



EVALUATION DES PERFORMANCES DE L'ANTIBIOGRAMME EN MILIEU LIQUIDE SUR PHOENIX®

Mémoire pour l'obtention du diplôme universitaire
« **Assurance qualité au laboratoire de biologie médicale** »

Hanaa BENMANSOUR

Hôpital Lariboisière

Octobre 2017

CONTEXTE GENERALE

La BM contribue à 60% des diagnostics → nécessité de traçabilité.

- **Réglementation :**

- Réforme de biologie médicale : accréditation obligatoire des LABM → garantir une qualité tracée et prouvée des examens par vérification de la compétence des LBM à rendre des résultats fiables.
- Exigences précisées dans la norme 15189
- Délivrée par l'organisme national d'accréditation (COFRAC)

- **Accréditation au laboratoire de Bactériologie:**

- Pas de nouvelles technologies depuis les 20 dernières années → techniques essentiellement manuelles rendant l'accréditation de ce secteur difficile.



CONTEXTE GENERALE

- Apparition de nouvelles technologies : ensemencement (PREVI Isola®, WASP), la cytologie (UF-500/1000i , IQ200 ®), l'identification des micro-organismes (automates : VITEK®, Phoenix®, MALDI-TOF®) et l'antibiogramme en milieu liquide (VITEK®, Phoenix®, MICROSCAN WALK-AWAY®) rendant les plateaux techniques tant redoutés attractifs.
- L'accréditation de la bactériologie reste difficile : (+7000 bactéries) en constante évolution, différents types de prélèvements → nécessité d'une grande expertise (épidémiologie, bibliographie ...)
- De ce faite, la méthodologie de la vérification des performances ainsi que l'analyse des risques des procédures utilisées en bactériologie ne sont pas encore très claires malgré les efforts de la Société Française de Microbiologie (SFM) et le Comité Européen de l'Antibiogramme (EUCAST).



PRESENTATION DU LABORATOIRE

GH S.Louis-Lariboisiere -F.Widal

10^{ème}, 2500 lits

S.Louis

-Enco-hématologie
Chirurgie (maxilofaciale
, urologie)
Pneumologie
Dermatologie
Néphrologie
Maladies infectieuses
CIDDIST

Lariboisière

-Chirurgie (Orthopédique,
digestive, gyneco-obstétrique,
neurochirurgie)
-Urgences (ORL, céphalées)
-Rhumatologie, ORL, cardio
-Medecine interne
-RPO, Réanimation médicale
et toxicologique.

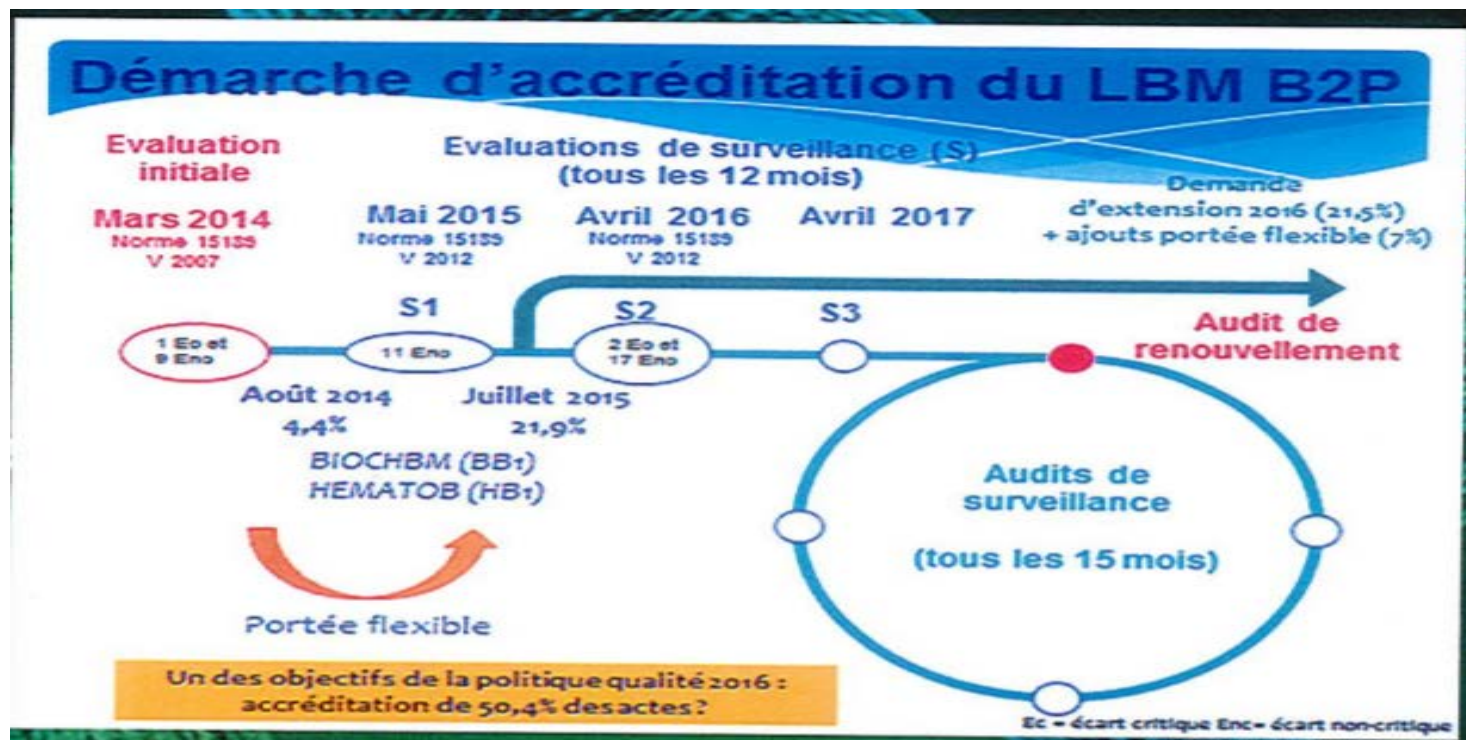
F.Widal

SSR-SLD
CDAG
Psychiatrie



DÉMARCHE QUALITÉ DU LABM B2P

- Le laboratoire de bactériologie fait partie du LABM B2P : Biochimie, hématologie, bactériologie, parasitologie.



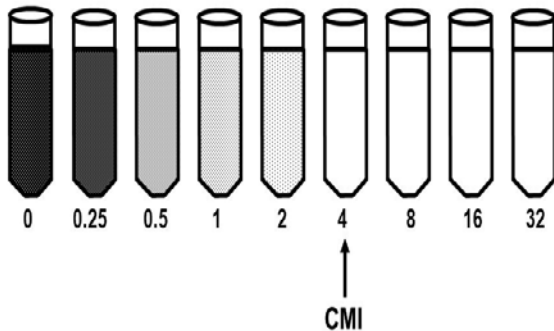
- La 1ère visite du COFRAC a eu lieu en janvier et puis mars 2017.
- L'examen cyto bactériologique des urines qui intègre l'AST Phoenix (5ème Sous-processus) représente plus de 20% de l'activité du service.



MÉTHODE DE L'AST PHOENIX

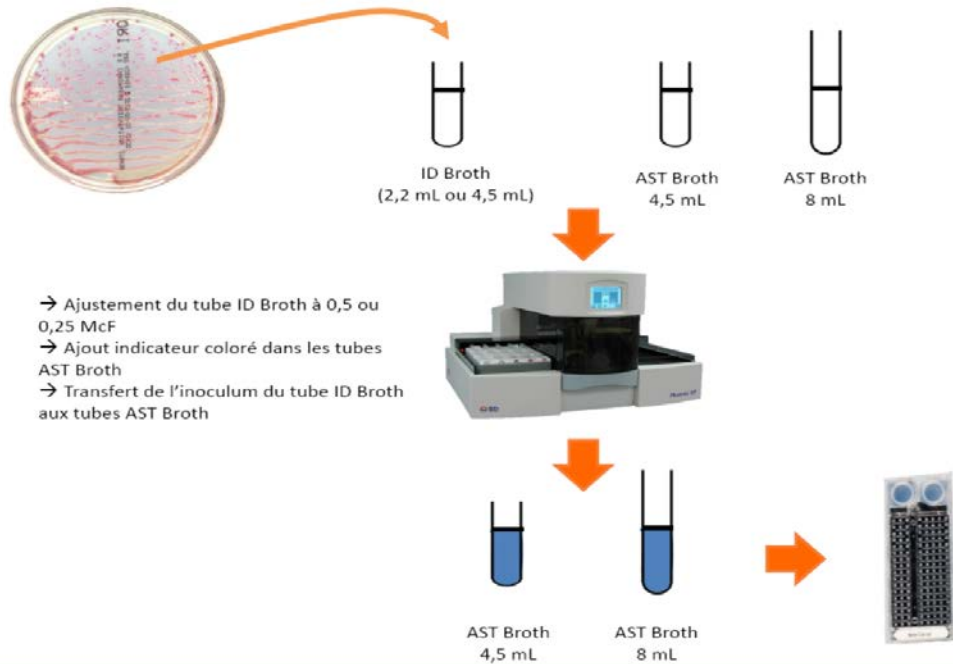
- Méthode qualitative : Rendu de résultat en « S », « I », « R » et une CMI
- Méthode semi-automatique : la préparation de la suspension bactérienne reste manuelle.
- Basée sur la détermination de la CMI : CMI vraie en milieu liquide
- Marquage CE : corrélée à la méthode de référence

Détermination de la CMI



CMI : Concentration dans le **premier tube** pour lequel il n'y a pas de croissance visible après 24h à 37°C

11



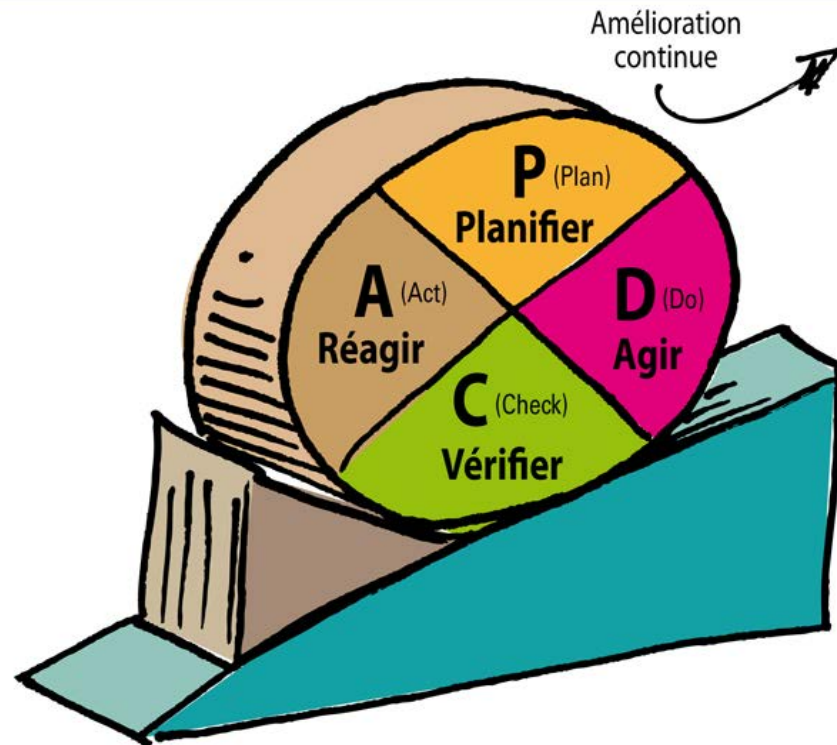
MÉTHODE DE L'AST PHOENIX

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande :	Croissance bactérienne en présence d'antibiotique en milieu liquide
Principe de la Méthode :	Inhibition de croissance en milieu liquide en présence d'une certaine concentration d'antibiotiques, après incubation. Méthode automatisée qualitative
Type d'échantillon primaire :	Culture bactérienne
Type de récipient, additifs :	Milieu de culture gélosé
Prétraitement de l'échantillon :	Colonies isolées de bactéries non exigeantes pour préparation d'un <u>inoculum</u> trouble.
Unités :	Détermination de la CMI en µg/ml Expression des résultats en S.I.R selon les recommandations du CA-SFM 2016 (21)
Intervalle de référence :	NA
Marquage CE (Oui/Non) :	Oui
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	Non
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	Bd Phoenix 100 BD Phoenix AP
Référence du réactif :	448795 Panel BGN : N-417 Panel GP : P-96
Matériau d'étalonnage (références) :	4 Souches ATCC référencées par le fournisseur : - <u>Pseudomonas aeruginosa</u> ATCC 27853 - <u>Escherichia coli</u> ATCC 25922 - <u>Enterococcus faecalis</u> ATCC 29212 - <u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 29213
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	NA



MÉTHODOLOGIE

Cycle PDCA / La roue de Deming



PLAN : QQQQCP

○ QUOI:

- Depuis l'arrivée du Phoenix au laboratoire (transfert d'un autre laboratoire), La validation de méthode n'a été faite que partiellement et sans traçabilité.
- Technique utilisée partiellement pour un seul type de germe et un seul type de prélèvement.
- Deux panels : NMIC 417 et PMIC 96
- Exigences norme ISO 15189
- Conforme pour une utilisation en routine, pour tous les germes et pour tous types de prélèvement ???

○ QUI :

- 1 biologiste responsable de l'accréditation de l'ECBU (Etude cyto bactériologique des urines) dont le Phoenix représente le 5 ème sous processus.
- 2 techniciennes référents Phoenix,
- Techniciens des différents secteurs
- Biologistes et internes



PLAN : QQQQCP

○ OU :

- Laboratoire de Bactériologie – Virologie –Hygiène de l'hôpital Lariboisière sur tous les secteurs

○ Quand :

- Cette étude a commencé juste après la visite du COFRAC qui avait formulé des axes d'améliorations et des remarques concernant la validation incomplète du Panel des BGN ainsi que l'absence de règles ni conduite à tenir précise pour lancer des tests complémentaires.
- Elle s'étale de janvier 2017 à Mars pour la vérification des performances et l'analyse des profils BLSE s'étend jusqu'en septembre 2017.

○ Comment :

- Vérification initiale pour les entérobactéries autres qu'E.coli et le panel des Grams positifs.
- Mise en place des CIQ et compléter la liste des souches CIQ utilisées dans le laboratoire.
- Mettre en place un calendrier de passage des CIQ .
- Etude bibliographique et utilisation de la documentation mise à disposition.
- Rédaction de documents de travail liés à l'utilisation, la maintenance, les CIQ ainsi que la validation biologique.
- Identification des éléments à maîtriser pour la validation biologique par l'étude bibliographique, à confirmer en pratique par l'essai sur site
- Formation du personnel



PLAN : QQQQCP

○ Pourquoi :

- Respect des exigences normatives (norme ISO 15189)
- Vérification initiale des performances : (chapitres 5.3 et 5.5 de la norme
- La validation de méthode actuelle n'est que partielle, elle n'inclue pas les autres germes de la galerie.
- Problème de mise à jour et application des nouvelles recommandations du CA-SFM 2015-2016 (changement de charge des disques d'antibiotiques) en AST solide et donc nécessité d'utiliser l'AST Phoenix
- Utilisation plus exhaustive de l'antibiogramme en milieu liquide sur tous type de prélèvements et pour toutes les bactéries du panel. (objectif : 70% antibiogrammes en milieu liquide,
- Harmonisation de la validation biologique et l'interprétation des résultats rendus par le Phoenix.



MAITRISE DES RISQUES

5 M	Points critiques	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
Echantillon	Matière Pureté de la souche et Colonies isolées en quantité suffisante	Réisolement si pas assez de colonies	Vérification de la pureté par le réisolement fait en parallèle à l'antibiogramme
	Age de la culture	ATG fait généralement à 24H	Procédure de réalisation de l'ECBU
	Viabilité de la souche	milieu de culture URI4	
Milieu	Condition de conservation des échantillons et des réactifs	Méetrologie: suivi des enceintes : stockage à 4° et à T° ambiante	Suivi des températures de zones de stockage Surveillance des températures ambiantes
	Exigences environnementales pour l'appareil	T° entre 18C° et 30°	Surveillance des températures ambiantes
	Système électrique	Eviter les coupures électriques	Appareil branché sur courant ondulé
Matériel	Surveillance des dérives	Gestion CIQ/EEQ	Procédure de gestion des CIQ en bactériologie
	Maintenance de l'automate	Périodicité des maintenances	Maintenances enregistrées sur Kalilab
	Archivage	Support de sauvegarde	Procédure sauvegarde des données
	Connexions et transmission des résultats	Vérification des connexions	Procédure utilisation du SIL
Méthode	Limites de la méthode	Instructions diffusées Recommandations des sociétés savantes	REMIC+ Bibliographie
	Mode opératoire, interprétation, validation	Disponibilité du mode opératoire	Mode opératoire connu
Main d'oeuvre	Compétence et maintien de compétence du personnel technicien et biologiste	Formation, évaluation des compétences du personnel. Passage des CIQ/EEQ Habilitation du personnel	Procédure d'habilitation initiale Instruction interne de gestion des CIQ/EEQ
	Compétence du personnel médical	Validation biologique	Connaissance de l'interprétation selon référentiel en vigueur CA-SFM et EUCAST

DO : EVALUATION DES PERFORMANCES

DESCRIPTION DU PRECESSUS		
Vérification de méthode en portée A de l'AST Phoenix		
Modalités de vérification de méthode	E, B, NA	Commentaire
1- Répétabilité	Essai	Essai sur site sur les 4 souches ATCC (CIQ)
2- Fidélité intermédiaire	Essai	Résultats des passages des CIQ
3- Variabilité inter-opérateur	NA	Technique automatisée
4- Justesse	NA	Absence de CIQ externalisés
5- Exactitude	Essai	Discordance par rapport à des valeurs de références /EEQ
6- Sensibilité et spécificité analytique	Bibliographie + Essai	Etude bibliographique. Essai sur le test BLSE
7- Incertitude de mesure	NA	Non pertinent car interprétation avec un phénotype globale de résistance
8- Limite de détection	NA	L'AST est fait à partir de suspension bactérienne <u>riche</u>
9- Etendue de mesure	NP	La gamme de dilution est connue pour chaque antibiotique et déterminée par le fournisseur
10- Comparaison de méthode	Essai + Bibliographie	Comparaison par rapport à la méthode utilisée au laboratoire : AST en milieu gélosé
11- Interférences	NA	
12- Contamination	NA	<ul style="list-style-type: none"> - L'antibiogramme est fait à partir de souche pure, un <u>réisolement</u> de la suspension est fait pour vérifier la pureté de la souche - Utilisation de cônes uniques.
13- Robustesse	Essai	<ul style="list-style-type: none"> - A partir de colonies de plus de 24H → non pertinent car laboratoire ouvert 7jrs /7 - A partir de différents milieux de culture (Essai de comparaison de méthode)
14- Intervalle de référence	Bibliographie	Les CMI permettant la catégorisation des germes en « S », « I » ou « R » sont définies par le CA-SFM EUCAST 2016 (21)



DO : EVALUATION DES PERFORMANCES

1- Répétabilité:

- 4 CIQ=4 souches ATCC
- 10 passages simultanés par souche
- Résultats exprimés en concordance moyenne

Souches ATCC	ATCC 25922 <u>Escherichia coli</u> MIC-417	ATCC 27853 <u>Pseudomonas</u> <u>aeruginosa</u> MIC-417	ATCC 29213 Staphylococcus aureus MIC-96	ATCC 29212 <u>Enterococcusfaecalis</u> MIC-96
%CT moyenne	100%	97%	98%	95%
%CC moyenne	100%	100%	100%	100%

2- Fidélité intermédiaire:

- Passage bimensuel des CIQ = 4 ATCC selon le calendrier des CIQ de bactériologie mis en place
- Résultats de 20 passages de CIQ

Souches ATCC	ATCC 25922 <u>Escherichia coli</u> MIC-417	ATCC 27853 <u>Pseudomonas</u> <u>aeruginosa</u> MIC-417	ATCC 29213 Staphylococcus aureus MIC-96	ATCC 29212 <u>Enterococcusfaecalis</u> MIC-96
%CT moyenne	98%	100%	98%	95%
%CC moyenne	100%	100%	100%	100%

Conclusion :

Résultats conformes aux besoins du laboratoire et aux exigences de la norme



DO : EVALUATION DES PERFORMANCES

3- Comparaison de méthode :

Echantillon :

- Comparaison entre AST Phoenix et AST diffusion en milieu gélosé

- 80 souches de profil connu :

44 souches d'entérobactéries

9 souches de *Pseudomonas aeruginosa*

14 souches de *Staphylococcus* spp

12 souches d'*Enterococcus* spp

Objectif :

concordance de classe est supérieure ou égale à **90 %** et moins de **5%** d'écart majeur

Résultats :

	AMP	AMC	TIC	TCC	TZP	MEC	CEF	FOX	CXM	CFM	CAZ	CRO	FEP	ATM
CC	100,0	95,2	92,2	90,2	92,2	100,0	97,6	97,6	95,2	85,7	94,1	95,2	96,1	88,2
ME	0,0	2,4	5,9	2,0	2,0	0,0	0,0	0,0	4,8	4,8	3,9	4,8	0,0	0,0
MinE	2,4	2,4	0,0	2,0	5,9	0,0	2,4	2,4	2,4	9,5	2,0	0,0	3,9	7,8
VME	0,0	0,0	2,0	5,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0
	IMP	MER	ERT	AMK	TOB	GEN	AN	CIP	LVX	LOR	TIG	COL	FOS	MOYENNE
CC	94,1	100,0	95,2	100,0	98,0	98,0	100,0	98,0	98,0	100,0	100,0	97,6	98,0	96,2%
ME	2,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	2,0	2,0	0,0	0,0	0,0	2,0	1,6%
MinE	3,9	0,0	2,4	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,4	0,0	1,8%
VME	0,0	0,0	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4%

Conclusion :

Résultats conformes aux besoins du laboratoire et aux exigences de la norme

DO : EVALUATION DES PERFORMANCES

4- Exactitude :

- Evaluée grâce aux EEQ
- 1 EEQ ECBU 4 fois/an

Essai	Titre de l'essai	Période d'essai	MinE	ME	VME	CLASSEMENT
17M80,1	ECBU	Janvier 2017	1	0	0	A
17M80,2	ECBU	Mars 2017	0	0	0	A
17M80,3	ECBU	Aout 2017	0	0	0	A

Conclusion :

Résultats conformes aux besoins du laboratoire et aux exigences de la norme

5- Robustesse :

- Age de la colonie :
 - ✓ Aucune discordance n'a été observée lorsque l'ATS est fait sur des colonies de plus de 24h.
 - ✓ Non pertinent : laboratoire de bactériologie ouvert 7j/7.

- Type de milieu de culture:

Lors de la comparaison de méthode, nous avons travaillé sur différents milieux de cultures, aucune discordance n'a été constatée.



DO : MAITRISE DES RISQUES POST-ANALYTIQUES : VALIDATION BIOLOGIQUE :

- Problème de validation biologique :
 - visualisation des profils et mécanismes de résistance (AST milieu gélosé) → valeurs CMI interprétées S, I, R (AST Phoenix).
- Fiabilité des tests de dépistage de BMR de l'AST Phoenix : (BLSE)
 - La revue bibliographique montre une grande sensibilité (96%) avec une spécificité discutable selon le type de germe.
- Fiabilité du rendu de résultats de certains antibiotiques :
 - Revue bibliographique montre des discordances majeurs pour l'étude de la sensibilité à la témocilline (non rendu par le laboratoire)

1- Performance du test BLSE du Phoenix :

- La BLSE est une enzyme plasmidique acquise par la bactérie qui confère, à des degrés différents une résistances aux bêtalactamines (Céphalosporines de 3ème génération incluses), épargnant les inhibiteurs de bêtalactamases (AMC, TZP), la céfoxitine (FOX) et les carbapénèmes.
- Test BLSE AST Phoenix basé sur l'inhibition des céphalosporines de 2ème et 3ème générations utilisées seules ou en présence d'acide clavulanique.
- Evaluation sur site avec des souches connue BLSE et tests complémentaires lorsqu'une BLSE est rendue par le Phoenix

Résultats :

- On note une sensibilité de 94%, ce chiffre varie en fonction des espèces, **99%** pour E.coli, **100%** pour K.pneumoniae et seulement **40%** pour les Enterobacter spp.
- Par ailleurs, pour **18** souches rendues BLSE par le Phoenix et contrôlées par des tests complémentaires, aucune BLSE n'a été mise en évidence.



DO : MAITRISE DES RISQUES POST-ANALYTIQUES : VALIDATION BIOLOGIQUE :

2- Etude de la sensibilité à laTémocilline :

Ancienne bétalactamine abandonnée à cause de son spectre étroit.

Regain d'intérêt depuis l'émergence des BMR et BHRe → sensibilité en cas de BLSE et BHRe rapportée dans la littérature

Essai sur site sur 168 souches : comparaison avec une CMI en E.test

Résultats :

- Sur les 50 souches rendues sensibles par le Phoenix, on retrouve **100%** de concordance de classe (CC).
- Sur les 118 souches rendues résistantes, on retrouve **44%** de CC, les discordances majeures (résultat sensible S rendu résistant R) représentent **42%** et les discordances mineures (changement de l'interprétation R → S à une dilution près pour des valeurs autour du seuil) représentent **13.50%**.



CHECK : DISCUSSION

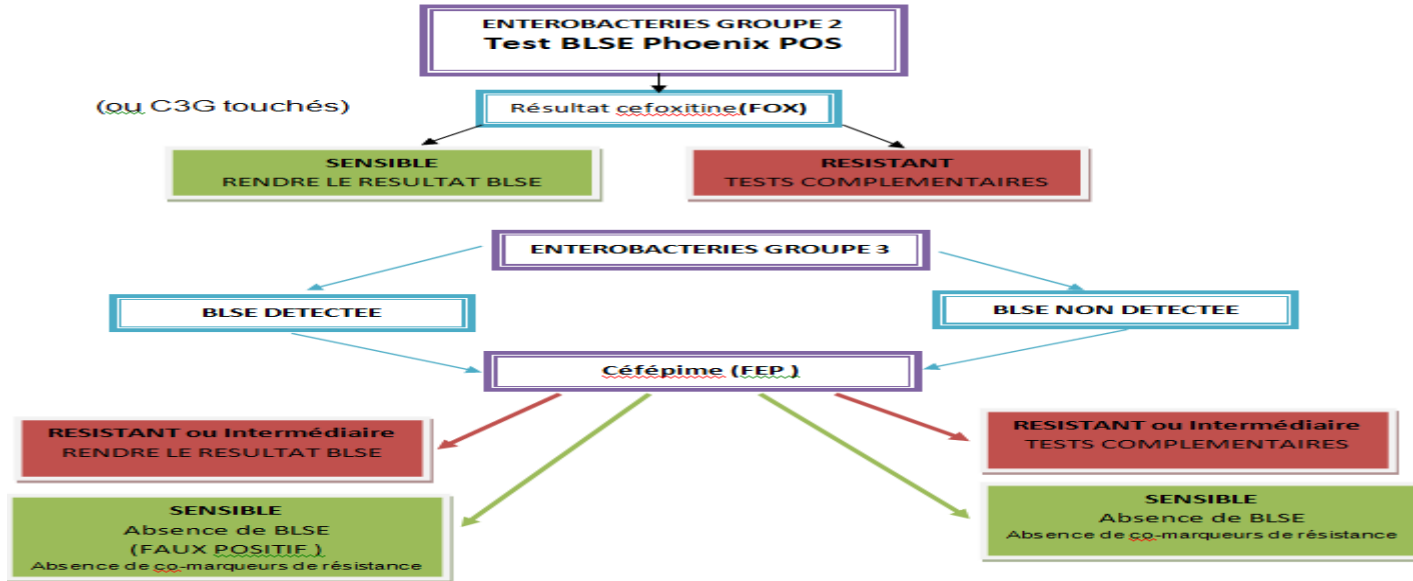
- Les documents liés à l'utilisation du Phoenix ont été rédigés dès les premières utilisations du Phoenix .
- Nous avons élargi le nombre de CIQ de 1 souche ATCC utilisée au départ, à 4 souches ATCC (recommandation fournisseur) couvrant l'ensemble des bactéries dont l'antibiogramme peut être réalisé sur le Phoenix.
- Une procédure pour l'enregistrement et l'interprétation des CIQ Phoenix ainsi qu'un calendrier de passage des CIQ ont été rédigés par le biologiste.

- **Vérification des performances :**
- La vérification des performances du Phoenix utilisé pour la détermination de la sensibilité aux antibiotiques est conforme aux objectifs du laboratoire.
- Cette évaluation in situ a permis notamment d'évaluer la concordance globale de nos deux méthodes d'étude de la sensibilité aux antibiotiques à 96%.
- La comparaison de méthode et l'étude de la robustesse ont permis aux techniciens de se familiariser avec cet outil et de généraliser son utilisation sur tout type de prélèvements et tout type de bactéries.

- **Analyse des risques pour la validation biologique :**
- Les résultats obtenus dans notre laboratoire confortent ceux de la bibliographie.
- La bonne sensibilité et spécificité du test BLSE du Phoenix pour les entérobactéries du groupe 2 (K.pneumoniae, E.coli, Citrobacter) permet son utilisation en routine
- Pour les Enterobactéries productrices de céphalosporinase chromosomique (entérobactéries du groupe 3) ou plasmidique , la sensibilité et la spécificité sont moindres et nécessitent des tests complémentaires.
- L'analyse des résultats de cette étude ont conduit à un algorithme décisionnel lors de détection de BLSE et pour le rendu de la témocilline.

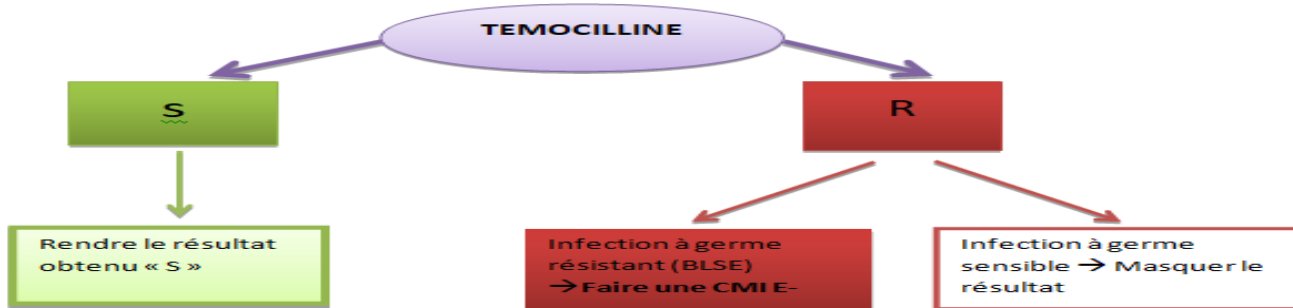


CHECK : DISCUSSION



Algorithme décisionnel pour la validation biologique des antibiogrammes rendus par le Phoenix lors de la suspicion de BLSE (bétalactamase à spectre étendue)

27



Algorithme décisionnel pour la validation biologique de la témocilline rendu par le Phoenix



ACT : CE QUI RESTE A FAIRE

- le suivi de l'exactitude et de la fidélité intermédiaire doit se poursuivre.
- Le document sur la gestion des pannes et l'étude d'impacte est en cours de rédaction.
- Il y a un travail à faire au niveau des biologistes pour la vérification et le suivi des résultats de CIQ car le suivi se fait au niveau de l'appareil.
- Il faut continuer à analyser les résultats rendus par le Phoenix et les règles déclenchées afin de vérifier la performance du système expert pour une meilleure maîtrise de cet outil.
- La comparaison de méthode doit continuer car certaines données sont insuffisantes pour être exploitées (données sur les Gram positifs et les mécanismes de résistances)
- Les algorithmes décisionnels pour la validation biologique seront mis en place dans les prochains jours, la procédure correspondante n'a pas été rédigée.
- Il reste à définir quels tests complémentaires à faire pour valider les algorithmes décisionnels et tester les algorithmes au quotidien en gardant un œil critique sur les résultats rendus dans le but d'harmoniser la validation biologique entre biologistes
- Les résultats présentés dans ce mémoire sont encore bruts, un travail d'analyse des données est encore à faire et une publication scientifique est à envisager.



Merci pour votre attention

