

Université Pierre et Marie Curie

Sorbonne Universités

MEMOIRE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME UNIVERSITAIRE

« ASSURANCE QUALITE AU LABORATOIRE

DE BIOLOGIE MEDICALE »

**VALIDATION D'UNE METHODE QUALITATIVE EN
BACTERIOLOGIE**

**LA DETECTION DE L'ANTIGENE SPECIFIQUE DU
CLOSTRIDIUM. DIFFICILE DANS LES SELLES**

« *C.difficile GDH ImmunoCard®* »

LAYKA Ayham
Année 2016-2017

Note au lecteur

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

Les opinions exprimées n'engagent que les auteurs.

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

Auteur du mémoire

Ayham LAYKA

Praticien hospitalier contractuel

Responsable et Référent qualité

Secteur de bactériologie

Laboratoire de biologie médicale

Hôpital Le Corbusier

Firminy



Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur Michel VAUBOURDOLLE et le Docteur Pascal PERNET pour m'avoir permis de suivre l'enseignement de ce Diplôme Universitaire, tous les intervenants qui ont animé cette formation pour la qualité de leurs enseignements. Je souhaite également remercier l'ensemble des participants du D.U. pour nos échanges et leur bonne humeur.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire pour leurs accueils chaleureux. En particulier, les techniciennes du secteur de bactériologie pour leur collaboration ainsi que les techniciens de garde pour leurs soutiens et leurs aides. Remerciements aux biologistes, Dr. GAY et Dr.AOUFFEN, ainsi que Mme FLATTIN, cadre de santé et responsable d'assurance qualité, pour leurs conseils, leurs soutiens et leurs disponibilités.

Je remercie aussi Mme BONHOMME de la société Méridian® pour m'avoir fait parvenir les documents nécessaires à la réalisation de ce travail.

Enfin, merci à mes amis qui ont apporté un avis critique sur ce mémoire et qui m'ont soutenu dans la rédaction de celui-ci.

SOMMAIRE

<u>I. INTRODUCTION</u>	7
<u>II. PRESENTATION DE L'ETUDE</u>	10
<u>1. La structure</u>	10
<u>2. La politique qualité du laboratoire</u>	11
<u>3. Validation d'une méthode qualitative en portée A</u>	12
<u>4. Intérêt et objectif de l'étude</u>	14
<u>5. Déroulement de l'étude</u>	16
<u>III. METHODOLOGIE</u>	17
<u>1. Description de la méthode</u>	17
<u>2. Analyse de risques</u>	18
<u>3. Vérification de performances de la méthode</u>	23
<u>IV. RESULTATS ET INTERPRETATIONS</u>	27
<u>1. Maitrise de risques</u>	27
<u>2. Etude rétrospective</u>	32
<u>3. Performance de la méthode</u>	33
<u>4. Démarche de la validation de méthode</u>	33
<u>V. CONCLUSION</u>	32
<u>VI. BIBLIOGRAPHIE</u>	35
<u>VII. ANNEXES</u>	37
<u>VIII. RESUME</u>	680

GLOSSAIRE

CAI : Comité des anti-Infectieux

CE : Commission Européenne

CEQ : Contrôle Externe de Qualité

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

CLIN : Comité de Lutte contre les Infections nosocomiales

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

DM-DIV : Dispositif médical de diagnostic in vitro

EEQ : Evaluation Externe de Qualité

ESCMID : European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

ETP : Effectif Temps Plein

GDH : Glutamate DésHydrogénase

HAS : Haute Autorité de Santé

ICD : Infection à *Clostridium difficile*

PSM : Poste de Sécurité en Microbiologie

ISO : Organisation International de Normalisation

LBM : Laboratoire de biologie médicale

QUAMIC : Comité Qualité de la Société Française de Microbiologie

RAC : Responsable d'Assurance Qualité

SIL : Système Informatique de laboratoire

I. INTRODUCTION

L'ordonnance du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale a été ratifiée par la loi du 30 mai 2013 portant la réforme de la biologie médicale [1] [2]. Cette réforme a pour but de permettre à chacun d'avoir accès à une biologie médicale de qualité prouvée. Cet objectif nécessite d'harmoniser les pratiques dans les laboratoires de biologie médicale par une accréditation obligatoire. Suite à cette réforme, tout LBM doit être accrédité par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) et cela selon la norme NF EN ISO 15189[3], dernière version de 2012. Cette norme spécifie les exigences concernant le système qualité (exigences relatives au management abordées dans le chapitre 4) et les compétences techniques (exigences techniques abordées dans le chapitre 5) applicables aux LBM, cette accréditation exige la mise en place d'un système de management de la qualité par l'approche processus :

- Processus de management (de pilotage ou de direction)
- Processus de réalisation (examen de biologie médicale)
- Processus de support (de soutien : ressources humaines, achat, informatique, ...)

La notion de la qualité existait depuis longtemps dans le domaine de la biologie médicale en France. Avec la réforme, la qualité est devenue une culture de management au quotidien et le cœur du métier de biologiste, c'est pourquoi j'ai voulu suivre l'enseignement de ce Diplôme Universitaire.

L'accréditation en bactériologie est particulière et plus difficile que dans d'autres domaines du fait que les techniques sont majoritairement manuelles ou semi automatisées. De plus, les méthodes sont principalement qualitatives et donc opérateur-dépendantes, d'où l'importance de la maîtrise des risques pour l'accréditation en Bactériologie.

Clostridium difficile est un bacille, anaérobie, à gram positif. Les souches pathogènes ont la propriété de produire les toxines A et B[4]. La recherche de *C. difficile* pour toutes les diarrhées de patients adultes, prescrites au-delà du 3^{ème} jour d'hospitalisation doit être systématique [5].

Le diagnostic de l'infection à *C. difficile* (ICD) dépend de la recherche des souches exclusivement dites toxigènes (productrices des toxines A/B) dans les

selles des patients. Cette recherche exige un test de cytotoxicité et/ou une culture toxigénique de selles (méthode de référence qui requiert 2 à 4 jours) ou la détection des toxines par des tests immunoenzymatiques (peu sensibles et coûteux) et/ou des tests moléculaire (coûteux) [6].

La détection de l'antigène Glutamate DésHydrogénase (GDH), enzyme métabolique, dans les selles est un test très sensible et rapide (environ 30 minutes) qui permet de dépister les patients porteurs de *C. difficile* [6].

Ce test, s'il est positif, doit être suivi par les tests précédemment cités du fait de sa faible spécificité (il détecte les souches toxigènes et non toxigènes). Par contre, un résultat négatif de ce test permet d'exclure une ICD (excellente valeur prédictive négative) et donc d'économiser du temps et de réduire les coûts des examens à la recherche de la toxine [6].

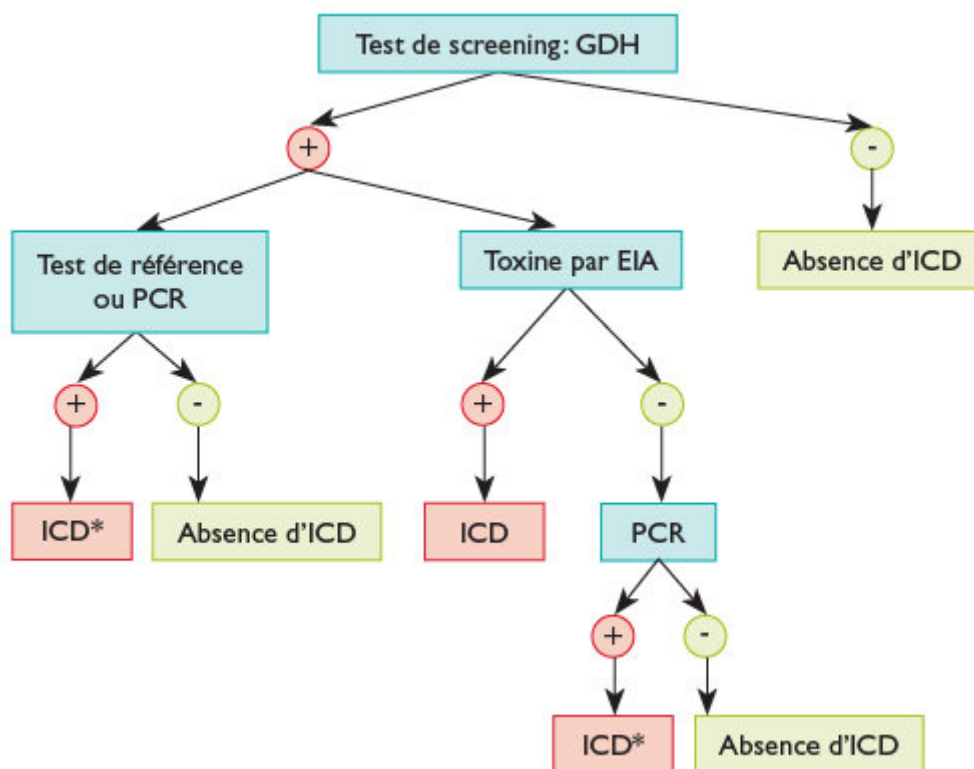


Figure 1 : Algorithme de diagnostic de l'infection au *C. difficile*.

L'objectif de ce mémoire est d'établir un dossier de vérification de méthode qualitative (portée d'accréditation type A) en utilisant le formulaire SH FORM 43[7].

Pour traiter ce sujet, j'ai utilisé le diagramme d'Ishikawa (méthode des 5M) comme un outil d'approche méthodique pour la maîtrise des risques. Ensuite, j'ai suivi les recommandations des guides techniques d'accréditation du COFRAC [8] et celles du Comité Qualité de la société française de Microbiologie (QUAMIC) [9].

Ce travail a été réalisé en trois étapes :

- réunir les documents de travail
- mise en conformité de l'examen
- remplir le dossier COFRAC de validation/ vérification de méthode

Période	Action	Responsable
Mai-Juin	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Réunir les documents de travail : <ul style="list-style-type: none"> - Référentiels - Bibliographiques, - Guides techniques, - Documents fournisseur - SH FORM 43 - Recommandations de sociétés savantes : HAS, SFBC, ESCMID 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Biologiste
Juillet-août	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Etude rétrospective ➤ Analyse de risques 5 M ➤ Révision et rédaction de la procédure 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Biologiste/ technicienne ➤ Biologiste ➤ Biologiste/ technicienne
Septembre	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Remplir le SH FORM43 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Biologiste/ Technicienne

II. PRESENTATION DE L'ETUDE

1. La structure

Au sein de la région Rhône-Alpes-Auvergne, l'Hôpital Le Corbusier à Firminy « qui prends le pseudonyme de l'architecte connu » dessert un bassin d'environ 130 000 habitants et joue pleinement son rôle de proximité pour répondre aux besoins de cette population.



Le laboratoire de biologie médicale est intégré au Pôle Médico-Technique de l'établissement et est installé dans de nouveaux locaux au deuxième étage du bâtiment C de l'hôpital depuis 2015. Le laboratoire fonctionne 24H/24 et 7j/7 et réalise les examens, majoritairement, pour les patients hospitalisés et, en partie, pour les patients externes. Les examens spécialisés sont transmis vers des laboratoires sous-traitants ; notamment le CHU de Saint Etienne et le laboratoire privé Biomnis® de Lyon.

L'activité globale du laboratoire est de 14 millions de B par an avec une moyenne de 300 à 400 dossiers par jour, il est organisé en 3 secteurs :

- Biochimie - Immunologie
- Hématocytologie – Hémostase - Immunohématologie
- Bactériologie

La prise en charge des prélèvements est assurée par un poste de tri commun. Le laboratoire gère également le dépôt de sang d'urgence de l'hôpital. L'équipe est composée de dix-sept techniciens (15,9 ETP) dont quatre dans le secteur de bactériologie, de trois secrétaires, d'une qualicienne, d'unecadre de santé, d'un ASH et de trois biologistes (2.6 ETP).

Les trois praticiens sont polyvalents mais chacun est responsable d'un secteur et, par conséquent, référent qualité de celui-ci (cf. Annexe I). De plus, les biologistes ont des activités spécifiques : hématovigilance, réactovigilance et la participation aux activités transversales (CLIN, CAI).

2. La politique qualité du laboratoire

Le laboratoire est entré dans la démarche qualité par la voie B, il a obtenu en 2012 la qualification Bio qualité puis il a obtenu, par le COFRAC, la validation de la preuve de son entrée dans la démarche d'accréditation en 2013. La demande d'accréditation initiale a été déposée en 2015 suite aux retards des projets de déménagement et de changement d'informatique.

En 2016, le laboratoire a obtenu son accréditation initiale, environ 60% de l'activité du laboratoire, principalement pour les familles de biochimie et d'hématologie.

La politique du laboratoire de l'hôpital Le Corbusier – Firminy est d'assurer une activité de biologie médicale polyvalente et accréditée, tout en maintenant son activité d'hygiène hospitalière et sa gestion du dépôt de sang d'urgence vitale.

Cette politique qualité est axée sur la satisfaction aux exigences de ses clients et des référentiels qualités (ISO 15189 et SH-REF02), au développement de l'activité externe et également à affirmer sa qualité de laboratoire hospitalier de proximité.

Cette politique se traduit par des objectifs définis comme suit :

- Améliorer la satisfaction des prescripteurs et des patients,
- Améliorer la fiabilité des résultats d'examen,
- Améliorer les pratiques en suivant les non conformités et les réclamations,
- Respecter le calendrier réglementaire d'accréditation (Accréditation complète d'ici 2020),
- Rencontrer régulièrement les prescripteurs en commission de biologie (1 fois /an),
- Améliorer l'obtention des renseignements cliniques,
- Rendre les résultats du service des urgences en 1 heure,
- Rendre les résultats des examens de routine en début d'après-midi,
- Accueillir les patients de médecine de ville,
- Améliorer le rendu des résultats aux médecins de ville.

Le suivi de cette politique et des objectifs associés est assuré par l'intermédiaire de la mise en place d'indicateurs qualité pertinents, de revues de direction et d'audits internes et externes.

L'objectif principal est l'accréditation totale de son activité avant le 1^{er} novembre 2020. Pour pouvoir respecter le calendrier prévisionnel d'accréditation donné par le COFRAC, nous souhaiterions, sur la même lancée que la détection de la GDH, effectuer les dossiers de validation de méthode des autres techniques manuelles réalisées en Bactériologie.

3. Validation d'une méthode qualitative de portée A

Une méthode qualitative est une méthode qui génère un résultat non quantifiable résultant de données non numériques c'est-à-dire sur la présence ou l'absence de l'analyte.

Le **SH REF 02**[10] est une compilation d'exigences organisationnelles et techniques relatives à la pratique de la biologie médicale, celui-ci a pour objectif de préciser et d'explicitier les exigences de la norme EN NF ISO 15189.

5.5. Processus analytiques :

5.5.1.1 - Chaque examen réalisé par une méthode quantitative ou qualitative doit être validé /vérifié.

5.5.1.2 - Dans le cas de l'utilisation des méthodes reconnues, [...] la validation des méthodes utilisées par le laboratoire est réduite à une « vérification sur site » pour s'assurer que les performances attendues sont atteintes dans les conditions de travail du laboratoire. Le laboratoire peut dans ce cas revendiquer une portée flexible standard de type A.

Le SH REF 08[11] précise les types de portée d'accréditation et les modalités d'évaluation par le COFRAC.

Définitions :

Portée flexible standard (A) : portée correspondant à une demande d'accréditation du laboratoire souhaitant avoir la possibilité, entre 2 visites d'évaluation du Cofrac, d'utiliser sous accréditation les révisions successives de méthodes reconnues et

d'adopter les méthodes reconnues reposant sur des compétences qu'il a précédemment démontrées.

Adopter une méthode : intégrer dans la portée d'accréditation une méthode reconnue normalisée, méthodes/ équipement /réactifs « fournisseur » correspondant à l'utilisation de DM-DIV marqués CE au titre de la directive 98/79/CE, ...).

La lecture du **SH REF 02** est à approfondir par celles des guides techniques d'accréditation du COFRAC : **SH GTA 01, 06, 14**[12] [13] [14] et notamment **SH GTA 04**[15] qui explicite les exigences de la norme EN NF ISO 15189 concernant la vérification et la validation des méthodes en biologie médicale, en ce fondant sur les bonnes pratiques dans ce domaine (état de l'art).

SH GTA 01[12] :

5.5 - Processus analytiques

5.5.1 - Sélection, vérification et validation des procédures analytiques

5.5.1.1 - Généralités

Le laboratoire peut s'appuyer sur le document COFRAC SH GTA 04. D'autres guides reconnus peuvent être employés (recommandations sociétés savantes, publications, ...).

En bactériologie, parasitologie et mycologie, ainsi qu'en virologie, le laboratoire peut s'appuyer sur les documents de références REMIC.

Prétraitement des échantillons biologiques : les préconisations du fournisseur des réactifs, équipements et systèmes analytiques sont à prendre en tant que recommandations à minima pour la réalisation de prétraitement.

5.5.1.4 - Incertitude de mesures et grandeurs mesurées

Il est rappelé que pour les examens de type qualitatif, l'évaluation des incertitudes est à minima évaluée à l'aide d'une analyse de risque (type diagramme des 5 M, points critiques).

SH GTA 06 : Maitrise de la qualité des méthodes de type qualitatif [13]

Pour les examens qualitatifs, la maîtrise des résultats et du processus analytique pourra être plus complexe que pour les examens de type quantitatif et nécessitera la mise en œuvre de moyens divers, autre que les CIQ et les EEQ. Les sources de variation sont nombreuses et les différentes étapes du processus seront à

maitriser. La criticité est variable en fonction de chaque méthodes ; il incombe au laboratoire de définir pour chaque méthode les conditions et la maîtrise de chacune des données d'entrée susceptible d'affecter les résultats.

L'analyse des risques d'un processus a pour objectif d'identifier les étapes critiques et, par la suite, de définir les moyens mis en place pour les maîtriser.

SH GTA 14 : Analyse du processus [14]

Le diagramme de 5 M peut être utilisé pour identifier les principaux facteurs d'incertitude susceptibles d'influencer significativement le résultat, y compris ceux dont la quantification se révèle difficile, voir impossible. Il s'agit d'un outil d'aide à l'analyse du processus de mesure qui permet d'examiner le processus à l'aide de 5 éléments (Moyens, Milieu, Méthode, Main d'œuvre, Matière).

Le but de la vérification des performances d'une méthode est de démontrer que cette méthode fonctionne correctement dans les conditions opératoires du laboratoire.

SH GTA 04 : Vérification des performances sur site [15]

Il appartient au biologiste de se référer à la documentation technique du fournisseur (notices, fiches techniques, références bibliographique, ...). Ce travail d'expertise est une partie intégrante du métier de biologiste médicale.

9.6.2 *Vérification d'une méthode qualitative*

Dans le cadre d'une technique qualitative, la vérification expérimentale sur site est plus réduite, et s'appuie fortement sur des études de risques (méthode de 5M), sur l'habilitation des opérateurs, ou sur l'étude des performances des Evaluation Externes de la qualité.

4. Intérêt et objectif de l'étude

C. difficile est l'agent étiologique des diarrhées post antibiotiques et des colites pseudomembraneuses et c'est la première cause de diarrhées nosocomiales chez l'adulte[5].Le portage asymptomatique de souches toxigènes est fréquent chez les enfants de moins de 2 ans (30 à 80%) et rare chez l'adulte (1 à 3%) [4].

La recherche de *C.difficile* doit être systématique pour toutes les diarrhées survenant au-delà du 3^{ème} jour d'hospitalisation[5].

Le sujet de ce mémoire est la détection de l'antigène spécifique du *Clostridium Difficile* « *C.difficile GDH ImmunoCard®* » dans les selles des patients. Ce test ne différencie pas les souches toxigènes des souches non toxigènes, mais il a une excellente valeur prédictive négative qui permet d'exclure le diagnostic d'ICD. En revanche, du fait de sa faible spécificité, les résultats positifs doivent faire l'objet d'autres tests afin de détecter les souches toxigènes[6].

L'un des plus importants objectifs définis du laboratoire, c'est l'accréditation dans les délais réglementaires, pour cela, le calendrier prévisionnel est revu chaque année. Le laboratoire est mieux avancé en accréditation pour les examens de la biochimie et de l'hématologie que pour la bactériologie qui comporte seulement un examen accrédité. Le projet du laboratoire pour 2018 est de changer les automates « BactAlert et Vitek », ce qui impose avec le rapprochement de l'échéance du 1^{er} novembre 2020 d'avancer l'accréditation en bactériologie. Pour atteindre cet objectif et mieux planifier notre activité d'accréditation, on a programmé cette activité de sorte que notre secteur de bactériologie soit accrédité en 2018. Le planning prévisionnel de demande d'extension de notre laboratoire a été envoyé au COFRAC(cf. *Annexe II*).

L'objectif de ce travail est d'établir un dossier de validation de méthode en bactériologie, tout en respectant la norme ISO NF EN 15189 et en utilisant le SH FORM 43. Il s'agit d'une vérification d'une méthode reconnue en portée flexible A, puisque le laboratoire est déjà accrédité pour une technique semblable ; soit la recherche de l'antigène pneumocoque urinaire, qui figure sur la liste détaillée des examens couverts par l'accréditation (SH FORM 06) [16].

Selon le SH INF 50 [17], Cette méthode appartient à la ligne de portée BA7 de la sous famille Bactériologie.

SH INF 50 : Portées - types d'accréditation : Sous domaine : Microbiologie-Famille : Bactériologie (BACTH) :

Code	Nature de l'échantillon biologique	Nature de l'examen/analyse	Principe de la méthode	Référence de la méthode
BA7	Echantillon biologique d'origine humaine	Recherche et identification de toxines, d'antigènes bactériens ou d'enzymes spécifiques	Méthode de type qualitatif Immunoenzymatique	Méthode reconnue (A)

5. Déroulement de l'étude

La validation d'une méthode qualitative reconnue en bactériologie se base essentiellement sur la maîtrise des risques (5M) et sur l'habilitation des opérateurs. Cette étape est suivie par l'évaluation des critères de performance de cette méthode. L'évaluation s'appuie, en cas de dispositif médical de diagnostic in vitro (DM-DIV), sur les données fournisseur et la bibliographie.

Les personnes qui ont participé à la réalisation de cette vérification de méthode sont les deux techniciennes référents de bactériologie et moi-même. De plus, le référent métrologie est intervenu lors de la vérification des chronomètres.

J'ai réuni des documents pertinents et réalisé l'étude bibliographique ce qui m'a permis de procéder à l'analyse de risques (5M), à l'habilitation des techniciens et à l'évaluation de la performance de la méthode. De plus, j'ai également réalisé une étude rétrospective, avec l'aide d'une technicienne, sur 79 examens de GDH effectués au laboratoire du janvier au juin 2017.

La procédure a été révisée et modifiée par la technicienne Aurélie et approuvée par moi-même. Par la suite, nous avons rempli le formulaire SH FORM 43 ce qui m'a permis de déclarer apte l'utilisation de la méthode.

Cependant lors de ce projet, j'ai rencontré quelques problématiques. Tout d'abord, le manque d'effectif en biologiste qui ne permet pas d'assurer à la fois la démarche qualité et le travail de routine. Ensuite, j'ai été limité dans l'étude de la variabilité inter-opérateurs entre les techniciens de garde par le budget et le temps. De plus, pour les habilitations des techniciens, j'ai été confronté à des congés annuels, des arrêts maladies et au départ en formation du RAC.

III. METHODOLOGIE

1. Description de la méthode

ImmunoCardC. *difficile* GDH de la société Meridian® est un DM-DIV, il s'agit d'un système analytique commercialisé marqué CE sous forme de carte permettant de détecter la GDH dans les échantillons de selles humaines.

La mesure dépend d'une réaction immunoenzymatique sur support solide entre le conjugué enzymatique, du coffret ImmunoCard C. *difficile* GDH, et de l'antigène GDH, s'il est présent dans les selles. Le complexe GDH et l'anticorps anti-GDH-conjugué migrent à travers une membrane qui, après l'ajout de substrat, sont visualisés par le développement d'une coloration bleue. L'apparition de la couleur bleue dans le puits CONTROLE indique que le test s'est effectué correctement et que la lecture et l'interprétation du puits de TEST peut être réalisée.

La méthode est qualitative et les résultats sont lus visuellement. Le puits TEST apparaît en bleu lors de la présence de la GDH dans les selles du patient.

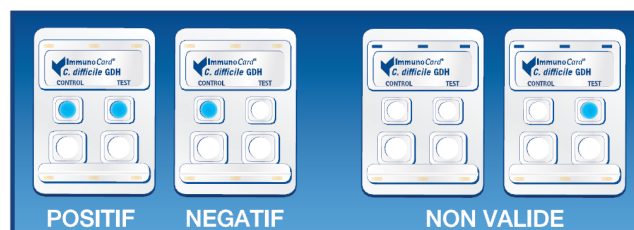


Figure 2 : Visualisation et interprétation du test.

2. Analyse des risques par la méthode des 5M

L'analyse des risques a été réalisée en utilisant la méthode des 5M appelé aussi diagramme d'Ishikawa. Les 5M sont la Matière, le Matériel, le Milieu, la Main d'œuvre et la Méthode. Cette méthode nous permet de présenter de manière exhaustive toutes les causes affectant la finalité d'un processus.

Le diagramme d'Ishikawa suivant présente les points critiques que j'ai identifiés susceptibles d'influencer le résultat en m'appuyant sur les préconisations du fournisseur et sur les recommandations du référentiel en microbiologie médicale (REMIC, édition 2015). En complément, la construction du diagramme d'Ishikawa, ci-dessous, a été basée sur un travail de réflexion collective entre techniciens et biologistes.

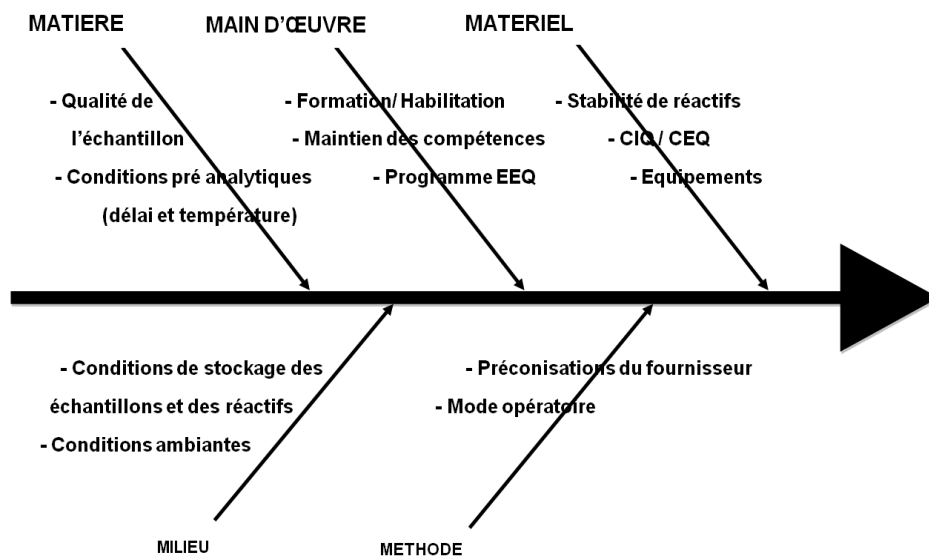


Figure 3 : Diagramme d'Ishikawa représentant les points critiques à maîtriser

2.1 Maîtrise de la Matière : aspect pré-analytique

La majorité des erreurs produites sont liées à la phase pré analytique. Le recueil de selles a une particularité du fait qu'il est réalisé souvent par le patient lui-même. Pour cela, j'ai répertorié les risques les plus critiques, qui sont :

- la qualité de l'échantillon : l'aspect des selles doit être diarrhéique et le prélèvement doit être identifié et recueilli dans un flacon propre, à usage unique et étanche à l'air.
- les conditions pré-analytiques : le prélèvement doit être acheminé immédiatement au laboratoire et doit être analysé rapidement soit dans les 2 heures après l'émission de la selle, en cas d'envoi ou analyse différée le prélèvement doit être conservé entre 2 et 8 °C pendant 3 jours.

Les risques, les plus critiques, de la Matière ont été vérifiés par, premièrement, les poudriers de coproculture qui sont stockés et distribués par le laboratoire. Deuxièmement, une fiche d'instruction (*cf. Annexe III*) est disponible dans le manuel de prélèvement facilement accessible au personnel médical et un exemplaire est donné au patient si celui-ci est un patient externe. Pour finir, le délai d'acheminement et la qualité de la prescription sont vérifiés lors de l'enregistrement, du tri des échantillons par le technicien du pré-analytique puis par les techniciens de bactériologie.

2.2 Maîtrise du Matériel : réactifs et équipements

Le test de GDH est un examen en technique manuelle qui nécessite du matériel simple :

- le poste de sécurité microbiologique (PSM) : tout échantillon biologique est considéré comme potentiellement pathogène. Pour cela et pour éviter la contamination par l'environnement, il est important d'effectuer tout examen bactériologique sous PSM.

Pour assurer le bon fonctionnement de ce dernier, les techniciennes du secteur réalisent des maintenances journalières et hebdomadaires. De plus, une maintenance annuelle est réalisée par un prestataire externe.

➤ Les équipements (non fournis dans le coffret) :

- Matériels stériles à usage uniques, disponible au laboratoire, avec marquage CE (gants, bâtonnets applicateurs, tubes de test),
- Mélangeur Vortex,
- Chronomètre : je l'ai considéré comme équipement critique afin de répondre aux préconisations du fournisseur sur la phase analytique, de respecter les temps d'incubation (5 à 15 minutes) et le temps de visualisation du résultat (30 secondes). Le technicien référent métrologie a étalonné le chronomètre à l'horloge parlante afin de s'assurer de sa fiabilité (cf. *Annexe IV*).

➤ les réactifs :

L'*immunoCard C. difficile* GDHest un coffret marqué CE. Tous les réactifs (identifiés et prêts à l'emploi) nécessaires au test sont inclus dans le coffret. Selon la fiche du fournisseur, le coffret doit être conservé entre 2 et 8 °C, et retourner à cette température après utilisation.

Avant utilisation, il faut sortir le coffret de son lieu de stockage et le porter à température ambiante (environ 1 heure). Il faut inspecter chaque pochette avant usage (percée ou mal scellée ou si l'indicateur du dessiccateur a viré).

Dans le laboratoire, les enceintes réfrigérées et les lieux de stockage sont cartographiés. Afin de s'assurer de leur bon fonctionnement, un système de suivi des températures est mis en place grâce au logiciel « Sirius ».

A chaque livraison, les coffrets sont acceptés conforme s'ils ne présentent pas d'anomalie apparente (ex : boîte abîmée) et sont ensuite enregistrés dans les stocks grâce au logiciel « GesStock ». Des étiquettes sont alors éditées et collées sur chaque coffret. Elles seront déstockées à chaque ouverture de boîte. Cette traçabilité permet un suivi des lots et ainsi de gérer les coffrets périmés.

La maîtrise des contrôles interne et externe de qualité (CIQ/ CEQ) est un point indispensable pour la maîtrise des examens manuelles en Bactériologie :

- Contrôle Interne de Qualité (CIQ) : pour un rendu de résultats fiables de notre méthode, on doit s'assurer que chaque coffret est valide. C'est pourquoi on passe un CIQ à chaque nouveau lot et aussi à chaque livraison.

- Contrôle Externe de Qualité (CEQ) : pour juger de l'aptitude du laboratoire à réaliser cet examen, des CEQ Eurobio, quatre enquêtes pour la recherche du *C. difficile*, sont effectués 3 fois par an.

- Traçabilité : Lors de la phase post analytique, les résultats obtenus sont tracés sur un cahier de traçabilité. Les résultats sur le système informatique du laboratoire (SIL) sont rentrés en double saisie puis sont validés par le biologiste, afin de palier les éventuels erreurs lors du rendu des résultats.

En cas de résultat positif, et selon l'algorithme décisionnel de notre procédure concernant la recherche de *C. difficile*, le test de GDH est suivi directement par la recherche de la toxine par une méthode moléculaire.

En période de garde : les résultats positifs de GDH sont téléphonés au service et tracé sur le SIL. Le nom de la personne à qui le résultat a été communiqué est tracé sur le dossier patient.

2.3 Maîtrise de la Main d'œuvre : personnel

La maîtrise de la Main d'œuvre est une étape essentielle pour l'accréditation en bactériologie et en particulier pour la validation des méthodes manuelles. Cette maîtrise passe obligatoirement par la formation et l'habilitation des opérateurs, le maintien de compétence et la participation au programme EEQ.

➤ La formation et l'habilitation des opérateurs : Les quatre techniciennes de bactériologie, qui réalisent ce test depuis quelques années, sont habilitées par expérience puisque cette technique est utilisée dans notre laboratoire depuis 2014. Mais, du fait de l'absence de trace documentaire, j'ai remis à jour cette habilitation en me basant sur la fiche de la société Méridian® (cf. Annexe V) et en m'appuyant sur les points critiques de chaque phase de l'examen.

Le REMIC classe la recherche de la toxine comme un examen d'urgence de grade A. Néanmoins, d'après les recommandations de la société française de la biologie clinique (SFBC) sur la biologie d'urgence, cette recherche est considérée comme une urgence organisationnelle [4] [18].

Le screening par la GDH permet d'obtenir un résultat rapide. En cas de positivité, la transmission du résultat permet de prendre les précautions nécessaires (mesures d'hygiène) en attendant le résultat de la toxine. De ce fait, seul le test de la GDH peut être considéré comme un examen d'urgence [18].

En tenant compte de ces recommandations et après révision de la procédure et du fonctionnement interne du laboratoire, j'ai décidé de procéder à la formation et à l'habilitation des techniciens de garde (soir et nuit). Vue la difficulté de réunir ces techniciens en une seule journée, j'ai gardé un échantillon de selle (GDH positif), conservé à 4°C, durant 3 jours

➤ Le maintien des compétences : D'après la procédure d'habilitation, le maintien des compétences de chaque technicien se fait, au sein de notre laboratoire, par la réalisation d'au moins quinze tests par an. Cet aspect est évalué au moment de l'entretien annuel des techniciens avec le RAC.

➤ Participation au programme EEQ : Notre laboratoire est abonné au programme externe de qualité (EUROBIO). Il s'agit d'un EEQ en aveugle pour la recherche de *C. difficile*. Il est réalisé à une fréquence de trois fois par an. Ce qui permet une vérification supplémentaire des compétences des techniciens

2.4 Maitrise de la Méthode : technique

Il s'agit d'un kit commercialisé marqué CE et validé par le fabricant. Cette méthode manuelle suit un mode opératoire diffusé et appliqué que l'on retrouve

dans la procédure D9-PR-50, sur le logiciel qualité du laboratoire « Gesqual-web », avec pour intitulé « Recherche de *Clostridium. Difficile* GDH». Lors de mes recherches, j'ai ajouté des images explicatives. Cette nouvelle version de la procédure est accessible rapidement pour les techniciens sur Gesqual web et dans le classeur Méridian. A noter qu'elle est aussi présente dans chaque coffret sous forme simplifiée mais en version anglaise. Pour respecter l'article 5.5.3 de la norme NF EN ISO 15189 et faciliter sa compréhension par les techniciens, j'ai ajouté une version française dans le coffret en cours d'utilisation (*cf. Annexe VI*). Cette méthode est déjà utilisée au sein du laboratoire. J'ai donc seulement procédé à une révision de la procédure en me basant sur les dernières versions du fournisseur (*cf. Annexe VII*). Lors de la phase analytique, et ceci pour chaque test patient, une vérification se fait grâce à un contrôle intégré (témoin). En effet, chaque carte comporte deux puits : un puits témoin et un puits test.

L'apparition d'une couleur bleue dans le puits de réaction contrôle confirme que le test est valide au moment de l'utilisation et que la migration de l'échantillon s'est effectuée correctement. La lecture se fait dans les 30 secondes suivant la fin de l'incubation. Toute coloration bleue, même faible est considérée comme un résultat positif. En cas de résultat non valide, il faut refaire une dilution à partir de l'échantillon original et répéter le test sur une nouvelle carte. Les résultats sont lus visuellement.

2.5 Maitrise du Milieu : aspect métrologique

La maîtrise des conditions environnementales est un aspect critique, surtout pour les techniques qualitatives.

Pour respecter les préconisations du fournisseur, cette maîtrise est importante et permet une bonne conservation des réactifs et des selles à analyser, ainsi qu'une bonne réalisation du test. Pour cela, il est indispensable que les réactifs et les échantillons prélevés soient conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C.

Lors de la réalisation du test, une température comprise entre 20°C et 26 °C est idéale, aussi bien pour les réactifs que pour l'échantillon à analyser. C'est pourquoi une surveillance de la température ambiante de la pièce technique est importante. La maîtrise du milieu passe principalement par la maîtrise métrologique des locaux et des équipements c'est-à-dire la température ambiante de la

pièce technique, la température de l'enceinte réfrigérée dans laquelle est stocké le coffret et celle où est conservé l'échantillon.

Pour ce faire dans notre laboratoire, ces milieux sont contrôlés par des relevés métrologiques par le biais du logiciel « Sirius ».

3. Vérification de performances de la méthode :

L'objectif de cette étape est d'apporter la preuve que notre méthode présente des performances satisfaisantes pour le dépistage du *C. difficile*.

S'agissant d'une méthode qualitative et de portée d'accréditation de type A, les paramètres à connaître et à vérifier selon le SH GTA04[15] sont :

<u>Vérification d'une méthode qualitative (portée A)</u>		
<u>Paramètres à connaître et à vérifier</u>	<u>Bibliographie</u>	<u>Vérification sur site/ essai</u>
Incertitudes/Facteurs de variabilité	/	Maîtrise des facteurs de variabilité / habilitation
Sensibilité et spécificité analytique	OUI	/
Limite de détection	OUI	/
valeurs seuils	OUI	/
Robustesse et Stabilité des réactifs	OUI	/
Comparaison avec la méthode de référence	OUI	/
Comparaison avec la méthode déjà utilisée au laboratoire (s'il existe)	OUI	OUI
Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)	OUI	OUI
Interférences	OUI	/

Le laboratoire ne possédant pas de méthode antérieure à celle-ci, la comparaison entre deux méthodes n'a pas été réalisée.

De plus, la contamination inter-échantillon n'est pas applicable ici puisqu'il s'agit de cartes unitaires.

3.1 Incertitudes / facteurs de variabilité : variabilité inter opérateurs

Pour une méthode qualitative manuelle, avec une lecture visuelle donc subjective, la vérification de l'incertitude de mesure et des facteurs de variabilité se fait par la maîtrise de la Main d'œuvre de l'étude de risques (5 M).

3.2 Sensibilité, spécificité analytique et comparaison avec la méthode de référence :

La sensibilité et la spécificité d'un test dichotomique donnent une appréciation sur la validité intrinsèque de ce test, leur estimation nécessite une comparaison avec une méthode de référence.

Une étude comparative des performances du test *ImmunoCard C. difficile GDH* par rapport à une méthode de référence nous a été communiquée par le fournisseur (cf. annexe VIII).

Cette étude a été réalisée au service de bactériologie de l'hôpital Saint-Antoine à Paris, 120 échantillons de selles ont été testés pour la recherche de *C. difficile*. Le kit GDH Méridian® a été comparé à la culture sur milieu TCC pour la mise en évidence de la bactérie (méthode de référence).

La sensibilité et la spécificité conclues pour notre test est de 100% et de 98.3% respectivement.

3.3 Limite de détection :

La fiche fournisseur précise que la limite de détection du test *ImmunoCard C. difficile GDH* est de 10ng/ml sur selle et de 1 ng/ml si diluée.

3.4 Intervalle de référence / valeurs seuils :

Cette méthode est qualitative, la lecture des résultats est visuelle et aucune interprétation quantitative ne doit être effectuée en rapport avec l'intensité de la couleur.

Selon la fiche fournisseur : toute couleur bleue, même de faible intensité, est considérée comme positive (pas de résultat douteux).

3.5 Robustesse et stabilité des réactifs :

La robustesse d'une méthode se définit par sa fiabilité, dans les conditions normale d'utilisation, ne peut être affectée par des variations faibles [15].

La stabilité des réactifs dépend des conditions de leur conservation (température et durée).

En respectant les préconisations du fournisseur, le coffret est conservé entre 2 à 8°C. La technique est effectuée dans une salle climatisée dont la température ambiante est comprise entre 20 et 26°C.

Les tests de stabilité des composants des réactifs sont effectués annuellement par le fabricant pour confirmer leurs performances continues et cela en conformité avec les normes en vigueur (*cf. annexe IX*).

3.6 Interférences :

Les interférences sont des substances qui peuvent entraîner des résultats erronés [15].

Le fournisseur précise que les échantillons contenant du sang total à des concentrations supérieures à 40 % peuvent produire des résultats faussement négatifs. Et que des réactions croisées sont observées avec le *Staphylococcus aureus* (souche Cown I).

IV. RESULTATS ET INTERPRETATIONS

1. Maitrise de risques

L'analyse de risque effectuée, nous a permis d'identifier les facteurs de risques pouvant influencer le résultat de notre méthode.

Le tableau ci-dessous résume ces facteurs ainsi que leurs moyens de maitrise :

MAITRISE DES RISQUES		
Type de risque	Points critiques à maitriser	Modalités de maitrise
Matière	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <u>Qualité du prélèvement</u> : <ul style="list-style-type: none"> • identification • type de contenant : propre à usage unique, étanche • selles diarrhéiques • Interférences : selles sanglantes ou hémorragiques ➤ <u>Conditions avant traitement analytique</u> : <ul style="list-style-type: none"> • Délai et température d'acheminement (rapide ou conservé à 2-8° C si envoi différé) 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Modalité de prélèvement et d'acheminement définies dans le manuel de prélèvement ➤ Information du patient et formation du personnel : Préconisation pour le patient, guide des examens « fiche recueil de selle » ➤ Vérification de la conformité : règles d'identitovigilance, critères d'acceptation et de refus des échantillons, personnel habilité

<p>Milieu</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <u>Conditions de conservation des échantillons</u> : 2 à 8 °C ➤ <u>Conditions de conservation des réactifs</u> : 2 et 8 °C ➤ <u>Conditions environnementales</u> : température ambiante de la salle technique, entre 20 et 26 °C 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ enceinte réfrigérée : cartographiée, sonde étalonnée, suivi des températures ➤ salle technique climatisée : sondes étalonnées, suivi des températures
<p>Matériel (équipements)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <u>Poste de sécurité en microbiologie (PSM)</u> ➤ <u>Chronomètre</u> : ➤ <u>Informatique</u> : résultat visuel rentré manuellement sur l'informatique Examen non connecté au SIL 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ maintenance journalière, hebdomadaire et annuelle par prestataire externe ➤ vérification annuelle du chronomètre (horloge parlante) : raccordement à l'horloge parlante ➤ Cahier de traçabilité et double saisie du résultat sur le SIL, sauvegarder des résultats patients
<p>Matériel (réactifs)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <u>Conservation</u> (2 à 8°C) ➤ <u>Conditions avant d'utilisation</u> : porter les réactifs à température ambiante (20-26°C) ➤ <u>Intégrité du réactif</u> : inspecter les réactifs avant utilisation 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Enceinte réfrigérée : cartographiée, sonde étalonnée, suivi des températures ➤ Respect du mode opératoire et la fiche technique fournisseur ➤ Gestion de stock informatisé

	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <u>Gestion de stock</u> : acceptation à réception, vérification date de péremption 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ fiche de stress fournisseur
Méthode	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <u>Limites de la méthode</u> : Limite de détection, interférences, sensibilité et spécificité ➤ <u>Valeur seuil</u> : lecture visuelle ➤ <u>Respect des temps d'incubation et du temps de lecture</u> ➤ <u>Vérification de performances en continu</u> : <ul style="list-style-type: none"> • CIQ • qualité de la carte • CEQ 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ respect du mode opérateur et la fiche technique fournisseur ➤ mode opératoire simplifié dans chaque coffret ➤ CIQ à chaque changement de lot et à chaque livraison ➤ contrôle- test de migration intégré dans chaque carte ➤ EEQ : quatre enquêtes, 3 fois/ an
Main d'œuvre	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <u>Personnel compétent et habilité</u> ➤ <u>Maintien de compétences</u> 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ formation/ habilitation des techniciens (de routine et de garde) ➤ 15 test/an par opérateur Et participation au programme EEQ ➤ évaluation annuelle des compétences

En se basant sur l'expérience du personnel, on a estimé le niveau de criticité des facteurs influents selon l'échelle suivante :

1 : Non critique	2 : Peu critique	3 : moyennement critique	4 : critique	5: très critique
------------------	------------------	--------------------------	--------------	------------------

❖ Maîtrise de la Matière :

Cet aspect semble bien maîtrisé : la modalité du prélèvement est bien détaillée dans le manuel de prélèvement accessible pour le personnel des services de soin. Les poudriers de coproculture sont stockés et distribués par le laboratoire, en cas d'analyse différée, les échantillons sont conservés dans le réfrigérateur S-F4 à $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

La vérification de la conformité de l'échantillon est assurée par le personnel, formé et habilité, du poste de tri et de la bactériologie. Une non-conformité est créée lorsque les modalités pré analytiques ne sont pas respectées et le service en est informé. Cependant, il reste difficile d'évaluer le respect des conditions d'acheminement, étant donné que ceux-ci sont assurés par le personnel des services de soins. Dans le cas de patients externes, le prélèvement est effectué au C5 Consultations et est amené immédiatement par le patient lui-même.

❖ Maîtrise du Matériel

En ce qui concerne les équipements critiques, le PSM est maîtrisé grâce à l'entretien interne et externe. Le chronomètre a été raccordé, à l'occasion de cette étude, une procédure de vérification des chronomètres a été établie(cf. *Annexe IV*), elle sera documentée et intégrée dans notre logiciel Qualité. Le mélangeur Vortex est considéré comme non critique. Les équipements non fournis par le fournisseur sont marqués CE.

Les réactifs sont stockés dans le réfrigérateur B-F3 à $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

Pour éviter les erreurs, les cartes sont identifiées. Les résultats sont tracés sur un cahier référencé et enfin la double saisie est obligatoire avant la validation biologique.

❖ Maîtrise de la Main d'œuvre :

Pour les 4 techniciens de bactériologie, l'habilitation est passée par un petit rappeloral des points critiques de la méthode et de l'importance d'effectuer le test sous le PSM.

Par contre, pour les techniciens de garde, il a été nécessaire de les informer sur le mode opératoire et de leur fournir un mode opératoire simplifié avant leur habilitation. Ces techniciens ont du réaliser un test fictif pour s'assurer du respect du mode opératoire.

La fréquence de 15 examens pour chaque technicien et de quatre CEQ, 3 fois par an, me semble suffisant pour le maintien des compétences.

Cependant, il reste trois techniciens à former et habiller du faite des absences.

❖ Maîtrise de la méthode :

Un CIQ est passé à chaque nouveau lot et à chaque nouvelle livraison pour s'assurer de la fiabilité de nos résultats. De plus, notre participation aux trois enquêtes annuelles des CEQ, nous permet d'évaluer la performance de notre kit. Les CIQ et les CEQ nous fournissent la preuve de la maîtrise de la phase analytique indépendamment des étapes pré et post analytiques.

Avant utilisation, la carte test est inspectée et, pendant l'utilisation, sa conformité vérifiée par le technicien grâce au contrôle intégré.

❖ Maîtrise du milieu :

L'aspect métrologique est bien maîtrisé grâce à une salle technique climatisée et une maintenance régulière et des enceintes réfrigérées cartographiées. Le suivi des températures est fait par l'intermédiaire de sondes étalonnées et le relevé des températures est effectué grâce au logiciel SIRIUS.

2. Etude rétrospective

Les recommandations du REMIC [4], de l'ESCMID [19] et de l'HAS [20] concernant la recherche du *C. difficile* précisent que seules les selles diarrhéiques doivent être testées. Cependant cela peut être utile, en milieu hospitalier, afin de dépister les patients asymptomatiques qui représentent un réservoir, et donc prendre des mesures d'hygiène dans le service. Ensuite, que le dépistage chez des enfants de moins de trois ans est inutile, idem pour la redondance d'un examen négatif dans les 7 jours (gain faible pour qu'il soit positif), et d'un examen positif dans les 10 jours (pas d'intérêt pour le suivi de traitement). De plus, il est primordial que l'échantillon soit prélevé avant le début du traitement. Puis, elles précisent les critères de rejets qui sont : les selles moulées, les dépistages chez l'enfant de moins de 3 ans et les prélèvements redondants.

Et enfin que la détection du *C. difficile* doit être systématique pour les diarrhées associées aux soins.

	Nombre de examens de GDH = 79	Pourcentage
Selles moulées/ dures	7	8.9%
Enfants < 3ans	0	0%
Redondances	2	2.5%
Traitements non renseignés	49	62%

Pourcentages des critères du rejet et de traitements non renseigné sur 6 mois

L'étude rétrospective simple menée, de Janvier au Juin 2017 (tableau précédent), nous a permis de conclure que les recommandations précisées ci-dessus sont plus ou moins respectées. Par contre, l'examen GDH, pour des patients diarrhéiques hospitalisés depuis au moins 3 jours n'est pas rajouté en systématique. Ce qui nous a imposé, lors de la révision de la procédure, d'établir le rajout systématique de la recherche de GDH pour toutes les selles diarrhéiques au delà du 3^e jour d'admission, ce rajout sera informatisé.

Ainsi, une note de laboratoire, concernant les recommandations précédentes, est envoyée aux services. En complément, lors de la prochaine revue de contrat, ces recommandations seront à l'ordre du jour.

3. Performance de la méthode

Pour la variabilité inter-opérateurs, on s'est appuyé sur la formation et l'habilitation des techniciens à défaut de pouvoir réaliser le calcul du coefficient Kappa pour cause de budget et de temps.

En me basant sur la bibliographie du fournisseur, j'ai calculé la valeur prédictive négative (VPN) qui est de 100% et la valeur prédictive positive (VPP) qui est de 90%. De ce calcul, on peut conclure que cette méthode est de très bonne sensibilité. Cependant, la spécificité faible de la méthode n'a pas d'effet sur le dépistage de l'ICD puisqu'un test positif de GDH est toujours suivi par la recherche de la toxine selon notre algorithme décisionnel.

Au vue de la fiche de stress fourni par Meridian®, on en conclut que les réactifs sont stables et la méthode robuste.

L'interférence de sang total dans les selles est maintenant bien connue par les techniciens. Une non-conformité peut alors être générée. Les réactions croisées sont écartées lorsque le dépistage de la toxine est réalisé.

4. Démarche de validation de la méthode

Préalablement à la vérification des performances, j'ai procédé à une analyse de risques pour montrer comment sont maîtrisés les facteurs dont d'influence est significative. La révision de la procédure était nécessaire pour compléter les points manquants.

La liste détaillée des examens couverts et demandés à l'accréditation a été mise à jour par le RAC (*cf. annexe X*), le COFRAC étant informé par mail du rajout de l'examen, le SH FORM 43 est rempli et la méthode est déclarée conforme à l'utilisation dans notre laboratoire. Par la suite, le dossier de vérification de la méthode a été envoyé le 21 septembre (*cf. annexe XI*).

V. CONCLUSION

Ce travail nous a permis de vérifier la conformité de l'utilisation de la méthode de la détection de la GDH, dans notre environnement propre, selon la norme NF EN ISO 15189, et par la suite de l'a déclarapte.

Cette étude a montré que les maitrises des risques concernant la matière, le matériel, le milieu et la méthode sont satisfaisantes. Cependant, en ce qui concerne la main d'œuvre, il était nécessaire, d'une part, de sensibiliser les techniciens de routine sur les points critiques, et d'autre part, de former et habilitier les techniciens de garde. La phase post analytique est maitrisée, néanmoins, nous avons pu formuler une prestation de conseil destinée au prescripteur.

L'évaluation des performances de notre méthode s'est basée principalement sur la recherche bibliographique, les données fournisseur et la maîtrise des 5M et plus précisément l'habilitation des opérateurs. On peut conclure que, notre méthode est performante en tant que test de dépistage qui doit être sensible et avoir une bonne VPN.

Le travail sur ce sujet constitue, pour notre secteur, un exemple pour la validation des méthodes qualitatives de processus simple et également une base pour la validation des méthodes de processus complexe.

Nous souhaitons, que la validation de méthode dela recherche de la toxine, nous permettra d'approfondir et de poursuivre notre étude rétrospective en ce qui concerne les recommandations des sociétés savantes.

Du plus, le travail sur ce sujet m'a permis de mettre en application les connaissances acquises pendant l'enseignement du DU, et de détecter les points à améliorer dans le secteur de bactériologie dont je suis responsable.

VI. BIBLIOGRAPHIE :

[1] Ministère de la santé et des sports, 2010. Ordonnance n°2010-49 du 13 Janvier 2010 relative à la biologie médicale, JO du 15 janvier 2010.

[2] Assemblée nationale et le Sénat, 2013. Loi n°2013-442 du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale, JO du 31 mai 2013.

[3] NF EN ISO 15189. Laboratoires de biologie médicale – Exigences concernant la qualité et la compétence. AFNOR, 2012.

[4] REMIC, Référence en Microbiologie Médicale de la Société Française de Microbiologie. 5^e édition. SFM, 2015.

[5] E.PILLY, Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales, Vivactis Plus Ed, 2016.

[6] Bertaiola Monnerat L, Chuard C, Diagnostic microbiologique des infections à Clostridium difficile. *Revue Médicale Suisse*, 7 octobre 2015 ; Vol 11 : P 1840 - 1843.

[7] SH FORM 43 Fiche type qualitatif – Vérification (portée A)/ (validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale, Révision : #01 - 04/2015 / date de publication : 29/04/2015, www.cofrac.fr

[8] Guides techniques d'accréditation, section santé humaine, documentation spécifique du COFRAC, Santé Humaine (SH), www.cofrac.fr

[9] QUAMIC, Comité Qualité de la Société Française de Microbiologie, Recommandation 2016 V1.

[10] SH REF 02, Exigences pour l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189, Révision : #05 – 06/2016, date de publication : 10/06/2016, <https://www.cofrac.fr>

[11] SH REF 08, Expression et évaluation des portées d'accréditation, Révision : #05 – 03/2017, date de publication : 03/03/2017, <https://www.cofrac.fr>

[12] SH GTA 01, Guide Technique d'Accréditation en biologie médicale, Révision : #01 – 04/2015, Date de publication : 09/04/2015, <https://www.cofrac.fr>

[13] SH GTA 06, Guide Technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale, Révision : #00 – 06/2012, date de publication : 05/06/2012, <https://www.cofrac.fr>

[14] SH GTA 14, Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale, Révision : #00 – 10/2011, date de publication : 26/09/2011, <https://www.cofrac.fr>

[15] SH GTA 04, Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes de biologie médicale, Révision : #01 – 04/2015, Date de publication : 09/04/2015, <https://www.cofrac.fr>

[16] SH GTA 06, liste détaillée des examens/analyses demandés à l'accréditation, révision : #01 – 02/2016, date de publication : 26/02/2016, <https://www.cofrac.fr>

[17] SH INF 50, Portées-types d'accréditation, Révision : #04 – 03/2017, Date de publication : 03/03/2017, <https://www.cofrac.fr>

[18] Vaubourdolle M ; les membres de groupe de travail SFBC «Examens de biologie médicale d'urgence ». Recommandations de la SFBC sur la biologie d'urgence, *Ann Biol Clin* 2016 ; 74 (2) : 136 – 140.

[19] Barbut F, Diagnostic des infections à Clostridium difficile (ICD) : quand et comment ? . 16^e journées nationales d'infectiologie, Nancy, du 10 au 12 juin 2015, <https://www.infectiologie.com/fr/recommandations>

[20] Le collège de l'haute autorité de santé, Actes diagnostiques dans l'infection à *Clostridium difficile* – Argumentaire, HAS Juillet 2016.

VII. ANNEXES :

Annexe I : Organigramme nominatif fonctionnel du laboratoire

Annexe II : Planning prévisionnel de demandes d'extension d'accréditation du laboratoire

Annexe III : Fiche instruction : recueil de selles « préconisation pour le patient »

Annexe IV : Procédure de Vérification du chronomètre

Annexe V : Fiche d'habilitation

Annexe VI : Notice du mode opératoire pour la recherche du *Clostridium difficile* (version française)

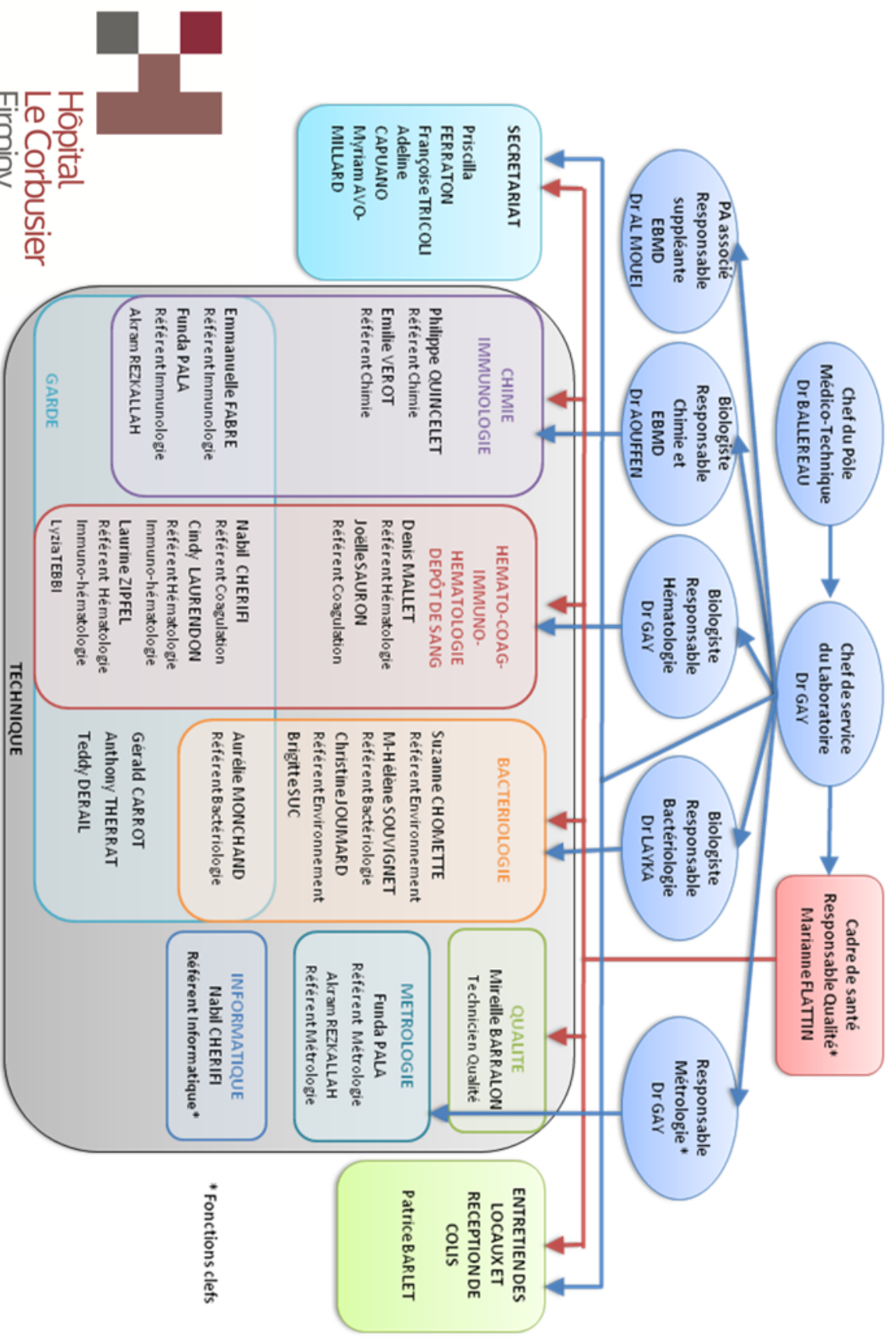
Annexe VII : Procédure de la recherche de *Clostridium difficile*(GDH)

Annexe VIII : Bibliographie « Etude comparative des performances du test GDH Méridian® »

Annexe IX : Fiche de stress

Annexe X : Page 3 de la Liste détaillée des examens couverts et demandés à l'accréditation

Annexe XI : SH FORM 43 :Dossier de vérification de la méthode



ANNEXE II :



Prévisionnel des demandes d'Extension d'accréditation de votre LBM jusqu'en 2020

email au pilote de votre dossier

Laboratoire (LBM) : LBM DE L'HOPITAL LE CORBUSIER - FIRMINY
N° d'accréditation(s) : 8-3884

Activité globale de votre laboratoire en 2020 ¹	
Biochimie générale et spécialisée (BIOCHBM)	<input checked="" type="checkbox"/>
Pharmacologie – Toxicologie (PHARMACOSTPBM – TOXICOBM)	<input type="checkbox"/>
Radiotoxicologie (RADIOTOX)	<input type="checkbox"/>
Hématocytologie (HEMATOBM)	<input checked="" type="checkbox"/>
Hémostase (COAGBM)	<input checked="" type="checkbox"/>
Immuno-Hématologie (IMMUNOHEMATOBM)	<input checked="" type="checkbox"/>
Auto-Immunité (AUTOIMMUNOBM)	<input type="checkbox"/>
Allergie (ALLERGBM)	<input type="checkbox"/>
Immunologie Cellulaire Spécialisée et histocompatibilité (ICELLHISTOBM)	<input type="checkbox"/>
Spermiologie diagnostique (SPERMIOBM)	<input type="checkbox"/>
Activités biologiques d'AMP (AMPBIOBM)	<input type="checkbox"/>
Agents transmissibles non conventionnels (ATNCBM)	<input type="checkbox"/>
Bactériologie (BACTH)	<input checked="" type="checkbox"/>
Parasitologie-Mycologie (PARASITOMYCOBM)	<input checked="" type="checkbox"/>
Sérologie Infectieuse (ISEROBM)	<input checked="" type="checkbox"/>
Virologie (VIROH)	<input type="checkbox"/>
Génétique somatique (GENMOLBM)	<input type="checkbox"/>
Génétique constitutionnelle (GENMOLBM)	<input type="checkbox"/>
Anatomie & cytologie Pathologique (ACP)	<input type="checkbox"/>
Nbre de sites analytiques total	1
Nbre de sites Pré - Post-analytiques total	1
Nbre de services/unités EBMD total	1

¹ Préciser les sous-familles réalisées dans votre LBM qu'elles soient accréditées ou non (objectif à accréditer pour le 1^{er} novembre 2020) ainsi que le nombre de sites.

Prévisionnel des demandes d'Extension d'accréditation de votre LBM jusqu'en 2020

À envoyer par email au pilote de votre dossier

Extensions demandées ²	2017	2018	2019
Biochimie générale et spécialisée (BIOCHBM)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Pharmacologie – Toxicologie (PHARMACOSTPBM – TOXICOBM)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Radiotoxicologie (RADIOTOX)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hématocytologie (HEMATOIBM)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Hémostase (COAGIBM)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Immuno-Hématologie (IMMUNOHEMATOIBM)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Auto-Immunité (AUTOIMMUNOIBM)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Allergie (ALLERIBM)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Immunologie Cellulaire Spécialisée et histocompatibilité (ICELLHISTOIBM)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Spermologie diagnostique (SPERMIOIBM)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Activités biologiques d'AMP (AMPBIOIBM)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Agents transmissibles non conventionnels (ATNCBM)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bactériologie (BACTH)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Parasitologie-Mycologie (PARASITOMYCOIBM)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Sérologie Infectieuse (ISEROIBM)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Virologie (VIROH)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Génétique somatique (GENMOLIBM)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Génétique constitutionnelle (GENMOLIBM)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Anatomie & cytologie Pathologique (ACP)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nbre de sites analytiques total	1	1	1
Nbre de sites Pré - Post-analytiques total	1	1	1
Nbre de services/unités EBMD total	0	0	1

² Préciser les sous-familles/sites que vous souhaitez demander à l'accréditation en 2017, 2018 puis 2019 pour atteindre la totalité de votre activité accréditée au 1^{er} novembre 2020.

ANNEXE III :

 <p>Hôpital Le Corbusier Firminy Laboratoire</p>	PRECONISATIONS POUR LE PATIENT			REFERENCE : C1-INS03
				VERSION 2
	Validation : FLATTIN Marianne 2016-10-31	Approbation : TAYEB Nicole 2017-03-26	Application : 2017-03-26	Page 41 / 73

Recueil des selles Coproculture et examen parasitologique des selles

Intérêt :

La coproculture a pour objet de mettre en évidence l'agent responsable d'une diarrhée infectieuse. La parasitologie permet la recherche de parasites.

Préconisations pour le prélèvement :

Cet examen est à effectuer, si possible, lors des épisodes diarrhéiques. Il est souhaitable de faire cet examen à distance de tout traitement, avec un régime sans résidu (fruits, légumes) la veille du recueil. Pour la parasitologie, le prélèvement est à renouveler sur 3 jours différents (1 pot/jour).

- Défécation dans un récipient propre.
- A l'aide de la spatule, transférer des selles dans le flacon (éviter de trop remplir le flacon). Recueillir d'éventuels éléments glaireux, sanglants ou d'aspect atypique.
- Refermer soigneusement le flacon et noter vos nom et prénom ainsi que la date et heure de recueil sur le flacon.

Conservation de l'échantillon :

Le flacon doit être acheminé immédiatement au laboratoire dans le cas de recherche de formes végétatives d'amibes (maximum 1 heure après la fin du recueil à température ambiante) sinon dans les plus brefs délais. Il peut être conservé au réfrigérateur (+4°C) maximum 12 h pour la coproculture.

Fiche de renseignement à compléter par le patient :

Nom : Nom de jeune fille :

Prénom : Téléphone :

Date de naissance :

Sexe : M F

Date et heure de recueil des selles : le / / à H

Les selles ont-elles été mises au frigo ? OUI (durée :) NON

Avez-vous fait un voyage tropical récemment ? OUI NON

Si oui, où et quand ?

Avez-vous la diarrhée ? OUI NON

Si oui, suite à un repas ? OUI NON

Avez-vous de la fièvre (plus de 38°C) ? OUI NON

Prenez vous ou avez-vous pris un antibiotique dans les 3 dernières semaines ?

OUI NON Si oui, quel est son nom ?
.....

Résultats : au laboratoire par la poste

Vérification du chronomètre

Principe :

La procédure de réalisation du test *C.difficile*GDH nécessite plusieurs temps de repos qui varie de 30 secondes à 1 heure. Afin de certifier que ces temps sont bien réalisés, il faut faire une vérification du chronomètre utilisé lors de la technique.

La vérification métrologique est l'opération qui permet de s'assurer que les erreurs de mesure assorties de leur incertitude sont toutes inférieures aux EMT établies par le laboratoire en se référant au document de Dr ESSEMILAIRE.L (IT-MU12-004-02 Biomérieux Mars 2014).

La procédure de vérification des chronomètres consiste à déclencher le système de mesure sur un temps donné, de le comparer à notre étalon et ainsi de constater que l'écart obtenu est inférieur à l'EMT défini.

L'horloge parlante sera notre étalon car elle est pilotée par le LNE-SYRTE, chargé par le Laboratoire National de Métrologie et d'Essais (LNE) de la responsabilité des références nationales de temps et de fréquence. Elle nous assure donc une traçabilité aux étalons nationaux.

Procédure :

Le chronomètre a été identifié sous la référence BACT1.

- Choix de la plage horaire et de l'EMT qui lui correspond.
- Étalonnage sur l'horloge parlante.
- Vérifier la remise à zéro du chronomètre.
- Téléphoner à l'horloge parlante : n° 3699 (numéro court).
- Déclencher le chronomètre au 4ème top d'une heure quelconque et la noter.
- Raccrocher le téléphone.
- Rappeler l'horloge parlante après le temps défini et arrêter le chronomètre au 4^e top.
- Noter l'écart entre le temps officiel et le temps mesuré.

- Enregistrer ces opérations et les résultats.

Résultat et interprétation :

Délai procédure technique	Plage utilisation et EMT correspondant	Ecart	Conformité
1 heure	15 mn à 120 mn EMT=30 secondes	Deux secondes	Conforme Ecart<EMT
5 et 15 minutes	5 mn à 15 mn EMT=15 secondes	Une seconde	Conforme Ecart<EMT
30 secondes	30 sc à 1 mn EMT=5 secondes	Une secondes	Conforme Ecart<EMT

Le chronomètre a été vérifié le 26/07/2017, une vérification doit être effectuée toutes les années ainsi la prochaine vérification doit être effectuée autour du 26/07/2018.

Bibliographie :

1. Essemilair L, Métrologie simplifiée - Expérience d'un laboratoire accrédité, IT-MU12-004-02 Biomérieux Mars 2014.
2. Daunizeau A ; les membres du sous-groupe 6 processus supports – groupe de travail SFBC « Accréditation des laboratoires de biologie médicale » (coordonnateur M Vaubourdolle). Recommandation sur la métrologie et la maîtrise des équipements critiques, *Ann Biol Clin* 2017 ; 71(Hors série n° 1) : 236.

PROCÉDURE DE TEST	Vérfié
<ul style="list-style-type: none"> • L'opérateur a ramené les réactifs à température ambiante ($\pm 1H$) et connaît l'importance de cette étape avant de procéder au test. • L'opérateur a correctement ajouté 200 μL de diluant Échantillon/Contrôle Négatif à un tube en utilisant le compte-gouttes du flacon. • L'opérateur ajoute immédiatement 25μL de l'échantillon de selle liquide OU 2mm de selle non-pipetable dans le diluant. L'émulsion est passée au vortex 10 secondes. • L'opérateur ajoute 3 gouttes de conjugué enzymatique à chaque tube et connaît l'importance de bien mélanger le tout au vortex. Le mélange est ensuite incubé 15 minutes à température ambiante. • L'opérateur passe le mélange au vortex avant utilisation et ajoute 150μL de l'échantillon dilué à chacun des 2 puits ÉCHANTILLON de la carte. Le mélange est ensuite incubé 5 minutes à température ambiante. • L'opérateur s'assure que les 2 puits de RÉACTION apparaissent mouillés et que la (presque) totalité de l'échantillon a migré. • L'opérateur procède ensuite au lavage en ajoutant exactement 3 gouttes de solution de lavage dans chacun des puits RÉACTION. • L'opérateur s'assure que la solution de lavage est absorbée avant de poursuivre. L'opérateur ajoute 3 gouttes de substrat et laisse incubé 5 minutes à température ambiante. • L'opérateur comprend l'importance de lire visuellement les résultats de chaque carte dans les 30 secondes qui suivent la fin de l'incubation. 	<hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/>
INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS	Vérfié
<p>L'opérateur interprète les résultats ImmunoCard® <i>C. difficile</i> GDH dans les temps et comme recommandé dans la notice.</p> <p>Test positif: couleur bleue dans les puits de réaction TEST (côté supérieur droit) et CONTROLE (côté supérieur gauche).</p> <p>Test négatif: couleur bleue dans le puits de réaction CONTROLE (côté supérieur gauche) uniquement. Le puits de réaction TEST (côté supérieur droit) doit être incolore.</p> <p>Test non valide: pas de coloration détectable dans le puits CONTROLE. L'absence de coloration peut indiquer qu'un réactif ou que la carte de test n'a pas fonctionné correctement, que l'échantillon n'a pas été ajouté, qu'il n'a pas migré ou qu'il n'a pas été dilué correctement et a entraîné une sur-inoculation de la carte de test. En cas de résultat non valide, refaire une dilution de l'échantillon et répéter le test sur une nouvelle carte.</p>	<hr/> <hr/> <hr/> <hr/>

Les paragraphes ImmunoCard® *C. difficile* GDH, ECHANTILLONNAGE ET CONSERVATION, CONTRÔLE DE QUALITÉ, PROCÉDURE DE TEST, INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS ont été revus et leurs contenus respectifs appliqués.

Signature de l'opérateur: _____

Signature du vérificateur: _____

ANNEXE VI :



PROCEDURE DE TEST

Comment procéder:



1. Dans un tube à essai, ajouter 200 µL de diluant en utilisant le compte-gouttes du flacon.



2. Ajouter 25 µL de selle liquide (premier trait à partir de l'embout de la pipette) ou une portion de 2 mm de selle solide* au tube. Mélanger au vortex.



3. Tenir le flacon de conjugué enzymatique verticalement et ajouter 3 gouttes au tube. Mélanger au vortex. Laisser l'échantillon dilué incuber à 20-26 C pendant 15 minutes.



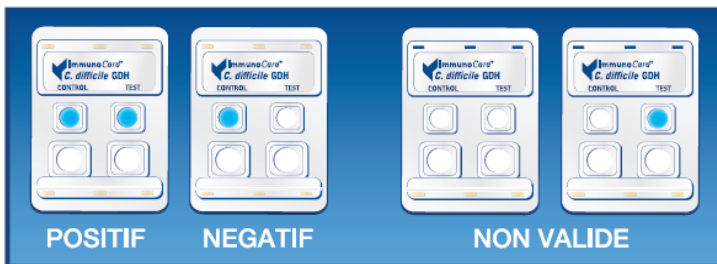
4. A l'aide de la pipette de transfert, ajouter 150 µL de l'échantillon dilué à chacun des puits échantillon (inférieurs) droit et gauche. Incuber pendant 5 minutes entre 20 et 26 C.



5. Tenir le flacon de solution de lavage à la verticale et ajouter 3 gouttes dans chacun des puits réaction (supérieurs).



6. Lorsque la solution de lavage est absorbée, tenir le flacon de substrat à la verticale et ajouter 3 gouttes à chacun des puits réaction (supérieurs). Incuber pendant 5 minutes entre 20 et 26 C. Lire visuellement les résultats dans les 30 secondes qui suivent la fin de l'incubation.



Meridian Bioscience Europe
34 Rue de Ponthieu
75008 Paris
Tel: +01 42 56 04 40
Fax: +09 70 06 52 10
Email: info_fr@meridianbioscience.eu

USA/Corporate Office
3471 River Hills Drive
Cincinnati, Ohio 45244
Telephone: 513,271,3700
Orders / Customer Service: 1.800,543,1980
Technical Support: 1.800,243,3858
Information Fax: 513,272,5432
Ordering Fax: 513,271,0124
www.meridianbioscience.com

* Le schéma ci-dessous illustre la quantité approximative de selle solide, semi-solide ou non pipetable, recommandée pour le test.



Cette procédure résumée est représentative de la notice au moment de sa publication. Pour des instructions complètes, se référer à la notice la plus récente.

Meridian Bioscience, Inc.
Inspired Science. Trusted Solutions.®

©2011 SN11085 REV. 07/11

ANNEXE VII :

 <p>Hôpital Le Corbusier Firminy Laboratoire</p>	RECHERCHE DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE GDH			REFERENCE : D9-PR50
				VERSION 2
	Validation : FLATTIN Marianne 2017-08-03	Approbation : LAYKA Ayham 2017-09-06	Application : 2017-09-06	Page 1 / 6

I. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION :

Cette procédure décrit les modalités de dépistage de *Clostridium Difficile* dans une coproculture par la recherche de l'enzymeGDH (Glutamate Déshydrogénase). Si cette recherche est positive, elle induit une recherche de toxine.

II. DOCUMENTS ASSOCIES :

D1-ENR09 « Planning annuel des EEQ en bactériologie »

D2-MO02 « Validation analytique sur Hexalis »

D9-MO01 « Numérotation des prélèvements et utilisation des feuilles de pailasse en bactériologie »

D9-MO27 « Examen bactériologique des selles »

D9-ENR14-1 « Cahier de traçabilité des résultats de Clostridium Difficile »

Notice d'utilisation du réactif :ImmunocardC.difficile GDH

III. RESPONSABILITES :

Cette procédure s'adresse à tous les techniciens habilités au poste des divers en bactériologie et les techniciens de garde susceptibles de travailler le soir, la nuit et le samedi matin.

	RECHERCHE DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE GDH			REFERENCE : D9-PR50
				VERSION 2
	Validation : FLATTIN Marianne 2017-08-03	Approbation : LAYKA Ayham 2017-09-06	Application : 2017-09-06	Page 2 / 6

IV. DEROULEMENT DE L'ACTIVITE :

1. Intérêt clinique

Le Clostridium difficile est une bactérie anaérobie présente dans le tube digestif. Son portage est généralement asymptomatique, mais peut devenir pathogène suite à un déséquilibre de la flore digestive (antibiothérapie par exemple), lorsqu'une souche sécrétrice de toxines a émergé. Seules ces souches toxigènes sont pathogènes et nécessitent des mesures d'isolement du patient. Le diagnostic biologique repose sur 2 catégories de tests :

- mise en évidence de la bactérie par la recherche de l'enzyme GDH,
- mise en évidence des toxines.

La GDH (glutamate déshydrogénase) est une enzyme présente chez *C. difficile* et une recherche positive de GDH dans les selles signe la présence de *C. difficile*. Les recommandations actuelles préconisent systématiquement une recherche de toxines en cas de présence de *C. difficile*, ainsi que le rajout de la recherche de GDH pour chaque coproculture prescrite au-delà de 3^{ème} jour d'admission. Cette recherche doit être faite uniquement sur des selles diarrhéiques ou molles chez un sujet suspect sauf dans les cas particuliers suivants : 1- Dépistage chez les patients contact, 2- Epidémie.

2. La recherche de GDH

Principe de la méthode :

L'Immunocard, *C.difficile* GDH consiste en une membrane maintenue dans un cadre en plastique avec deux puits d'échantillon et deux puits de réaction. Des anticorps vis à vis de la glutamate déshydrogénase (GDH) sont immobilisés sur la membrane. Durant l'incubation l'antigène GDH, s'il est présent, est lié aux anticorps anti-GDH du conjugué. Les complexes GDH-conjugué sont alors capturés au puits test par les anticorps immobilisés sur la membrane de réaction. Le second puits de réaction sert de contrôle interne. Les deux puits de réaction sont ensuite lavés avec une solution de lavage afin de diminuer l'interférence des protéines contaminants avant

l'ajout du substrat. Les tests de réactions sont incubés pendant cinq minutes supplémentaires durant lesquelles le conjugué enzymatique réagit avec le substrat.

D9-PR50 RECHERCHE DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE GDH

Page 2 / 6

 <p>Hôpital Le Corbusier Firminy Laboratoire</p>	RECHERCHE DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE GDH			REFERENCE : D9-PR50
				VERSION 2
	Validation : FLATTIN Marianne 2017-08-03	Approbation : LAYKA Ayham 2017-09-06	Application : 2017-09-06	Page 3 / 6

Matériel : Référence et conditions de stockage du (des) réactif(s) utilisé(s) :

- Immunocard, *C.difficile* GDH, réf : 716050 est commercialisé par la société Meridian, stocké dans le frigo B-F3, clayette 5.

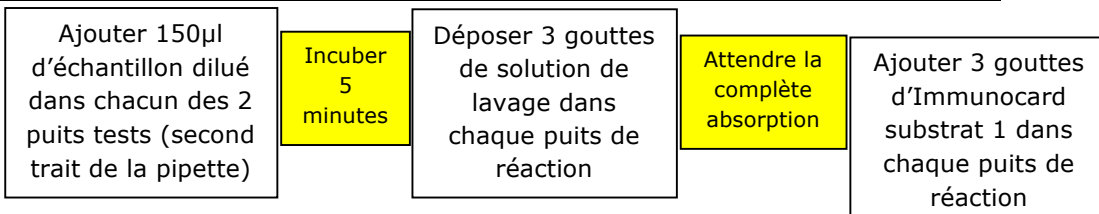
Conservation des prélèvements :

L'échantillon doit être conservé à 2-8°C pendant maximum 3 jours jusqu'à la réalisation du test.

Mode opératoire de la GDH :

- Coller l'étiquette sur le cahier de traçabilité des résultats de Clostridium difficile.
- Amener les cartes de test, les réactifs et les échantillons à température ambiante. Les réactifs peuvent prendre jusqu'à 60 minutes pour atteindre la température ambiante.
- Identifier un tube à hémolyse.
- Ajouter 200µl de diluant échantillon/contrôle négatif en utilisant le compte goutte.
- Ajouter immédiatement l'échantillon de selle à l'aide d'une pipette de transfert :
 - 25µl (1^{er} trait) pour les selles liquide/semi liquide.
 - Environ 2mm de selle homogénéisée pour les selles solides.
- Ajouter 3 gouttes de conjugué enzymatique (bouchon rouge).
- Vortexer 10 secondes.
- Laisser agir 15 minutes à température ambiante.
- Vortexer 10 secondes.
- Ouvrir 1 carte de test, l'identifier.

	RECHERCHE DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE GDH			REFERENCE : D9-MO50
				VERSION 2
	Validation : FLATTIN Marianne 2017-08-03	Approbation : LAYKA Ayham 2017-09-06	Application : 2017-09-06	Page 4 / 6



- Laisser incuber 5 minutes puis lire le résultat dans les 30 secondes qui suivent la fin d'incubation.

Contrôles de qualité :

Les contrôles sont à faire à chaque changement de lot et à chaque réception :

- Contrôle positif externe : remplacer l'échantillon de selles par une goutte de contrôle positif (bouteille grise) dans le tube à essai et techniquer comme un échantillon.
- Contrôle négatif externe : remplacer l'échantillon de selles par 25 µl de diluant dans le tube à essai et techniquer comme un échantillon.

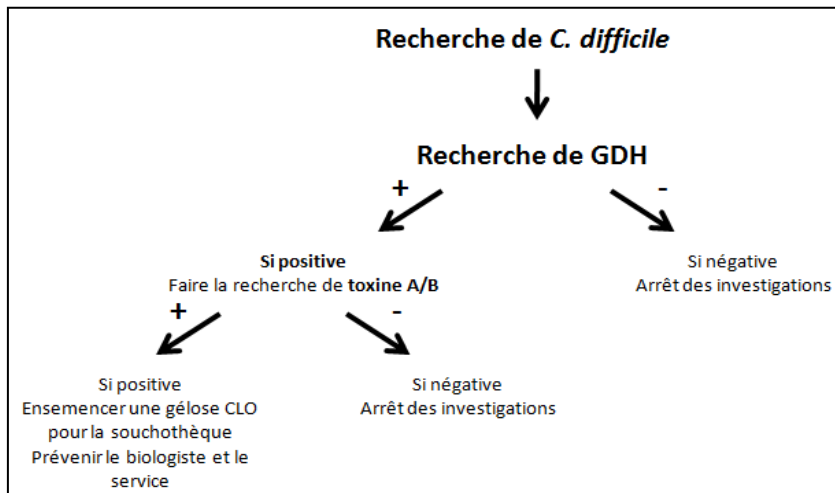
	RECHERCHE DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE GDH			REFERENCE : D9-PR50
				VERSION 2
	Validation : FLATTIN Marianne 2017-08-03	Approbation : LAYKA Ayham 2017-09-06	Application : 2017-09-06	Page 5 / 6

Lecture et interprétation des résultats :



Tous les résultats sont rentrés en double saisie sur Hexalis et noter sur l'étiquette collée sur le cahier avec les initiales de la technicienne(cf. D2-MO02 « Validation analytique sur Hexalis »).

Suivre l'arbre décisionnel selon le résultat obtenu :



	RECHERCHE DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE GDH			REFERENCE : D9-PR50
				VERSION 2
	Validation : FLATTIN Marianne 2017-08-03	Approbation : LAYKA Ayham 2017-09-06	Application : 2017-09-06	Page 6 / 6

3. EEQ

Le laboratoire est inscrit au programme de la société Eurobio comprenant 3 enquêtes de 4 échantillons par an (cf. D1-ENR09 « Planning annuel des EEQ en bactériologie »).

ARCHIVAGE :

Documents introduits par le mode opératoire :

- Feuilles de paillasse : Scanners

Les règles de classement et d'archivage sont décrites dans la procédure I2 – PR 02 « Gestion des enregistrements et archivage ».

ANNEXE VIII :

Etude comparative des performances du test GDH, Méridian sur la détection de *Clostridium difficile* dans 120 selles.

Essai réalisé par le Dr Valérie LALANDE

valerie.lalande@sat.aphp.fr - Téléphone : 033 (0)1 49 28 29 09
Hôpital Saint-Antoine, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris
Centre Hospitalo-Universitaire Paris VI - Service de Bactériologie du Pr JC. Petit
184 rue du faubourg Saint Antoine 75012 Paris, France

Dans le cadre du diagnostic microbiologique des infections à *Clostridium difficile* (ICD), les dernières recommandations européennes préconisent de réaliser un diagnostic rapide. De nombreux experts préconisent des algorithmes diagnostiques en 2 (voire 3) étapes : la première étape consisterait, par exemple, à « screener » les selles à l'aide d'une méthode ayant une excellente valeur prédictive négative (par exemple recherche de la GDH) et la seconde étape consisterait à confirmer les résultats positifs à l'aide d'une méthode plus spécifique pour déterminer le pouvoir toxigène de la bactérie.

Objectifs : Comparer les performances du test immuno-enzymatique GDH Méridian® (GDH M), France au test GDH QuikChek (QC) (Alere, France) et à la culture toxigénique.

Méthodes :

Entre le 15 Mai et le 10 Juin 2011, 120 selles consécutives adressées au laboratoire pour le diagnostic d'ICD ont été testées par les trois méthodes.

Pour cet essai, ont été utilisés:

1. La culture toxigénique comme méthode de référence : sur milieu gélosé sélectif (TCCA) (10 mg/l de céfoxitine et 250 mg/l de cyclosérine) additionné de 0.1% de taurocholate (acide biliaire permettant la germination des spores) pour la mise en évidence de colonies de *Clostridium difficile*. Ce milieu **TCCA** est fabriqué et contrôlé au laboratoire. La **Détermination du pouvoir toxigène** des souches a été faite par la technique de référence : test de cytotoxicité *in vitro* (TCIV ou cytotoxicassay (CTA)). Ce test est réalisé lorsque le test de cytotoxicité sur selles est négatif et qu'une souche est isolée à partir des selles sur milieu TCCA. On ensemence la souche de *Clostridium difficile* dans un bouillon régénéré de Coeur Cerveille (BHI). Après 5 jours d'incubation à 37°C, la culture bactérienne est filtrée. Ce filtrat stérile est déposé sur une culture cellulaire de fibroblaste (cellule MRC 5). L'effet cytopathogène est observé après 18-24 heures d'incubation.

2. La recherche de la Glutamate déshydrogénase (GDH)

Deux tests immunoenzymatiques unitaires : GDH QUIK CHEK, TechLab, Alere et GDH, Méridian ont été utilisés selon les recommandations des fournisseurs.

Le test GDH C. Diff était réalisé le jour même de la réception de l'échantillon et au maximum 48 heures après leur réception. Dans ce cas de figure, les échantillons étaient conservés à +4°C.

Le test GDH Méridian était réalisé en aveugle le même jour que le test GDH C. Diff par un autre opérateur

3. Contrôle des cas de discordance avec les résultats de culture :

Une technique d'amplification LAMP (///umigène™, Méridian) sur les selles est réalisée.

RESULTATS

Tableau I : Résultats des échantillons positifs par les tests GDH et par la culture

GDH C DIFF QUIK CHEK	GDH MERIDIAN	CULTURE	POUVOIR TOXINOGENE de la souche	Nombre d'échantillons (n=120).
NEG	NEG	NEG	NA	100
NEG	POS	NEG	NA	2
NEG	POS	POS	NEG	1
NEG	POS	POS	POS	1
POS	POS	POS	NEG	2
POS	POS	POS	POS	14

Tableau II : Résultats du test GDH QUIK CHEK comparés à la culture.

	Culture	
	Positif	Négatif
GDHQC+	16	0
GDHQC-	2	102

Tableau III : Résultats du test GDH Meridian comparés à la culture.

	Culture	
	Positif	Négatif
GDH Méridian+	18	2*
GDH Méridian-	0	100

- Les deux échantillons testés par amplification donnent des résultats négatifs

Tableau IV : Performances des tests GDH par rapport à la technique de référence.

	Sensibilité	Spécificité	Concordance
GDH QC	88,9%	100%	98,3%
GDH Méridian	100%	98,3%	98,3%

Résultats : Dix huit selles étaient positives en culture (15%). Quatorze échantillons étaient positifs par les trois méthodes. Un échantillon était négatif par la technique QC et positif par GDH Méridian. Pour trois selles, les souches étaient déterminées comme non toxigènes. Parmi ces trois échantillons, dans un cas le test GDH QC était négatif. Deux échantillons étaient uniquement positifs par le test GDHM, les résultats des cultures et des tests illumigene étaient négatifs. La sensibilité et la spécificité des tests GDH QC et Méridian étaient de 88,9% et 100% et de 100% et 98,3% respectivement. **La corrélation des deux tests avec la culture étaient de 98,3%.**

Conclusion : Dans cette étude, le test immuno-enzymatique GDH, Méridian présente une très bonne sensibilité. Les résultats sur un effectif de 120 échantillons sont encourageants pour considérer que son utilisation est compatible avec la stratégie de screening pour le diagnostic des infections à *Clostridium difficile*.

ANNEXE IX :



3475 River Hills Drive
Cincinnati, Ohio 45244
Telephone: 513.271.3700
www.MeridianBioscience.com

Français

Cher client,

Nous vous remercions pour votre demande concernant la stabilité, le transport, les conditions de stockage de nos produits de diagnostic. Les réactifs et les coffrets de diagnostic fabriqués et/ou distribués par Meridian Bioscience sont stockés à température ambiante et/ou au réfrigérateur à 2-8 ° C, à l'exception du complément de cochon d'Inde qui est inclus dans le coffret MERIFLUOR EBV-NA (AB ACIF). Le complément de cochon d'Inde est stocké à -20 ° C jusqu'au moment de l'expédition. La plupart des coffrets à température ambiante sont conservés à 19-27 ° C. Certains produits peuvent avoir diverses températures ambiantes de stockage, aussi nous vous demandons de bien vouloir vérifier la température en relisant la notice et/ou les étiquettes des réactifs ou du coffret. Pour tous les coffrets, vous trouverez Les conditions de stockage renseignées dans la notice et sur les étiquettes réactif, dispositif et / ou boîte du coffret.

Les tests de stabilité ont été effectués afin d'établir la durée de conservation des coffrets. Trois lots consécutifs sont testés. Un coffret est utilisé pour l'étude des conditions de transport, un pour l'étude dans les pires conditions d'utilisation et de stockage (stressé intentionnellement), et un pour l'étude dans les conditions normales d'utilisation et de stockage. Les coffrets sont ensuite testés à 3 mois d'intervalle. Pour chaque test, ils doivent répondre à leurs spécifications. Les tests de stabilité sont effectués chaque année pour confirmer la stabilité continue des composants.

Les études des conditions de transport sont effectuées afin de s'assurer de la stabilité des coffrets lorsque livrés à l'utilisateur final. Tous les coffrets sont conditionnés selon le code d'emballage mentionné en pièce jointe. Les coffrets sont alors exposés aux effets du transport pendant 3 jours à température ambiante. Ensuite, les coffrets sont mis à la température de stockage appropriée jusqu'à ce que le test soit effectué. Enfin, les coffrets sont testés afin de vérifier que leur performance continue de répondre aux spécifications.

Meridian Bioscience effectue des tests de stabilité en conformité avec les normes EN13640 « stability testing of in vitro diagnostic reagents ».

Avec nos meilleures salutations,

Anitra Allen
Product Specialist
Technical Service
Meridian Bioscience, Inc

LISTE DES EXAMENS COUVERTS ET DEMANDES A L'ACCREDITATION		Validation :		Approbation :		Application :	
		FLATTIN Marianne 2017-08-30		AOUFFEN W/hammed 2017-09-06		2017-09-06	
						REFERENCE : D1-ENR12 VERSION 6	
						Page 3 / 4	

ANNEXE X

ccréditation n° 8-3884		Examens couverts par l'accréditation						
Lieu de réalisation des opérations techniques (site, unité fonctionnelle, service, ...)	Domaine	Sous-Domaine	Sous-Famille	Examen / analyse	Nature de l'échantillon biologique (sang et dérivés, urine, selles, ...)	Principe de la méthode (préciser si automatisée avec le nom de l'automate ou manuelle, ainsi que la technique mise en œuvre)	Référence de la méthode (référence du document et version)	Remarque (ajout, changement automate, changement de méthode, changement de réactif...)
LBM du CH de FIRMIV	Biologie Médicale	HEMATOLOGIE	IMMUNOHEMATOBM	Recherche d'anticorps Irréguliers	Sang et dérivés	Agglutination en technique gel filtration sur colonne AUTOVUE ORTHO Méthode automatisée	D9-PR01 V2 D9-IM506 V2	
LBM du CH de FIRMIV	Biologie Médicale	MICROBIOLOGIE	BACTH	Ag urinaire de pneumocoque	Urine	Immunochromatographie sur membrane - Binax NOW 5 pneumonise. Méthode manuelle	D9-IM025 V3	
LBM du CH de FIRMIV	Biologie Médicale	MICROBIOLOGIE	BACTH	GDH Clostridium difficile	Selles	Immunoenzymatique sur membrane - Immunocard C.difficile GDH. Méthode manuelle	D9-IM050 V2	Ajout à partir du 22/09/2017

ANNEXE XI :

DOSSIER DE VERIFICATION D'UNE METHODE QUALITATIVE (PORTEE A)

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE

Détection de l'antigène GDH du Clostridium difficile dans les selles du patient

Processus simple ; Processus complexe nombre de sous-processus : 0

DESCRIPTION DU PROCESSUS

DESCRIPTION DU PROCESSUS		
processus	Éléments à vérifier (argumentation)	Modalités de vérification/validation ¹ : <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Répétabilité <input type="checkbox"/> Fidélité intermédiaire <input checked="" type="checkbox"/> Variabilité inter-opérateurs <input type="checkbox"/> Justesse <input type="checkbox"/> Exactitude <input checked="" type="checkbox"/> Sensibilité et spécificité analytique <input type="checkbox"/> Incertitudes <input checked="" type="checkbox"/> Etendue de mesure (limite de détection) <input checked="" type="checkbox"/> Comparaison de méthodes <input checked="" type="checkbox"/> Interférences <input checked="" type="checkbox"/> Contamination <input checked="" type="checkbox"/> Robustesse et fiabilité des réactifs <input checked="" type="checkbox"/> Intervalle de référence (valeurs seuils)

PROCESSUS : titre
Portée A <input checked="" type="checkbox"/> ; Portée B <input type="checkbox"/> (à justifier)

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande :	Antigène spécifique du Clostridium difficile (La glutamate déshydrogénase)
Principe de la Méthode :	<p>Réaction immunoenzymatique : Le conjugué enzymatique du coffret ImmunoCard<i>C. difficile</i> GDH consiste en des anticorps anti-GDH couplés à de la peroxydase de raifort.</p> <p>L'antigène GDH, s'il est présent dans les selles, forme un complexe GDH-Ac-anti GDH conjugué qui migre à travers la membrane vers les puits de réaction TEST.</p> <p>Le Complexe GDH- Ac-anti GDH conjugué, capturé au puits TEST par les anticorps immobilisés sur la membrane est ensuite visualisé par le développement d'une coloration bleue après l'ajout de substrat.</p>
Type d'échantillon primaire :	Echantillon de selles
Type de récipient, additifs :	Poudrier de coproculture
Prétraitement de l'échantillon :	conservé entre 2-8°C (3 jours maximum) si différé
Unités :	N/A
Critères d'interprétation² :	Méthode qualitative (positive / négative)
Marquage CE (Oui/Non) :	oui
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	N/A
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	N/A
Référence du réactif :	Fiche fournisseur : « ImmunoCard <i>C. difficile</i> GDH » Fournisseur : Meridan Bioscience Europe Référence : 716050
Matériau d'étalonnage (références) :	N/A
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	N/A

² Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...

MISE EN ŒUVRE	
Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	LAYKA Ayham (Biologiste médical) MONCHAND Aurélie (Technicienne de bactériologie)
Procédure de validation/mode opératoire :	D9-PR 50 « Recherche de <i>Clostridium difficile</i> GDH
Procédure de gestion de la portée flexible :	D1-PR03 « Gestion de la portée flexible »
Période d'étude :	Préciser Du : 01/06/17 au 30/08/17
Date de 1^{ère} utilisation :	22/09/2017 sous accréditation (méthode déjà utilisée au laboratoire depuis 2014)

MAITRISE DES RISQUES				
Indice de criticité : 1 : non critique, 2 : peu critique, 3 : moyennement critique, 4 : critique, 5 : très critique				
5M	Points critiques	Echelle de criticité ³	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matière (échantillons)	Identité	4	Formation et information du personnel	Règle d'identitévigilance : C1-PR01 « traitement des demandes d'examen »
	Préparation du patient	3	Information des patients et préleveurs	Fiche Instructions : C1-INS03 « Préconisation pour le patient - Recueil de selles »
	Type de contenants	2	1- Information du patient et du personnel soignant et paramédical	1/3 Guide des examens C1-INS02 1/3 C1-INS03 « Préconisation pour le patient : recueil de selles » :
	Nature et volume de l'échantillon	1	2- Contrôle à réception	
	Délai et température avant traitement	4	3- délai d'acheminement : Rapide ou conservé entre 2°-	2/3 – Fiche d'instruction : C3-INS07 « Critères d'acceptation et de refus des échantillons »

³A préciser par le laboratoire, par exemple 1 non critique – 5 très critique ;

MAITRISE DES RISQUES

Indice de criticité : 1 : non critique, 2 : peu critique, 3 : moyennement critique, 4 : critique, 5 : très critique

5M	Points critiques	Echelle de criticité ³	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
	analytique		8°C si envoi différé	2-Personnel formé et habilité : documents fournisseur : D9-DF016 Classeur Meridian
	Prétraitement	4	Conservation des échantillons entre 2-8°C au laboratoire si différé	Enceinte réfrigérée entre 2-8°C : enregistrements des températures « logiciel SIRIUS » procédure J2-PR01 « gestion de métrologie »
	Interférences	2	Contrôle à réception : sanglantes ou hémorragiques	Personnel formé et habilité : documents fournisseur : D9-DF016 Classeur Meridian
Milieu	Conditions de conservation des échantillons (t°, ...)	4	Enceinte réfrigérée entre 2 et 8°C Température ambiante de la salle technique : 20 à 26 °C :	-Enregistrements des températures « logiciel SIRIUS » : procédure J2-PR01 « gestion de métrologie »
	Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (t°, ...)			-Documents fournisseur : D9-DF016 Classeur Meridian, D9-PR50 procédure « Recherche de <i>Clostridium difficile</i> GDH
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur			-Salle de bactériologie climatisée : enregistrements des températures « logiciel SIRIUS » procédure J2-PR01 « gestion de métrologie »

MAITRISE DES RISQUES

Indice de criticité : 1 : non critique, 2 : peu critique, 3 : moyennement critique, 4 : critique, 5 : très critique

5M	Points critiques	Echelle de criticité ³	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matériel (équipements)	<p>1-Surveillance des dérives</p> <p>2- Contamination</p> <p>3- Informatique</p>	4	<p>1 -Poste de Sécurité en Microbiologie /Chronomètre</p> <p>2- Respect des préconisations du fournisseur</p> <p>3-Saisie des résultats</p>	<p>1-Maintenance journalière et hebdomadaire du PSM : Logiciel « GesMat »</p> <p>1-Maintenance annuelle du PSM par un prestataire externe</p> <p>1-Vérification annuelle du chronomètre : matériel référencé sur le logiciel GesMat et contrôlé 1fois/an par technicien référent en métrologie : procédure J2-PR01 « gestion de métrologie »</p> <p>2- Documents fournisseur: D9-DF016 Classeur Meridian</p> <p>3- Cahier de traçabilité des résultats, double saisie sur le SIL : D9-PR50 procédure « Recherche de <i>Clostridium difficile</i> GDH »</p> <p>, D2-MO02 « Validation analytique sur hexalis »</p>
Matériel (réactifs)	<p>1-Conservation et</p> <p>2-conditions d'utilisation</p>	4	<p>1-Conservation des réactifs entre 2-8°C</p> <p>2- porter le coffret à T° ambiante avant utilisation et retourner immédiatement à 2-8 °C après utilisation</p>	<p>1-Enregistrements des températures « logiciel SIRIUS » procédure J2-PR01 « gestion de métrologie »</p> <p>2-Documents fournisseur D9-DF016: Classeur Meridian, D9-PR50 procédure « Recherche de <i>Clostridium difficile</i> GDH »</p>

MAITRISE DES RISQUES

Indice de criticité : 1 : non critique, 2 : peu critique, 3 : moyennement critique, 4 : critique, 5 : très critique

5M	Points critiques	Echelle de criticité ³	Éléments à maîtriser	Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
	Contamination	2	Intégrité du réactif : inspecter les réactifs avant utilisation	Documents fournisseur/ fiches habilitations : D9-DF016Classeur Meridian
	Gestion des stocks	3	-Gestion des stocks -Acceptation à réception des réactifs, Intégrité du coffret -Vérification date de péremption	-Logiciel de gestion des stocks : GESTOCK : procédure K2-PR02 « utilisation du logiciel GesStock en routine », mode opératoire K2-MO10 « réception des produits sur GesStock » -Contrôle à réception (Contrôle visuel du coffret et CIQ) : D9-PR50 procédure « Recherche de <i>Clostridium difficile</i> GDH» -Documents fournisseur : Fiche de stress D9-DF016: Classeur Meridian
Méthode	Limites de la méthode 1-limite de détection 2-interférences 3- Sensibilité, spécificité	2	1-limite de détection 2-interférences 3- Sensibilité, spécificité	1/2/3- Documents fournisseur : D9-DF016Classeur Meridian 3-Personnel formé et habilité : documents fournisseur : D9-DF016 Classeur Meridian
	intervalle de référence	4	Lecture visuelle : toute couleur bleue (même de faible intensité) est considérée comme significative	-Documents fournisseur/ fiches habilitations D9-DF016 Classeur Meridian

MAITRISE DES RISQUES

Indice de criticité : 1 : non critique, 2 : peu critique, 3 : moyennement critique, 4 : critique, 5 : très critique

5M	Points critiques	Echelle de criticité ³	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
	Vérification des performances en continu	5	1-CIQ : Contrôle négatif/contrôle positif 2-Qualité de la carte 2-EEQ	1-CIQ à chaque changement de lot et de livraison : D9-PR50 procédure « Recherche de <i>Clostridium difficile</i> GDH» 2-un contrôle-test de migration intégré dans chaque carte (témoin) 3- Participation au programme EEQ : D1-ENR09 « planning annuel des EEQ en bactériologie »EEQ (3 fois/an)
Main d'œuvre (Personnel)	Compétence et maintien de compétence du personnel	5	1- Personnel habilité 2- Maintien de compétence	1/2- procédure G1-PR03 «qualification et habilitation » 1/2- Documents fournisseur/ fiches habilitations D9-DF016 Classeur Meridian 1/2Traçabilité : sur le cahier de résultat et sur la saisie sur l'informatique du résultat : D9-PR50 procédure « Recherche de <i>Clostridium difficile</i> GDH» 2-Participation au programme EEQ : D1-ENR09 « planning annuel des EEQ en bactériologie »

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

VARIABILITE INTER-OPERATEURS

Applicable ; non applicable

Techniciens de bactériologie : aptitude routine	Techniciens habilités réalisant au minimum 15 tests /an
Techniciens : aptitude garde	Techniciens habilités : s'ils ne réalisent pas 15 tests par an, ils doivent être réhabilités

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE

(étude expérimentale indispensable en portée B)

(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)

Applicable ; non applicable (à justifier)

Vérification bibliographique	Données bibliographiques issues de documents fournisseurs.☑
-------------------------------------	---

Etude comparative effectuée sur 120 selles entre la méthode de référence : la culture et la méthode de Meridian : test GDH

		CULTURE	
		-	+
GDH MERIDIAN	-	100	0
	+	2	18

Vrais positifs : 18

VPP = 90%

Faux positifs : 2

VPN = 100%

Vrais négatifs : 100

Sensibilité = 100%

Faux négatifs : 0

Spécificité = 98.03%

Conclusion : dans cette étude, le test immuno-enzymatique GDH, Meridian présente une très bonne sensibilité. Les résultats sur un effectif de 120 échantillons permettent de considérer que l'utilisation de ce test est compatible avec la stratégie de dépistage de *Clostridium difficile*.

INCERTITUDE DE MESURE :
Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input checked="" type="checkbox"/>
Cf. tableau de maitrise de risques 5 M

COMPARAISON DE METHODES :
Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>
Seule méthode utilisée au laboratoire.

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B)	
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour :	
troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...)	
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Limite de détection :	Document fournisseur : la limite de détection du test Immunocard <i>C. difficile</i> est de 10ng/ml sur selle et de 1,0 ng/ml lorsque diluée. (mentionné sur le compte-rendu de résultats)

INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B)	
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire)	
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Entre souches bactérienne	Une réaction croisée avec ImmunocardC.difficile est observée avec le staphylocoque aureus (souche Cowan1). (données fournisseur)
sang	Les échantillons contenant du sang à des concentrations supérieures à 40% produisent des résultats faussement négatifs. (données fournisseur)

CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>
Pas decontamination entre échantillon, puisque les tests sont des cartes unitaires.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Stabilité des réactifs après ouverture	Conservation du coffret entre 2-8°C, utilisation à température ambiante et remis entre 2-8°C après utilisation. La date de péremption figure sur l'étiquette et suivie sur le logiciel GesStock.

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Valeur seuils	Le test est qualitatif et aucune interprétation quantitative ne doit être effectuée en rapport avec l'intensité de la couleur. Lecture visuelle des résultats : toute couleur bleue, même de faible intensité, est considérée comme positive (pas de résultat douteux). Données fournisseur

DECLARATION d'APTITUDE
Conclusion : La méthode est déclarée apte à l'utilisation dans les conditions opératoires du laboratoire pour la recherche d'antigène spécifique (GDH) du <i>Clostridium difficile</i> dans les selles d'origine humaine. Méthode utilisée sous accréditation à partir du 22/09/17.
Autorisée par : Dr. LAYKA Ayham, Biologiste médical

VIII. RESUME

Le sujet de ce mémoire est la validation d'une méthode qualitative en bactériologie, c'est la détection de l'antigène GDH du *C. difficile*. Les recommandations américaines et européennes préconisent actuellement, pour la recherche du *C. difficile*, un algorithme en 2 ou 3 étapes, la première étape consiste à dépister les selles par la détection de la GDH.

Ce travail a été réalisé en respectant la norme ISO 1518 : 2012 et à l'aide des guides techniques du COFRAC et les recommandations des sociétés savantes. Il a été effectué dans le cadre de la gestion de la portée flexible du laboratoire.

Le travail a été structuré en suivant la démarche recommandée dans le guide SH GTA 04 et plus précisément la partie concernant la validation de méthode qualitative. Préalablement à la vérification des performances de la méthode qui s'est basée sur la recherche bibliographique, j'ai procédé à une analyse de risques par la méthode 5 M, qui prend en compte les risques associés à la Matière, le Matériel, la Main d'œuvre, la Méthode et le Milieu. Puis il était nécessaire de réaliser la révision de la procédure et effectuer l'habilitation des techniciens, les deux, nécessaires à la base documentaire du dossier, avant de terminer par remplir le formulaire SH FORM 43.

L'étude nous a permis de conclure que les risques sont maîtrisés et que la méthode est satisfaisante au regard de la pertinence clinique et de l'état de l'art.

Enfin, il a été conclu que notre méthode est apte à l'utilisation dans les conditions opératoires du laboratoire pour la recherche de l'antigène spécifique (GDH) du *Clostridium difficile*.

