènes du groupe 3, et

celle des MOT[8][9] (voir § 7), et cela bien que la norme NF EN ISO 15189 (§5.6.2) recommande l'utilisation de plusieurs « niveaux de contrôle » pertinents. Une autre possibilité pour tester des souches présentant les mutations correspondant à chaque gène testé, aurait été l'utilisation de souches ATCC mono-résistantes, qui ne rentrent plus dans la définition des souches MDR et XDR. Cependant, cela impliquerait de passer 5 souches mono-résistantes à chaque CQI, soit 20 bandelettes pour tester les 4 thermocycleurs. Sans compter le prix des souches ATCC, mais ne permettrait pas de tester l'ensemble des sondes mutées présentes sur les bandelettes. Par souci de simplicité, de cohérence, et d'économie en termes de réactifs et de temps technicien, nous avons donc arrêté notre choix à une souche sensible.

Pour tester les 3 coffrets, c'est la souche de référence H37RV ATCC 27294 multi-sensible, qui sera utilisée. Un argument supplémentaire nous permettant de justifier la possibilité de se limiter à cette souche sensible, est lié au fait que pour chaque souche clinique isolée, un antibiogramme phénotypique (technique de référence) permet de tester l'ensemble de ces résistances. Toute discordance de résultat entre la technique moléculaire et phénotypique serait détectée à l'antibiogramme, et induirait des vérifications.

Fréquence de passage du CQI

La fréquence de passage du CQI a été déterminée à partir de la rotation des numéros de lots des 3 coffrets. En procédant aux commandes tous les 2 mois pour chacun, et en demandant le même numéro de lot dans la commande, nous avons déterminé qu'un passage mensuel couvrirait l'ensemble des n° de lots des réactifs. Le CQI sera testé en rotation sur chacun des thermocycleurs. Il sera également programmé après une maintenance ou résolution d'une panne machine.

Exploitation des résultats

Après validation par le biologiste en charge du secteur, les feuilles de travail seront archivées dans un classeur dédié. En cas de non-conformité, une fiche qualité sera rédigée, avec une analyse des causes, et une étude d'impact. Les résultats seront revus annuellement, par le suivi du % de CQI acceptés.

Les modalités de gestion de ce contrôle sont décrites dans la procédure PR GEST CQI BM Sa mise en œuvre débutera à l'automne 2016.

b. EEQ

Le CNR-MyRma participe à un programme d'évaluation externe de la qualité depuis plus de 5 ans (n° de participant : 32245), organisé dans le cadre du réseau européen de l'ECDC ERLNET-TB par la société Instand (Dusseldorf, Allemagne), accréditée par le Dakks, équivalent allemand du COFRAC et qui répond aux exigences de la même norme. Ce programme permet de contrôler les différentes étapes du diagnostic de la tuberculose,

notamment les tests d'amplification génique et de détection moléculaire de la résistance. Il est reçu annuellement et se décline sous la forme de 5 items, dont l'un concerne les méthodes moléculaires de détection de la sensibilité/résistance des souches de BK. Un certificat d'aptitude à la réalisation des analyses correspondant à chaque item est rendu aux participants lorsque le taux de bonnes réponses est supérieur à 80%. Notre laboratoire a obtenu le certificat d'aptitude pour les méthodes moléculaires pour tous EEQ reçus au cours des 5 dernières années. Afin de formaliser la gestion de cet EEQ, nous avons complété la procédure de gestion des EEQ interne au laboratoire, avec les données concernant ce programme (PXC-MO-055).

5. Choix de la portée d'accréditation

L'analyse sera présentée en portée A, avec un dossier de vérification de méthode, visant à s'assurer que les performances annoncées sont atteintes dans les conditions de travail. Dans le document SH INF 50, l'analyse appartient au sous domaine microbiologie, sous famille bactériologie (BACTH), ligne de portée BA8.

La technique *MTBDRplus* est une méthode qualitative (réponse de type présence/absence) Le coffret utilisé est marqué CE. C'est une méthode manuelle, dont les résultats sont soumis à une lecture interprétative. Elle est appliquée selon les recommandations du fournisseur au laboratoire. La seule variation concerne la technique d'extraction d'ADN sur souches obtenues sur culture solide, mais pour laquelle, nous avons obtenu confirmation de la part du fabricant, que la technique utilisée (choc thermique) n'affectait pas les performances annoncées (annexe 7). Avec la précédente version du coffret (*MTBDRplus* V1.0) toute méthode d'extraction produisant de l'ADN pouvant être amplifié (ex : choc thermique) était utilisable. Cette méthode permet d'obtenir un extrait brut d'ADN homogène, avec un bon rendement en termes de quantité. Ces conditions sont suffisantes pour l'obtention de résultats satisfaisants avec les méthodes de PCR servant à l'identification de mutations dans certaines régions du génôme [10] De plus, contrairement à la méthode fournisseur (Génolyse®), la technique « choc thermique » ne nécessite pas de centrifugation des germes mis en suspensions. Ceci limite le risque d'aérosolisation pour la sécurité du personnel.

Un protocole de vérification analytique (PR VF *MTBDRplus*) a été rédigé selon les recommandations de la norme NF EN ISO 15189 (§ 5.5.1) en s'appuyant sur le SH GTA 01 et le SH GTA 04, et présenté aux techniciens des 2 secteurs concernés en réunion de service. Ce protocole avec les résultats en annexe, est archivé dans le réseau partagé NAS41. Pour une méthode qualitative, les items 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 sont à renseigner à minima dans le SH FORM 43. Les items 8 (étendue de mesure) et 13 (intervalle de référence) sont non applicables pour cette méthode (qualitative) et sur cette matrice.

6. Essais sur site

Les essais sont présentés ci-dessous dans l'ordre dans lesquels ils ont été réalisés.

a. Contamination inter-échantillon (item 11)

S'agissant d'une méthode de biologie moléculaire, ce paramètre sensible a fait l'objet d'une vérification sur site et a été testé sur 1 série de 12 échantillons, en alternant 1 échantillon positif (suspension de souche de référence sensible H37RV) et 1 échantillon négatif (eau stérile), de la phase d'inactivation jusqu'à la phase d'hybridation.

L'objectif de l'essai, l'absence de contamination inter-échantillon, a été atteint. Les résultats sont présentés en annexe 8. Le gage de l'absence de contamination repose ici sur la formation du personnel à la bonne réalisation de la technique, ainsi que sur le respect du circuit de travail dans le secteur de BM (PR CIRC BM).

b. Variabilité inter-opérateur (item 3)

S'agissant d'une méthode manuelle, l'influence du changement d'opérateur sur les résultats a été évaluée sur une série de 4 tests comprenant un témoin négatif (eau stérile) et 2 souches cliniques de patients BK11 et BK26 (caractérisées auparavant par le CNR, annexe 14), ainsi que la souche de référence H37RV. Cette série de souches a été analysée 9 fois avec des opérateurs différents comme décrit dans les 2 tableaux ci-dessous (tableaux 2 et 3). Ceci a permis de tester de manière indépendante la variabilité liée à l'opérateur des deux secteurs concernés.

Tableau 2 et 3. Plan des manipulations réalisées pour la variabilité inter-opérateur

manipulation 1	30/06/16	01/07/16	04/07/16	05/07/16
Technicien BK	MB	MB	MB	MB
Technicien BM	MG	LG	SW	OSE
Thermocycleur	Icyler	Icyler	Icyler	GenAmp

manipulation 2	19/07/16	19/07/16	20/07/16	21/07/16	25/07/17
Technicien BK	SR	SG	CV	DM	MB
Technicien BM	LG	LG	LG	LG	LG
Thermocycleurs	DNAengine	GenAmp	GenAmp	GenAmp	Chromo4

L'objectif de l'essai a été atteint avec des résultats identiques pour chaque souche d'une série à l'autre (annexe 9).

c. Corrélation entre les 4 thermocycleurs

S'agissant d'une méthode qualitative, il nous était impossible d'évaluer la corrélation des résultats obtenus entre les 4 thermocycleurs par des méthodes statistiques. Cependant, la comparaison des résultats des séries de 4 échantillons analysées le 04/07, le 05/07, le

19/07, et le 25/07, donne des résultats identiques quel que soit l'appareil. Nous avons donc conclu à une corrélation satisfaisante des résultats entre les 4 thermocycleurs (tableaux 2 et 3, annexe 9).

d. Répétabilité-reproductibilité (item 1 et 2)

La répétabilité a été évaluée au cours de l'essai de contamination inter-échantillon, sur 6 échantillons de la souche H37RV. Bien que nous ayons testé un petit nombre d'échantillons (n=6) les résultats sont identiques, la répétabilité semble donc satisfaisante (annexes 8 et 9). La reproductibilité a été évaluée grâce à l'essai de variabilité inter opérateur, avec 3 souches, analysées 9 fois chacune. La technique présente également une reproductibilité satisfaisante puisque les résultats des 9 passages pour chaque souche sont identiques.

e. Stabilité des réactifs (item 12)

Selon les recommandations du fournisseur, il est préférable d'éviter les cycles de décongélation/recongélation des réactifs utilisés pour l'étape de PCR (kit 2). Du fait de l'organisation du travail dans notre laboratoire, et parfois de l'urgence à réaliser cet examen, jusqu'à 2 petites séries de tests peuvent être lancées chaque jour. Ainsi, on peut estimer à 6 le nombre maximum de cycles de décongélation/recongélation subis par un coffret de réactif contenant 12 réactions. Afin de vérifier que ceci n'a pas d'impact majeur sur la qualité des résultats, 1 extrait d'ADN de la souche H37RV a été utilisé pour la réalisation du test, à l'ouverture d'un coffret neuf (J1), et après 6 cycles de décongélation (30 min à T° ambiante) recongélation à -20°C (J3).

Ces cycles ont été réalisés 2 fois par jour (milieu de matinée, début d'après-midi) 3 jours consécutifs pour se placer dans des conditions les plus proches possible de la réalité.

L'objectif : a été atteint puisque nous avons obtenu des résultats identiques, à l'ouverture du coffret et après la 6^{ème} décongélation (annexe 12).

Les réactifs du kit 1 sont conservés selon les recommandations du fabricant entre 2 et 8°C.

f. Facteurs de variabilité

- **variation de la quantité de souche prélevée**

La quantité d'ADN obtenue à l'issue de la phase d'extraction est dépendante du nombre de colonies mises en suspension dans l'eau lors de la phase d'inactivation. Les colonies sont prélevées sur les milieux de culture solides, à l'aide d'une oëse de 10µl lorsque la culture est suffisamment riche, ou avec une oëse de 1µl lorsqu'elle est pauvre. Un test MTBDR*plus* a été réalisé sur 2 suspensions de la souche de référence H37RV, correspondant à la plus petite quantité prélevable (1 colonie de la taille d'une tête d'épingle prélevée à l'oëse de 1 µl), et à une grande quantité (volume équivalent à une demi oëse de 10 µl). Le but était d'évaluer l'impact des variations maximum de la quantité de matériel prélevé, sur les

résultats : une trop petite quantité pouvant donner un résultat ininterprétable, une trop grande un risque d'inhibition de la PCR. L'objectif de l'essai, qui était de vérifier qu'avec ces 2 quantités d'échantillon les résultats étaient identiques, a été atteint (annexe 10).

- **variation des conditions de conservation de l'échantillon**

Dans la notice fournisseur, aucune précision n'est donnée concernant les modalités de conservation des échantillons obtenus à partir de souches en culture. Pour des questions organisationnelles, nous sommes parfois amenés à congeler les suspensions de bactéries inactivées avant traitement dans le L3 (7 jours maximum). De même, les extraits d'ADN sont conservés à 4°C pendant une semaine, pour une éventuelle vérification si nécessaire. Ils sont ensuite congelés à -40°C et conservés un an. Nous avons donc évalué l'impact de ces 2 modalités de conservation. Dans le 1^{er} cas (a), la souche H37RV a été utilisée pour la réalisation de 2 suspensions de germe inactivé : l'une a été transmise le jour même au secteur de BM; la 2^{ème} a été placée en parallèle au congélateur à -20°C pour une durée de 7 jours, à l'issue de laquelle elle a subi le même traitement. Dans le 2^{ème} cas (b), l'extrait d'ADN obtenu sur la suspension fraîche de H37RV a été conservé 7 jours à 4°C puis a été utilisé pour la réalisation du test.

L'objectif de cet essai a été atteint, puisque les résultats obtenus sont identiques avec ou sans période de congélation de la suspension, et sur extrait d'ADN frais ou conservé une semaine à 4°C (annexe 11 et 12).

g. Robustesse de la méthode (item 12)

La robustesse peut être appréciée par le suivi de plusieurs paramètres, à court terme par exemple, avec les résultats de la variabilité inter-opérateur, l'absence d'impact des facteurs de variabilité potentiels testés précédemment (§6.e). L'expérience de l'utilisation de la technique depuis de nombreuses années nous permet de penser que la méthode est robuste, mais ceci ne pourra être confirmé qu'à moyen et long termes par le suivi des résultats des CQI, l'absence d'effet de bord dans les thermocycleurs lors des variations de leur positionnement dans les puits.

h. Interférences (item 10)

Pour la matrice « souche isolée en culture sur milieu solide », les seules sources d'interférences possibles seraient des composés provenant du milieu de culture ; des fragments de gélose prélevés accidentellement ou lorsque les colonies sont petites et peu nombreuses. Selon les données fabricant, les composés provenant des milieux de culture n'auraient pas d'impact sur les résultats, ceci avec la méthode d'extraction Génolyse®. Nous avons donc testé l'impact de la présence de fragments de gélose (milieu coletsos) sur les résultats, en utilisant notre technique d'extraction (choc thermique). L'essai, réalisé avec

une souche H37RV, en présence et en l'absence de gélose coletsos dans la suspension initiale, a montré que ce facteur n'avait pas d'impact sur les résultats (annexe 12).

En routine, les prélèvements ou souches sont ensemencés sur 2 types de milieux : coletsos et Lowenstein-Jensen(LJ). Le milieu coletsos contient les mêmes composants que le LJ, mais avec quelques éléments supplémentaires (tableau 4). Nous n'avons donc testé que le 1er pour les interférences en émettant l'hypothèse qu'en l'absence d'interférences pour le milieu coletsos il n'y en aurait pas pour le LJ.

Tableau 4. Composition des milieux Lowenstein-Jensen et Coletsos

Composants	Lowenstein-Jensen	Coletsos
Fécule de pomme de terre	+	+
Glycérol	+	+
Œuf entier	+	+
Jaune d'œuf seul	-	+
Phosphate monopotassique	+	+
Phosphate de magnésium	+	+
Citrate de magnésium	+	+
L-asparagine	+	+
Vert de malachite	+	+
Peptone de gélatine	-	+
Solution oligodynamique de Berthelot	-	+
Pyruvate de sodium	-	+
Glutamate de sodium	-	+
Bleu de tournesol	-	+

i. Comparaison avec une autre méthode utilisée au laboratoire (item 9)

Identification du micro-organisme

Les résultats du test MTBDR*plus* ont été comparés à ceux obtenus par la technique immunochromatographique de détection de l'antigène (Ag) MPT64 sur colonies bactériennes. Cet Ag est spécifique des mycobactéries du complexe *tuberculosis*. Notre choix s'est porté sur cette technique, qui est utilisée en miroir au laboratoire, plutôt que sur les autres techniques classiques d'identification par PCR-hybridation MTBC ou MTBCM (même type de méthode) : étant commercialisées par le même fournisseur, et en l'absence de précision de la cible amplifiée dans les 3 coffrets pour l'identification du complexe *tuberculosis*, nous avons émis l'hypothèse d'une cible commune.

Identification des mutations des gènes *rpoB*, *katG*, et promoteur du gène *inhA*

Les résultats du test MTBDR*plus* ont été comparés à ceux obtenus avec une technique de PCR simplex « maison »/séquençage pour chacun de ces gènes. Les amorces utilisées pour cela permettent d'amplifier les segments de gènes correspondants à ceux screenés par le test MTBDR*plus* (annexe 16).

Echantillonnage :

30 souches du complexe *tuberculosis*, et 5 souches de mycobactéries atypiques déjà caractérisées par le CNR-MyRma ont été sélectionnées (annexe 14), à partir de résultats archivés dans le SGL.

Objectifs pour l'identification du complexe *tuberculosis* :

Pour l'AgMPT64, les performances annoncées par le fournisseur (SD Biotec) sont une spécificité de 100% et une sensibilité de 99,4% pour les souches isolées en milieu solide. Dans la littérature la sensibilité rapportée est de 97% sur tout type d'échantillon[11]. De très rares cas de faux négatif ont été décrits pour les souches de *M. bovis BCG*. La 2^{ème} cause principale de faux négatif est liée à une mutation dans le gène *mp64* codant pour l'antigène correspondant, qui n'est alors plus produit par la souche[11][12]. De très rares cas de faux positifs ont également été décrits. Pour cette comparaison de méthode l'objectif de concordance est d'au moins 97% (sensibilité de MTBDR*plus* au moins égale à celle de la méthode immunochromatographique) [9]. Les résultats sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5. Résultats de la comparaison de s méthodes MTBDR*plus* et AgMPT64

	AgMPT64 +	AgMPT64 -
MTBDR <i>plus</i> Tub +	29	1
MTBDR <i>plus</i> Tub -	0	5

Une seule souche a présenté un résultat discordant : BK34. Il s'agissait d'une souche de *Mycobacterium bovis*, espèce pour laquelle un résultat négatif Ag MPT64 a déjà décrit dans la littérature[9]. L'essai satisfait donc à l'objectif de concordance \geq à 97% (34/35 résultats concordants, annexe 13).

L'objectif pour la recherche de mutations impliquées dans la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide était une concordance de 100%. Nous avons obtenu une concordance stricte entre les résultats des 2 tests : toutes les souches sauvages (WT : wild type) MTBDR*plus* l'étaient également au séquençage ; de même, les mutations/délétions détectées dans l'un des 3 gènes *rpoB*, *katG*, et promoteur *inhA* ont bien été identifiées par la 2^{ème} technique (annexe 14).

j. Sensibilité et spécificité analytiques (item 6):

La sensibilité analytique de la méthode, qui équivaut à une limite de détection, a été évaluée à 1.6×10^4 bactéries/ml à partir d'échantillons en culture, et la spécificité analytique à 100% (notice fournisseur).

7. Vérification des saisies manuelles

La vérification des saisies manuelles a été réalisée selon la procédure PXA-IT-034. Dans notre cas il s'agit d'une analyse ajoutée par le biologiste du secteur des MycoB, lorsqu'il valide le résultat de culture. En pratique, suite à sa demande, une feuille de travail « BM mycobactérie », qui est également une feuille de « demande interne » au laboratoire, est préparée par un technicien du même secteur : l'identification du patient et du prélèvement correspondant est faite en collant une étiquette avec le code barre du dossier (technicien BK) ; le biologiste demandeur s'identifie sur cette feuille et coche les examens complémentaires de BM. C'est le technicien de BM qui enregistre ces examens dans le SGL en ajoutant sur la demande dans l'informatique les examens nécessaires. C'est également lui qui saisit les résultats dans le dossier. Le biologiste du secteur de BM valide biologiquement avec les « feuilles de travail/demande interne » qu'il paraphe et date. Il vérifie ainsi les résultats saisis.

IV. Discussion – Conclusion

La vérification de méthode pour l'analyse MTBDR*plus* a été réalisée selon les recommandations du guide SH GTA 04 publié par le COFRAC, afin de s'assurer des performances rapportées par le fabricant et la fiabilité des résultats rendus.

Pour l'ensemble des essais sur site, les résultats obtenus ont atteint les objectifs initialement fixés, ce qui nous permet de conclure à l'aptitude de la méthode. Une analyse de risque détaillée, étape particulièrement importante pour une méthode qualitative, a permis d'identifier les risques potentiels, et les moyens de maîtrise existants ou à mettre en œuvre. Compte tenu du coût des tests (25 euros HT/ test) et du temps technicien requis pour l'exécution des analyses (6-8 heures minimum pour un test), certains essais ont été réalisés avec un nombre d'échantillons inférieur au nombre habituellement recommandé. De même les contraintes relatives à la sécurité et à la sûreté biologique ne nous permettent pas de suivre précisément les recommandations relatives au CQI du SH GTA 06, notamment sur la nature des contrôles à réaliser.

Cependant, cette vérification de méthode a permis de poursuivre la démarche d'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189, dans le secteur spécialisé de BM, et ainsi, celle du CNR MyRma. Elle a permis de réaliser un état des lieux des pratiques, un bilan de la base documentaire, et du circuit de l'échantillon entre 2 secteurs spécialisés (BM et MycoB) grâce à l'implication de tous les personnels. Elle a également permis de souligner l'importance de la traçabilité des réactifs, et matériels utilisés auprès de l'ensemble de l'équipe. L'analyse de risques nous a permis de mieux organiser la réalisation de l'analyse en cas de panne matériel, avec une réflexion menée autour des possibilités de back up et de leur organisation

dans un but de fluidité du travail. Dans la démarche de type PDCA, notre travail s'inscrit toujours en partie dans l'étape « D = réaliser ». En effet, pour le moment, la cartographie des équipements critiques n'a pas pu être réalisée. En effet, les services prioritaires sont ceux qui ont déjà déposé une demande d'accréditation auprès du COFRAC, de plus seul 1 set de sondes thermiques est disponible pour l'ensemble du pôle de biologie médicale. Nous sommes donc dans l'attente de leur mise à disposition pour notre service afin de pouvoir réaliser ce travail. La situation est identique pour la cartographie des thermocycleurs, qui sera réalisée par un prestataire externe, au marché AGEPS. Cependant le suivi métrologique des enceintes froides est déjà fonctionnel. La mise en œuvre du CQI indépendant du kit, ne sera effective qu'à l'automne 2016. Ce travail reste donc à poursuivre pour compléter ultérieurement le dossier de vérification de méthode.

Deux nouveaux techniciens seront formés à l'automne dans le secteur de BM. Ce travail a permis de formaliser les documents qualité nécessaires pour la formation et l'habilitation de ces personnels. Cette démarche devra par la suite être étendue aux autres techniciens du secteur ainsi qu'aux biologistes. Bien qu'aucune réclamation formelle n'ait été faite par les services cliniques, ce travail a également enclenché la création d'un indicateur sur le délai de rendu de l'analyse MTBDR*plus* (résultats non détaillés). Nous travaillons actuellement sur les résultats bruts obtenus pour la période de mai 2015 à mai 2016, ainsi qu'à l'analyse précise des causes des examens rendus hors délais. Ceci va nous permettre de vérifier la fonctionnalité de l'indicateur, pour ensuite pouvoir en exploiter les résultats. L'objectif suivant est la programmation d'un audit interne (check) pour le printemps 2017, afin de poursuivre la mise en conformité du processus.

Références

1. Rapport Sur La Lutte Contre La Tuberculose Dans Le Monde. 2015; :1–6. http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2015_executive_summary_fr.pdf?ua= 1. Organisation mondiale de la santé,2015.
2. Guillet-Caruba C, Martinez V, Doucet-Populaire F. Les nouveaux outils de diagnostic microbiologique de la tuberculose maladie. Rev. Med. Interne 2014; 35, Elsevier,p794–800.
3. Haut Conseil de Santé Publique.Tuberculoses à bacilles résistants : diagnostic et prise en charge Lignes directrices Rapport du 16 décembre 2014 [s.n]
4. Notice d'utilisation IFU 304A06 Génotype MTBDR*plus*, <http://www.hainlifescience.de/en/instructions-for-use.html> (2011?)
5. Bai Y, Wang Y, Shao C, Hao Y, Jin Y. GenoType MTBDRplus Assay for Rapid Detection of Multidrug Resistance in Mycobacterium tuberculosis: A Meta-Analysis. PLoS One 2016; 11 (3), Dipankar Chatterji, India, p:
6. Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Sougakoff W. Performance of the genotype MTBDR line probe assay for detection of resistance to rifampin and isoniazid in strains of Mycobacterium tuberculosis with low- and high-level resistance. J. Clin. Microbiol. 2006; 44, [s.n], p3659–3664.
7. Brossier F, Veziris N, Jarlier V, Sougakoff W. Performance of MTBDR plus for detecting high/low levels of Mycobacterium tuberculosis resistance to isoniazid. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2009; 13, [s.n], p260–265.
8. Organisation mondiale de la Santé. Manuel de sécurité biologique pour les laboratoires de la tuberculose. Editions de l'OMS, Luxembourg, 2013.
9. Décret n°210-736 du 30 juin 2010 relatifs aux microorganismes et toxines
10. Van Helden PD, Victor TC, Warren RM, van Helden EG. Isolation of DNA from Mycobacterium tuberculosis. Methods Mol. Med. 2001; 54, [s.n], p19–30.
11. Brent AJ, Mugo D, Musyimi R, et al. Performance of the MGIT TBc identification test and meta-analysis of MPT64 assays for identification of the Mycobacterium tuberculosis complex in liquid culture. J. Clin. Microbiol. 2011; 49, [s.n], p4343–4346.
12. Fabre M, Vong R, Gaillard T, et al. Évaluation du kit SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid ® dans le cadre du diagnostic de la tuberculose. Pathol. Biol. 2011; 59, [s.n], p26–28.

Documents associés

- Norme NF EN ISO 15189, décembre 2012
- SH REF 02, recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012, octobre 2013, COFRAC, section Santé humaine
- SH GTA 04 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes de biologie médicale, avril 2011, COFRAC, section Santé humaine
- SH GTA 06 : Guide technique d'accréditation contrôle de qualité en biologie médicale
- SH INF 50, Portées type d'accréditation, juin 2011, COFRAC, section Santé humaine
- SH GTA 01, Guide technique d'accréditation en biologie médicale, COFRAC, section Santé humaine

Annexes

Annexe 1. Organigramme du Laboratoire de bactériologie hygiène

Annexe 2. Organisation de la cellule qualité du pôle de biologie médicale et pathologie

Annexe 3. Stratégie diagnostic d'un cas de tuberculose (recommandations HCSP 2014)

Annexe 4 Liste des réactifs et des matériels nécessaires pour l'analyse MTBDR*plus* pour la matrice « souche isolée sur milieu de culture solide »

Annexe 5. Procédures et modes opératoires à rédiger/réviser

Annexe 6. PXA-IT-031 : procédure AMDEC pôle

Annexe 7. Attestation fournisseur de la validité de la technique d'extraction par choc thermique

Annexe 8. Résultats de l'essai de contamination inter-échantillon

Annexe 9. Résultats de l'essai de variabilité inter-opérateur

Annexe 10. Influence de la quantité d'échantillon prélevé sur les résultats

Annexe 11. Stabilité des réactifs de PCR après 6 cycles de décongélation et influence de la congélation à -20°C de la suspension bactérienne

Annexe 12. Influence de la variation des conditions de conservation des échantillons : extrait d'ADN frais et conservé 1 semaine à +4°C (bandelettes n°2 et 3) et influence de la présence de gélose dans la suspension (bandelettes n°1 et 2).

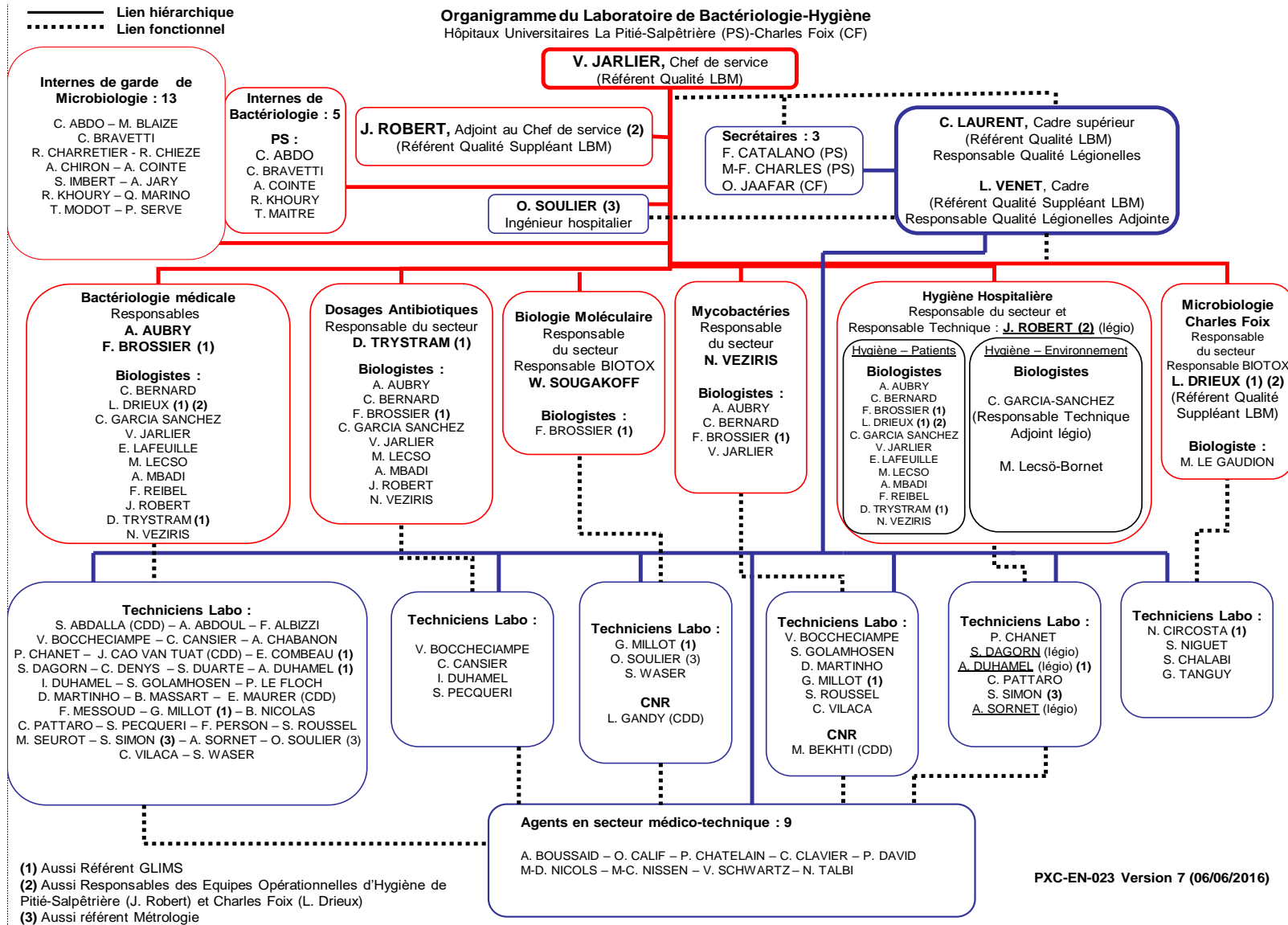
Annexe 13. Résultats de la comparaison de méthode MTBDR*plus*/AgMPT64 pour l'identification du complexe *M.tuberculosis*

Annexe 14. Résultats du test MTBDR*plus* pour les 5 souches de mycobactéries atypiques

Annexe 15. Résultats de la comparaison de méthode MTBDR*plus*/PCR-séquençage pour la détection des mutations des gènes *rpoB*, *katG*, et du promoteur *inhA*

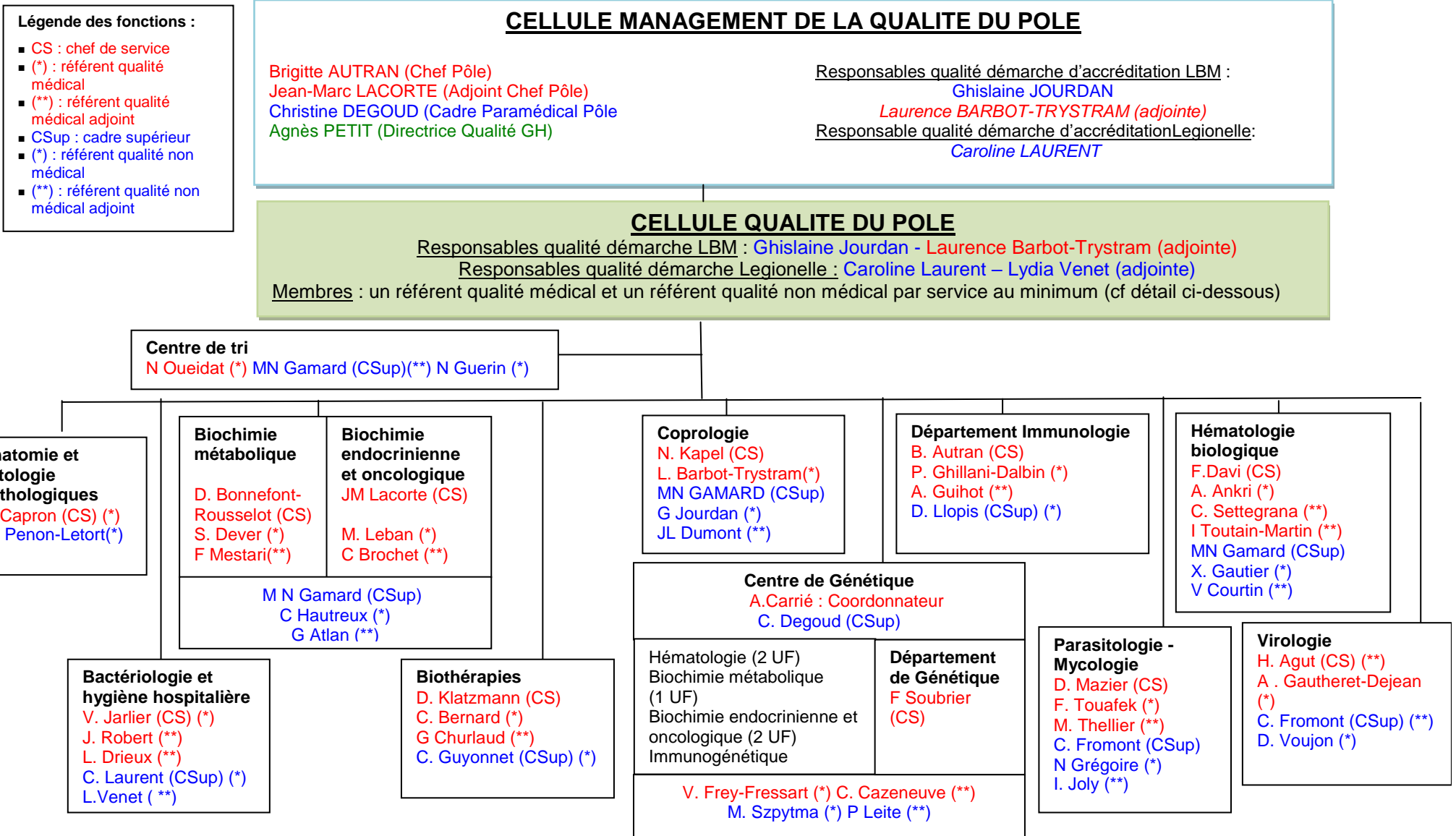
Annexe 16. Tableau des amorces utilisées pour la technique de PCR-séquençage des fragments des gènes *rpoB*, *katG*, *inhA* promoteur, lors de la comparaison de méthode.

Annexe 1. Organigramme du Laboratoire de bactériologie hygiène

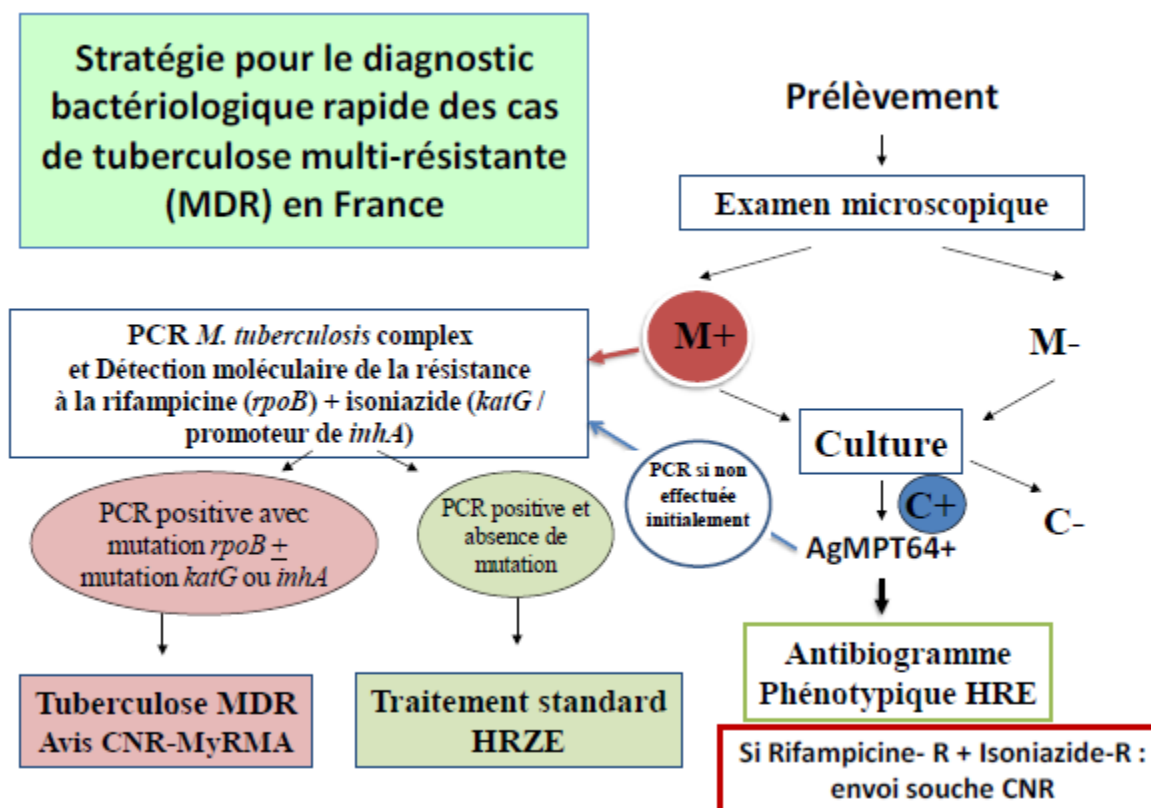


Annexe 2. Organisation de la cellule qualité du pôle de biologie médicale et pathologie

ORGANISATION QUALITE DU POLE DE BIOLOGIE MEDICALE ET PATHOLOGIE



Annexe 3. Stratégie diagnostic d'un cas de tuberculose (recommandations HCSP 2014)



Légende :

M+ : examen microscopique positif à la recherche de bacilles acido-alcool-résistants (BAAR)

PCR : Polymerase Chain Reaction

AgMPT64+ :

HRZE : isoniazide (H), rifampicine (R), pyrazinamide (Z), éthambutol (E)

Annexe 4 Liste des réactifs et des matériels nécessaires pour l'analyse MTBDR*plus* pour la matrice « souche isolée sur milieu de culture solide »

Réactifs	Fournisseur	Référence
eau stérile tube 9ml	Biomérieux	AEB110379
kit MTBDR <i>plus</i> V2.0	Biocentric	304A
matériels considérés non critiques maintenance Sartorius	Fournisseur	Référence
pipettes utilisées pour la préparation des mix réactionnels	Thermo scientific Finnpipette -30µl-300µl -3 µl -30 µl -0,3 µl -3 µl Gilson pipetman 1000µl	n°26 n°25 n°24 n°17
pipettes utilisées pour le dépôt des ADN pour la réalisation de la PCR	BioHit : 0,5-10µl	n°89
pipettes utilisées pour l'étape d'hybridation	Brand multicanaux Transfertpet -2,5µl-25µl 12 canaux 8 canaux Gilson 20µl	n°82 n°23 n°37
Consommables	Fournisseur	Référence
barquettes d'hybridation	Biocentric	4877
oèses bleues 10µl	Fischer scientific	1761K
oèses blanches 1µl	Fischer scientific	1761E
pipettes 3ml non stérile	WVR	612-2852
microtubes à vis 1,5ml	Sarstedt	72692005
micro tubes	Dutscher	16142, 16139
connes à filtres	Dutscher	66063, 66065, 66061, 047091

Annexe 4. suite

Matériels critiques	Fournisseur	Référence	Métrie
BMS BK pièce antibiogramme : Digital dry bath accublock	Labnet international corporation	201416551	Certificat conforme
BMS BM pièce PCR	Grant type QBC1	J10522016	A réaliser
BMS BM pièce PCR	Eppendorf, Thermostatplus	200211506	A réaliser
thermocycleur 1	DNA engine	200864	A réaliser
thermocycleur 2	genAmp	004627	A réaliser
thermocycleur 3	Biorad icycler	20041299	A réaliser
thermocycleur 4	DNA engine Chromo 4	28473	
Twin incubator	Biocentric	13636-2011	A réaliser
congélateur secteur mycobactéries-pièce principale	Vestfrost	C7 89CG43	A réaliser Spy ok
combiné réfrigérateur/congélateur biologie moléculaire pièce PCR	Phillips Whirlpool	89FRCG08	A réaliser Spy ok
congélateur à -40°C de biologie moléculaire couloir BM	Dometic medical systeù	89CG47	A réaliser Spy ok
combiné réfrigérateur/congélateur en pièce de préparation des mix réactionnels	Philipps Whirlpool	89FRCG09	A réaliser absent
congélateur pièce post PCR	Liebherr	89CG38	A réaliser Spy ok
chambre froide	-	89CF04	Certificat conforme Spy ok

Annexe 5. Procédures et modes opératoires rédigés/révisés

Procédures	Dénominations
Procédure circuit de travail en BM	PR CIRC BM
Procédure de gestion des CIQ MTBDR <i>plus</i>	PXC-MO-055
Procédure de gestion des EEQ	PCX-MO-055
Procédure de gestion/conservation des extraits d'ADN	PR CONS EXT
Gestion des NC	PXC-MO 049
Enregistrement des demandes d'exams de BM dans GLIMS(SGL)*	PR ENR EXBM
Saisie des résultats*en BM	PR SAIS RESBM
Modes opératoires	Dénominations
Extraction Choc thermique	MO EXT CT
Inactivation suspensions mycobactéries	MO INACT CTH
PCR Bandelette MTBC, MTBDR <i>plus</i>	MO PCR GEN H
Hybridations Bandelettes	MO GEN H
Thermocycleur GenAmp	PR THCYC GENA
Thermocycleur DNA Engine	PR THCYC ENG
Thermocycleur Icyler	PR THCYC ICYCL
Thermocycleur DNA engine Chromo 4	PR TH DNA 4
TwinCubator	PR UT TWI
Document qualité	
Protocole de vérification de méthode	PR VF MTH MTBDR <i>plus</i>

Annexe 6. PXA-IT-031 : procédure AMDEC pôle

Critères de Fréquence/probabilité d'occurrence

Cotation	NC échantillons / bilan annuel NC/LBM	Autres
1 Exceptionnel – improbable	0 à 49 / an /LBM	< 1 / an
2 Rare- très peu probable	50 à 99 / an /LBM	1 à 3 fois/an
3 Peu fréquent-peu probable	De 100 à 999 /an /LBM	Au moins 1 fois/trimestre
4 Fréquent-probable	De 1 000 à 4 999/an /LBM	Au moins 1fois/mois
5 Très fréquent-très probable	> 5 000/an /LBM	Au moins 1fois/semaine

Critères de Gravité

Cotation	Echantillon / Résultat	Patient-prescripteur-humain	Organisation
1 Mineure-Bénin	Sans conséquence	Sans conséquence Pas de risque humain	Sans conséquence Peu ou pas de perturbation
2 Modéré- peu grave	NC échantillon analysé malgré la NC Retard rendu résultat compris entre 5 et 60 minutes par rapport délai défini	Risque faible Gêne légère ou transitoire Appel LBM : dérangement	Perturbations ponctuelles : tensions Charge travail augmentée-* Nécessité de modifier l'organisation pour répondre aux besoins
4 Grave	Rejet échantillon Retard rendu résultat > 1 heure par rapport délai défini	Risque important Dommages temporaires et réversibles impliquant intervention Nécessité de reposer le patient	Forte perturbation Travail en situation dégradée
6 Critique- très grave	Rejet échantillon précieux ou dérogation Résultat erroné détecté par le laboratoire	Dommages permanents Ne pas disposer résultat dans le délai défini impactant la prise en charge d'un patient Résultat erroné détecté par prescripteur	Désorganisation totale Impossibilité de rendre les résultats dans les délais définis pour les examens urgents
20. Catastrophique	Arrêt process	Mise en jeu pronostic vital	Impossible de fonctionner

Calcul de la Criticité brute potentielle = fréquence x gravité						
		Mineure-Bénin	Modéré- peu grave	Grave	Critique- très grave	Catastrophique
		1	2	4	6	20
Exceptionnel – improbable	1	1	2	4	6	20
Rare- très peu probable	2	2	4	8	12	40
Peu fréquent-peu probable	3	3	6	12	18	60
Fréquent-probable	4	4	8	16	24	80
Très fréquent-très probable	5	5	10	20	30	100

Quotation de la criticité brute potentielle

Risque faible / limité/ acceptable = 1
Risque modéré/ Tolérable/ mesures requises = 2
Risque très élevé/ action urgente à mener / inacceptable – 3

Critères de maîtrise du risque (évalué en fonction des moyens de maîtrise identifiés)

	Niveau de maîtrise du risque		Actions
1	INEXISTANT-NON MAITRISE	Mesures de prévention inexistantes ou pas appropriées Pas de conscience des risques	Aucune action en place
0,8	PEU MAITRISE	On prend conscience, débute une démarche, on est en vigilance Mesures approximatives	Quelques procédures écrites, persistance de consignes orales. l'organisation est prévue
0,4	PARTIELLEMENT MAITRISE	Mesures imparfaites	Les activités à risque font l'objet de procédures et consignes écrites, connues mais pas évaluées.
0,25	MAITRISE	Mesures efficaces même s'il existe un risque résiduel	Les procédures sont connues et visent la maîtrise du risque; elles sont évaluées régulièrement et suivies par des indicateurs Amélioration continue

Calcul de la Criticité résiduelle = criticité brute potentielle * niveau maîtrise					
Niveau maîtrise		MAITRISE	PARTIELLEMENT MAITRISE	PEU MAITRISE	INEXISTANT-NON MAITRISE
Criticité brute		0.25	0.4	0.8	1
Acceptable	1	0.25	0.4	0.8	1
Tolérable sous contrôle	2	0.5	0.8	1.6	2
Inacceptable	3	0.75	1.2	2.4	3

Risque faible / limité/ acceptable = 1
Risque modéré / Tolérable/ mesures = 2
Risque très élevé / action urgente à mener = 3

Annexe 7. Attestation fournisseur de la validité de la technique d'extraction par choc thermique

RE: demande de renseignements kit MTBdrplus HAIN

Cédric Rampon [c.rampon@biocentric.com]

Vous avez répondu le 18/05/2016 22:12.

Envoyé : lundi 18 avril 2016 17:58

À : LAFEUILLE Émilie

Bonjour Mme Lafeuille,

Je vous prie d'accepter mes excuses pour cette réponse tardive.

Pour répondre à vos questions, dans la mesure où les cycles et les températures sont respectés, la performance de la méthode est conforme.

La technique Genolyse a pour but de rationaliser l'extraction et de permettre une extracti sur prélèvement, l'utilisation du choc thermique sur colonies à partir de milieux gélosés permet de réaliser une lyse suffisante pour la réalisation des tests genotype.

Par ailleurs, les contrôles internes des tests Genotype permettent de valider la méthode e le résultat rendu.

Sentiments dévoués,

Cédric Rampon
Directeur commercial et marketing



276 Chemin de Roumpinas - 83150 Bandol - France

Tél. : +33 4 94 29 06 30 - Fax : +33 4 94 29 06 31

cell: +33 6 67 66 50 37

c.rampon@biocentric.com

www.biocentric.com

De : LAFEUILLE Émilie [mailto:emilie.lafeuille@aphp.fr]

Envoyé : vendredi 15 avril 2016 17:22

À : c.rampon@biocentric.com

Objet : demande de renseignements kit MTBdrplus HAIN

Cher M. Rampon,


je vous contacte afin de vous demander des précisions concernant les modalités d'utilisation ce kit. Elles concernent 2 points particuliers:

-dans la notice MTBdrplus V2.0, procédure de réalisation de la technique: il est indiqué que l'amplification est réalisée sur un thermocycleur HAIN. Pouvez vous me confirmer que l'utilisation d'un thermocycleur autre que HAIN peut être utilisé sans qu'il n'y ait d'impact sur les performances de la méthode, lorsque nous respectons le mode opératoire indiqué?

-concernant l'utilisation du kit pour la matrice "souche obtenue sur milieux solides", pouvez vous me confirmer que l'utilisation d'une extraction par choc thermique en remplacement de technique Géolyse, n'aura pas d'impact majeur sur les résultats obtenus et les performances de la méthode pour ce type d'échantillon?

ote&id=RgAAAACXVDfvmAa6RoB%2fZTUEYWcVBwBtL6R9ydp5TbxDoNUiDkVAAAAom2MAABtL6R9...



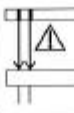
Annexe 8. Résultats de l'essai de contamination inter-échantillon



GenoType MTBDRplus 12

VER 2.0
0304A-0713-02-2

30 / 06 / 2016
dd mm yyyy

#				TUB	rpoB WT	rpoB MUT	katG WT	katG MUT	inhA WT	inhA MUT	RMP	INH
											sensitive	resistant
											sensitive	resistant

#	Sample	TUB	rpoB WT	rpoB MUT	katG WT	katG MUT	inhA WT	inhA MUT	RMP	INH
1	H37RV	+	+	-	+	-	+	-	+	+
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	H37RV	+	+	-	+	-	+	-	+	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	H37RV	+	+	-	+	-	+	-	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	H37RV	+	+	-	+	-	+	-	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	H37RV	+	+	-	+	-	+	-	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	H37RV	+	+	-	+	-	+	-	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

OT

1


HYB 30 min

15

STR 15 min

5

SUB 5 min



Lucas GANDY

© Hain Lifescience GmbH | <http://www.hain-lifescience.de>

Eau stérile biomérieux n° lot 112840

Thermocycleur : Chromo4





Annexe 9 (suite). Résultats de l'essai de variabilité inter-opérateur

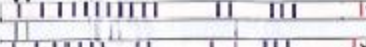
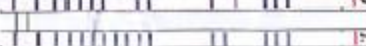
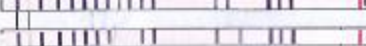
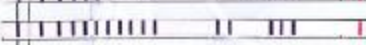
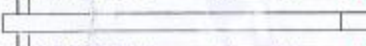
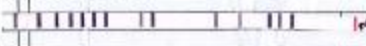
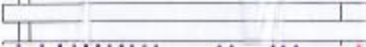

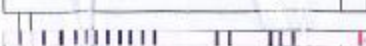
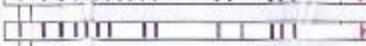
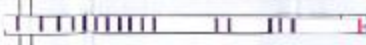

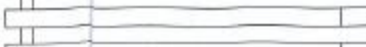



GenoType MTBDRplus 12

VER 2.0
0304A-0713-02-2

du 25 07 2016
dd mmm yyyy

#					TUB	rpoB WT	rpoB MUT	katG WT	katG MUT	inhA WT	inhA MUT	RMP	INH
					sensitive	resistant	sensitive	resistant	sensitive	resistant	sensitive	resistant	

#	H37RV	TK BK:	TK BM	
1	3K11	Sophie	LG	
2	BK26	le 18/07/2016		
1	H37RV	TK BK:	TK BM	
2	BK11	Shenaz	LG	
3	BK26	le 19/07/2016		
1	BK26	TK BK	TK BM	
2	H37RV	Catherine	LG	
3	BK11	le 20/07/2016		
1	H37RV	TK BK	TK BM	
2	3K11	Daniel	LG	
3	BK26	le 21/07/2016		
1	H37RV	TK BK	TK BM	
2	BK11	Hericem	LG	
3	BK26	le 25/07/2016		

LOT


w


o


l


l

e


 HYB 30 min


 STR 15 min


 SUB 5 min


Lucas GARDY

Eau stérile Biomérieux n° lot 112840

Thermocycleurs utilisés : voir tableaux page 24

Annexe 11. Stabilité des réactifs de PCR après 6 cycles de décongélation (rectangle vert) et influence de la congélation de la suspension bactérienne (✦)



GenoType MTBDRplus 12

VER 2.0
0304A-0713-02-2

06 au 06 07 2016
dd mm yyyy

#				TUB	rpoB WT	rpoB MUT	katG WT	katG MUT	inhA WT	inhA MUT	RMP	INH
											sensitive	sensitive
											resistant	resistant

#	Strain	Lot	Date	Genotype	rpoB	katG	inhA	RMP	INH
✦ 1	H37RV	54	16-06-107	WT	+	-	-	+	+
6	H37RV	53	16-08-107	WT	+	-	-	+	+
✦ 107	H37RV après 1 semaine de congélation avant extraction			WT	+	-	-	+	+

LOT 000010 HYB 30 min STR 15 min SUB 30 min

Lucas GAUDY

Eau stérile Biomérieux n° lot 112840
Congélateur : C7 89CG43, Thermocycleur : GenAmp

Annexe 13. Résultats de la comparaison de méthode MTBDR*plus*/AgMPT64 pour l'identification du complexe *M.tuberculosis*

souches	espèce caractérisée par le CNR antérieurement	AgMPT64		MTBDR <i>plus</i> (réalisé antérieurement)			
		résultats	n° lot	Date réalisation	de	zone tub	n° lot
BK1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	positif	08BDA001B	24/06/16		Positif	OU00081
BK3	<i>M.tuberculosis complex</i>	positif	08BDA001B	24/06/16		Positif	OU00094
BK4	<i>M.tuberculosis complex</i>	positif	08BDB001A	24/06/16		Positif	OU00081
BK5	<i>M.tuberculosis complex</i>	positif faible	08BDA001B	08/07/16		Positif	/
BK7	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	positif	08BDB001A	27/06/16		Positif	OU00084
BK8	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	positif	08BDB001A	08/07/16		Positif	OU00081
BK9	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	positif	08BDA001B	24/06/16		Positif	OU00081
BK10	<i>M.tuberculosis complex</i>	positif	08BDA001B	27/07/16		Positif	/
BK11	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	positif	08BDA001B	24/06/16		Positif	OU00084
BK12	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	positif	08BDB001A	24/06/16		Positif	OU00090
BK14	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	positif	08BDA001B	08/07/16		Positif	OU00084
BK15	<i>M.tuberculosis complex</i>	positif	08BDA001B	24/06/16		Positif	OU00090
BK16	<i>M.tuberculosis complex</i>	positif	08BDA001B	24/06/16		Positif	OU00094
BK17	<i>M.tuberculosis complex</i>	positif	08BDB001A	27/07/16		Positif	/
BK18	<i>M.tuberculosis complex</i>	positif	08BDB001A	27/07/16		Positif	/
BK20	<i>M.tuberculosis complex</i>	positif	08BDB001A	08/07/16		Positif	OU00084
BK21	<i>M.tuberculosis complex</i>	positif	08BDA001B	08/07/16		Positif	/
BK22	<i>Mycobacterium africanum</i>	positif	08BDA001B	24/06/16		Positif	OU00081
BK23	<i>M.tuberculosis complex</i>	positif	08BDB001A	24/06/16		Positif	OU00094

Annexe 13. Suite

BK24	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	positif	08BDA001B	08/07/16	Positif	OU00094
BK25	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	positif	08BDA001B	24/06/16	Positif	OU00081
BK26	<i>M.tuberculosis complex</i>	positif	08BDB001A	24/06/16	Positif	OU00087
BK27	<i>M.tuberculosis complex</i>	positif	08BDA001B	08/07/16	Positif	OU00081
BK28	<i>M.tuberculosis complex</i>	positif	08BDA001B	24/06/16	Positif	OU00081
BK29	<i>M.tuberculosis complex</i>	positif	08BDA001B	24/06/16	Positif	OU00090
BK30	<i>M.tuberculosis complex</i>	positif faible	08BDA001B	24/06/16	Positif	OU00090
BK31	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	positif	08BDA001B	24/06/16	Positif	OU00090
BK33	<i>Mycobacterium bovis ssp bovis</i>	négatif (2 fois)	08BDB001A	08/07/16	Positif	OU00094
BK34	<i>Mycobacterium bovis BCG</i>	positif	08BDB001A	08/07/16	Positif	OU00090
BK35	<i>Mycobacterium africanum</i>	positif	08BDB001A	08/07/16	Positif	OU00081
					MTBDR _{plus} (réalisé 13/07/16)	
Mycobactéries atypiques (annexe 14)					bande complexe tuberculosis	
MA1	<i>M. kansasii</i>	négatif	08BDA001B	24/06/16	négatif	OU00110
MA2	<i>M. intracellulare</i>	négatif	08BDA001B	24/06/16	négatif	OU00110
MA3	<i>M. abscessus</i>	négatif	08BDA001B	24/06/16	négatif	OU00110
MA4	<i>M.avium</i>	négatif	08BDA001B	24/06/16	négatif	OU00110
MA5	<i>M.intracellulare</i>	négatif	08BDA001B	24/06/16	négatif	OU00110

Eau stérile Biomérieux : n° lot 112840

Annexe 15. Résultats de la comparaison de méthode MTBDR_{plus}/PCR-séquençage pour la détection des mutations *rpoB*, *katG*, *inhA* promoteur

souches	espèce caractérisée antérieurement	MTBDR _{plus} (réalisé antérieurement)	PCR/séquençage	MTBDR _{plus} (réalisé antérieurement)	PCR/séquençage	MTBDR _{plus} (réalisé antérieurement)	PCR/séquençage
		gène <i>rpoB</i>	gène <i>rpoB</i> (rifip1/2)	gène <i>katG</i>	gène <i>katG</i> (k2s/as)	gène pro <i>inhA</i>	gène pro <i>inhA</i> (pro 1/2)
BK1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	RPOB, mutation MUT1 (D516V)	D516V*	KATG, mutation MUT1	S315T*	WT	WT*
BK3	<i>M. tuberculosis</i> complex	RPOB, mutation MUT2B (H526D)	H526D*	WT	WT*	WT	WT
BK4	<i>M. tuberculosis</i> complex	RPOB, mutation MUT3 (S531L)	D516Y*	KATG, mutation MUT1	S315T*	promoteur d'INHA, mutation MUT1	-15 c>t*
BK5	<i>M. tuberculosis</i> complex	RPOB, mutation MUT3 (S531L)	S531L*	WT	WT*	WT	WT*
BK7	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	RPOB (ΔWT3)	mutation par délétion : 514 à 516	KATG, mutation MUT1	S315T*	WT	WT*
BK8	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	RPOB (ΔWT4)	D516Y	KATG, mutation MUT1	S315T*	WT	WT*
BK9	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	RPOB (ΔWT3-4)	M515I et D516Y	WT	W412	WT	WT*
BK10	<i>M. tuberculosis</i> complex	RPOB (ΔWT4-5)	N519del	KATG, mutation MUT1	S315T*	WT	WT*
BK11	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	RPOB (ΔWT5-6)	S522Q	KATG, mutation MUT1	S315T*	WT	WT*
BK12	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	RPOB (ΔWT7)	H526N	KATG, mutation MUT1	S315T*	promoteur d'INHA, mutation MUT1	-15 c>t*
BK14	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	RPOB (ΔWT8)	L533P	WT	WT*	promoteur d'INHA, mutation MUT1	-15 c>t*
BK15	<i>M. tuberculosis</i> complex	RPOB (ΔWT8)	S531F	KATG, mutation MUT1	S315*T	WT	WT*
BK16	<i>M. tuberculosis</i> complex	WT	WT*	KATG, mutation MUT1	S315*T	WT	WT*
BK17	<i>M. tuberculosis</i> complex	RPOB (ΔWT8)	S531W	KATG, ΔWT	S315R	WT	WT*
BK18	<i>M. tuberculosis</i> complex	RPOB, mutation MUT2B (H526D)	H526*D	KATG, ΔWT	S315N + L378M	WT	WT*

Toutes les souches de l'étude ont été repiquées sur milieu coletsos (n° lot 6D2804), eau distillée Biomérieux n°lot 1128840

Opérateur période juin/juillet 2016 : LG ; PCR simplex réalisées sur thermocycleur : Icycler

Annexe 15. Suite

BK20	<i>M.tuberculosis</i> complex	WT	WT*	WT	WT*	promoteur d'INHA, mutation MUT1	-15 c>t*
BK21	<i>M.tuberculosis</i> complex	WT	WT*	WT	WT*	promoteur d'INHA, mutation MUT1	-15 c>t*
BK22	<i>Mycobacterium africanum</i>	WT	WT*	WT	WT*	promoteur d'INHA, mutation MUT2	-16 a>g
BK23	<i>M.tuberculosis</i> complex	RPOB (ΔWT7)	H526C	KATG, mutation MUT1	S315T*	promoteur d'INHA, mutation MUT3A	-8 t>c*
BK24	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	RPOB, mutation MUT2A (H526Y)	H526Y*	KATG, mutation MUT1	S315T*	promoteur d'INHA, mutation MUT3B	- 8 t>a*
BK25	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	RPOB, mutation MUT2A (H526Y)	H526Y*	KATG, mutation MUT1	S315T*	Promoteur (ΔWT1)	-17 g>t
BK26	<i>M.tuberculosis</i> complex	WT	WT*	WT	R463L (polymorphisme)	WT	WT
BK27	<i>M.tuberculosis</i> complex	WT	WT*	WT	WT	WT	WT*
BK28	<i>M.tuberculosis</i> complex	WT	WT*	WT	WT*	WT	WT*
BK29	<i>M.tuberculosis</i> complex	WT	WT*	WT	WT	WT	WT
BK30	<i>M.tuberculosis</i> complex	WT	WT*	WT	WT*	WT	WT*
BK31	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	WT	WT*	WT	WT*	WT	WT*
BK33	<i>Mycobacterium bovis ssp bovis</i>	WT	WT*	WT	WT*	WT	WT*
BK34	<i>Mycobacterium bovis BCG</i>	WT	WT*	WT	WT*	WT	WT*
BK35	<i>Mycobacterium africanum</i>	WT	WT*	WT	WT*	WT	WT*
mycobactéries atypiques							
MA1	<i>M. Kansai</i>	absence de bande Tub *	NR	Ininterprétable*	NR	Ininterprétable*	NR
MA2	<i>M. intracellulare</i>	absence de bande Tub *	NR	Ininterprétable*	NR	Ininterprétable*	NR
MA3	<i>M. abscessus</i>	absence de bande Tub *	NR	Ininterprétable*	NR	Ininterprétable*	NR
MA4	<i>M.avium</i>	absence de bande Tub *	NR	Ininterprétable*	NR	Ininterprétable*	NR
MA5	<i>M.intracellulare</i>	absence de bande Tub *	NR	Ininterprétable*	NR	Ininterprétable*	NR

Pour des raisons de lisibilité, les n° de lots correspondants aux réactifs utilisés ont été retirés du tableau, mais sont conservés en fichier excell. Tous les résultats marqués par une étoile (*), correspondent à des tests réalisés au cours des mois de juin-juillet 2016.

Annexe 16. Tableau des amorces utilisées pour la technique de PCR-séquençage des fragments des gènes *rpoB*, *katG*, *inhA* promoteur, lors de la comparaison de méthode.

amorce	traçabilité	séquence	Cible amplifiée
Rifip1	26 mai 2015, n°5766396	GGGTCGGCATGTCGCGGATGG	Fragment du gène <i>rpoB</i>
Rifip2	26 mai 2015, n°5766395	GCACGTCGCGGACCTCCAGC	
Kat2S	26 mai 2015, n°5766399	ATTGTTTTCGCCGGCAACTGC	Fragment du gène <i>katG</i>
Kat2as	26 mai 2015, n°5766400	GCCCAAGGTATCTCGCAACG	
Pro1	20août 2015, n°5835476	TCAATACACCCGAGCCA	Fragment du promoteur du gène <i>inhA</i>
Pro2	20août 2015, n°5835477	GTCATCCGCATGAGGAAT	

Les amorces utilisées permettent d'amplifier le fragment de chacun des 3 gènes *rpoB*, *katG* et promoteur du gène *inhA* screené par la technique MTBDR*plus*.

Résumé

Le laboratoire de bactériologie hygiène de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière est entré dans la démarche d'accréditation selon la norme NF EN ISO 17025 dès 2012 avec l'obtention de l'accréditation pour la recherche et le dénombrement des légionnelles dans l'environnement. Cette démarche a été poursuivie pour la norme NF EN ISO 15189 par le déploiement du plan d'actions de la cellule qualité du pôle de biologie médicale la même année, avec un travail enclenché sur tout le pré et post-analytique. En 2015, notre laboratoire a déposé un dossier pour une demande d'accréditation selon cette norme concernant l'analyse « hémoculture ». Cette demande est en attente de la visite initiale des auditeurs du COFRAC. Dans le cadre du renouvellement des CNR en 2017, il était essentiel de renforcer la démarche qualité du CNR-MyRma en préparant le dossier de vérification de méthode d'une analyse clef, MTBDR*plus*. Cette méthode qualitative sera présentée en portée A.

La technique est bien maîtrisée par le laboratoire puisqu'elle est utilisée depuis 2006, avec les différentes versions du kit. Cependant la vérification des performances n'avait pas été réalisée avec la version V2.0. C'était donc l'objectif principal de ce travail. Les résultats ont montrés que les objectifs fixés initialement sont atteints in situ. L'analyse de risque a permis une amélioration de la maîtrise de la phase analytique, notamment de la base documentaire, et des processus supports. Ce travail reste à poursuivre, avec la mise en place effective d'un CQI et l'exploitation des résultats, ainsi qu'avec celle du suivi métrologique du matériel critique et la formalisation stricte de l'habilitation du personnel impliqué. Ceci nous permettra de déposer une demande d'accréditation. L'un des axes d'amélioration se dessinant déjà pour les mois à venir, portera sur le délai de rendu des résultats (<72H) de cette analyse.