

Université Pierre et Marie Curie  
Sorbonne Universités

MÉMOIRE  
POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE  
« ASSURANCE QUALITÉ AU LABORATOIRE  
DE BIOLOGIE MÉDICALE »  
2017-2018

Mise en place des contrôles internes de qualité  
pour les antifongigrammes en mycologie

AZADAN BUI JULIE  
ANNEE 2017-2018

**Note au lecteur :**

« Les mémoires des stagiaires du Diplôme Universitaire « Assurance Qualité au laboratoire de biologie médicale » sont des travaux réalisés pendant l'année de formation. Les opinions exprimées n'engagent que les auteurs. Les travaux ne peuvent faire l'objet d'une publication en tout, ou partie, sans l'accord de l'auteur et du responsable du D.U concerné ».



**AZADAN BUI JULIE**

Technicienne de laboratoire

Référent qualité

Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie  
Hôpital Saint-Louis  
Assistance Publique Hôpitaux de Paris - APHP

1, avenue Claude Vellefaux  
75475 PARIS Cedex 10

## REMERCIEMENTS

Je souhaite avant tout remercier l'ensemble de l'équipe du service de Mycologie/Parasitologie pour leur participation dans la réalisation des techniques malgré les difficultés rencontrées dans l'organisation de la structure.

Je tiens à remercier **Nathalie TIERTANT** pour le temps qu'elle m'a consacré à m'apporter les outils méthodologiques indispensables dans la rédaction de mon mémoire. Son exigence m'a grandement stimulée.

Je remercie également **Géraldine GOUDEFROYE**, ma cadre médico technique qui m'apporte son soutien dans ma fonction de référent qualité également **Dieyenaba SIBY DIAKITE** et **Sandra RAABON** pour leur motivation et leur participation active dans l'élaboration de ce mémoire.

J'adresse mes remerciements au Dr **Samia HAMANE** et le Dr **Nicolas GUIGUE** qui par leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et ont répondu à mes interrogations durant ce travail.

Je remercie l'ensemble des intervenants du Diplôme Universitaire « Assurance Qualité au laboratoire de Biologie Médicale », et particulièrement **Pascal PERNET** principal acteur de cette formation.

Et enfin, je remercie, **Elisabeth FAURE** et **Béatrice MARECHAL** d'avoir accepté que je suive cette formation dans le cadre de la formation continue.

# SOMMAIRE

GLOSSAIRE .....	6
DEFINITIONS .....	7
INTRODUCTION.....	8
1. PRESENTATION.....	9
1.1 Présentation du service de mycologie-parasitologie de l'hôpital Saint Louis.....	9
1.2 La démarche Qualité du laboratoire B2P .....	10
1.3 L'avancement du service de mycologie et parasitologie dans la démarche qualité.....	10
1.4 Mon rôle dans la structure .....	11
2. CONTEXTE .....	12
3. Etat des lieux, problématique et limite .....	15
3.1 Etat des Lieux.....	15
3.2 Problématique .....	15
3.3 Limite .....	15
4. METHODE.....	16
4.1 Planifier (PLAN).....	16
4.1.1 Revu documentaire .....	16
4.1.2 Matériels.....	17
4.2 Faire (DO) .....	18
4.2.1 Analyse de risque .....	18
4.2.2 Mise en place des CIQ .....	23
4.2.3 Périodicité des CIQ .....	24
4.2.4 Revue documentaire .....	25
4.3 Vérifier (CHECK) .....	25
4.3.1 Répétabilité de l'antifongogramme.....	25
4.3.2 Focus sur la variabilité inter-opérateur .....	26
4.4 Agir (ACT).....	28
CONCLUSION .....	29
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	30
TABLES DES ANNEXES.....	31

# GLOSSAIRE

## Abréviation :

**ACP** : Anatomie Cytologie Pathologique

**APHP** : Assistance Publique- Hôpitaux de Paris

**ATCC** : American Type Culture Collection

**ATF** : Antifongigramme

**B** : cotation nomenclature NABM (Nomenclature des Actes de Biologie Médicale)

**BHN** : cotation hors nomenclature NABM

**B2P** : Biologie Pathologie Physiologie

**CLSI** : Institut Clinique des Laboratoires Standards

**CIQ** : Contrôle Interne de Qualité

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**I** : Intermédiaire

**LBM** : Laboratoire de Biologie Médicale

**LRB** : Lariboisière

**R** : Résistant

**RQS** : Référent Qualité Structure

**SGL** : Système de Gestion du Laboratoire

**SLS** : Saint-Louis

**S** : Sensible

## DEFINITIONS

**Contrôle interne de qualité** : échantillon permettant de vérifier que la qualité prévue des résultats est bien obtenue

**Concentration Minimale Inhibitrice** : c'est la plus faible concentration d'antifongique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une souche donnée après une certaine période d'incubation.

**Kalilab** : logiciel de gestion documentaire qualité

**MALDI-TOF** : (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight) : est un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol

**VITEK<sup>®</sup> MS** : système d'identification automatisé utilisant la technologie de spectrométrie de masse MALDI-TOF

**Seuil de sensibilité clinique ou clinical breakpoint (CBP)** : prend en compte les caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de chaque antifongique, et des études mettant en évidence un lien entre CMI et succès thérapeutiques chez l'homme. Il permet l'interprétation des CMI et la catégorisation des souches en Sensible – Intermédiaire – Résistant. Ces seuils ont pour but d'avoir une pertinence clinique. Une souche est considérée comme sensible ou résistante lorsque le niveau d'activité antifongique est associé à une forte probabilité, de succès ou d'échec thérapeutique.

# INTRODUCTION

La Mycologie est une discipline de biologie médicale dont la plupart des techniques sont réalisées manuellement (examen direct, ensemencement, sensibilité aux antifongiques...). La mise en place, ainsi que l'interprétation, de contrôles de qualité interne (CQI) satisfaisants sont primordiales car cette discipline est confrontée à de grandes variabilités des agents fongiques étudiés (levures ou filamenteux). L'étude de la sensibilité aux antifongiques (antifongigramme) s'inscrit dans cette démarche. Cet examen a pour but de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'une souche fongique vis-à-vis de divers antifongiques. La fiabilité d'un antifongigramme est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés.

Le chapitre 5.6 de la norme NF EN ISO 15189<sup>1</sup> relatif à l'assurance qualité des processus analytiques exige des laboratoires de biologie médicale (LBM) la mise en place de systèmes de « contrôles internes de qualité (CIQ) permettant de vérifier la qualité prévue des résultats ». Sa mise en œuvre permet d'apporter la preuve de la maîtrise du processus analytique, de prévenir des anomalies et de fournir les données nécessaires quant à l'évaluation de l'incertitude des résultats. Ainsi, le laboratoire doit évaluer l'impact des processus de travail et défaillances potentielles sur la qualité des résultats des examens. Les termes Contrôles qualités et maîtrise des risques sont des notions clés de la démarche qualité.

L'objectif de ce travail est de mettre en place un système de contrôle qualité interne pour les antifongigrammes concernant les levures. Je me suis basée sur la méthode PDCA (plan, do, check, act) afin de respecter aux mieux les exigences de la norme, ainsi que sur les procédures transversales de notre laboratoire B2P (laboratoire de biologie médicale et d'ACP).

# 1. PRESENTATION

## 1.1 Présentation du service de mycologie-parasitologie de l'hôpital Saint Louis

L'hôpital Saint Louis appartient au groupe hospitalier SLS/LRB/FW qui regroupe 10 pôles d'activités cliniques et médico techniques et dispose d'une capacité de 1410 lits. Reconnu pour son expertise dans plusieurs domaines à savoir les greffes d'organes et de moelle osseuse, en hématologie, en oncologie, en dermatologie et en réparations cutanées, il propose également une offre de soin dans le domaine des maladies infectieuses et tropicales dont la plupart des activités sont associées au service de mycologie-parasitologie.

Le pôle B2P est un pôle hospitalo-universitaire organisé par discipline biologique ou médicale. Le laboratoire B2P appartient au pôle B2P, regroupe plusieurs structures (ou services) réparties sur les sites de Saint-Louis et Lariboisière. Le service de mycologie parasitologie où se décline ma démarche appartient au laboratoire B2P (cf. annexe I : organisation du laboratoire B2P).

Les principales activités du service de mycologie parasitologie sont :

- Le diagnostic direct, immunologique et moléculaire des infections parasitaires (toxoplasmose, microsporidiose, cryptosporidiose...) et fongiques (aspergillose, pneumocystose, autres mycoses opportunistes) des patients hospitalisés et des consultants
- La réalisation des prélèvements de mycologie au sein de la policlinique de Dermatologie de l'hôpital, des prélèvements spécialisés en salle (recherche de sarcopte, parasite responsable de la gale, recherche de leishmaniose...)
- Suivi mycologique de l'environnement dans le cadre de la prévention des infections fongiques invasives

En 2017, il réalise une activité de 1 883 115 (en B) et 7 234 070 (en BHN).

## 1.2 La démarche Qualité du laboratoire B2P

L'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010<sup>2</sup> oblige les LBM à accréditer leurs pratiques conformément à la norme NF EN ISO 15189. Le biologiste responsable du laboratoire (le chef de pôle B2P) a défini une politique qualité consistant à mettre en place, conformément aux exigences de la norme, un système de management de la qualité (SMQ) à veiller à son application et son suivi. En mai 2013, le laboratoire du pôle B2P s'est engagé dans une démarche d'accréditation. Depuis fin 2017, 50% des examens réalisés dans le laboratoire B2P sont accrédités pour les sous familles Biologie Médicale biochimie, Hématologie, immunologie, microbiologie et génétique (Cf. figure 1)

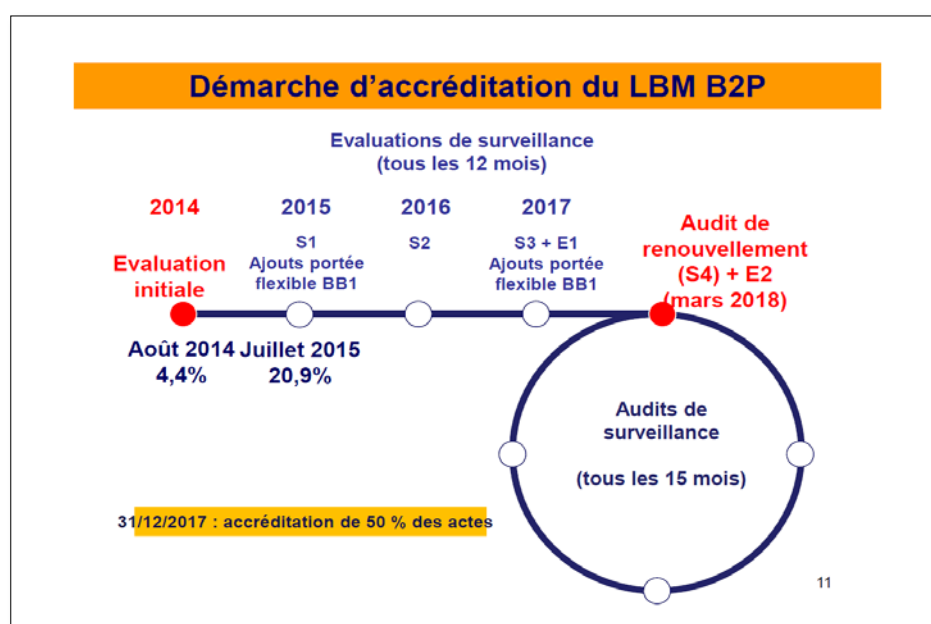


Figure 1 : avancement de la qualité du pôle B2P

## 1.3 L'avancement du service de mycologie et parasitologie dans la démarche qualité

Le service de mycologie et parasitologie est accrédité par le COFRAC depuis 2017 selon les normes NF EN ISO 15189 sur la recherche du paludisme, l'ensemencement des examens mycologiques isolés, l'examen direct ainsi que la recherche d'antigène aspergillaire sérique. En 2018, l'accréditation pour l'examen de PCR toxoplasmose a été obtenue. Pour 2019, le service demande une extension pour une nouvelle ligne de portée avec l'examen de PCR aspergillaire (Cf. tableau 1).

Familles	Ligne de portée	Nom de l'examen	Principe de la méthode
ISEROBM	IB1	Aspergillose : recherche Antigène diagnostic par une technique EIA	ELISA, spectrophotometrie
PARASITO/MYCO	PM1	Examen mycologique isolé : identification de genre levures et champignons filamenteux	Examen direct : Noir Chorazol, Calcofluor et Lactophénol
PARASITO/MYCO	PM1	Examen mycologique isolé : identification de genre levures et champignons filamenteux	Ensemencement
PARASITO/MYCO	PM7	Hématozoaires : recherche en frottis et en goutte épaisse	Coloration lames
PARASITO/MYCO	PM7	Paludisme : recherche Ag solubles par technique immunochromatographique	Immunochromatographie
PARASITO/MYCO	PM8	PCR toxoplasmose	PCR temps réel

**Tableau 1 : Liste des analyses accréditées au sein de la structure parasitologie et mycologie**

#### 1.4 Mon rôle dans la structure

La cellule qualité du laboratoire B2P a mis en œuvre un pilotage du système management de la qualité dans chaque structure par l'intermédiaire des RQS (référénts qualité structure) dont les missions principales sont de veiller dans chaque structure à la mise en œuvre de la :

- Gestion de la démarche qualité du LBM
- Gestion de la politique qualité dans sa structure
- Gestion des formations et habilitation du personnel
- Gestion de la documentation qualité de sa structure

Investie de cette mission depuis peu, avec l'aide d'un biologiste RQS et d'une technicienne RQS, je m'occupe du suivi de l'habilitation du personnel non médical et je suis administrateur Kalilab (Cf. annexe II : organigramme du service de mycologie/ parasitologie).

## 2. CONTEXTE

L'antifongogramme permet de prédire l'efficacité et la surveillance du traitement. Il est recommandé dans plusieurs situations cliniques lors d'un isolement d'une souche d'un site normalement stérile, lors d'une infection invasive, lors d'une infection par une espèce rare ou lors d'une suspicion d'échec thérapeutique.

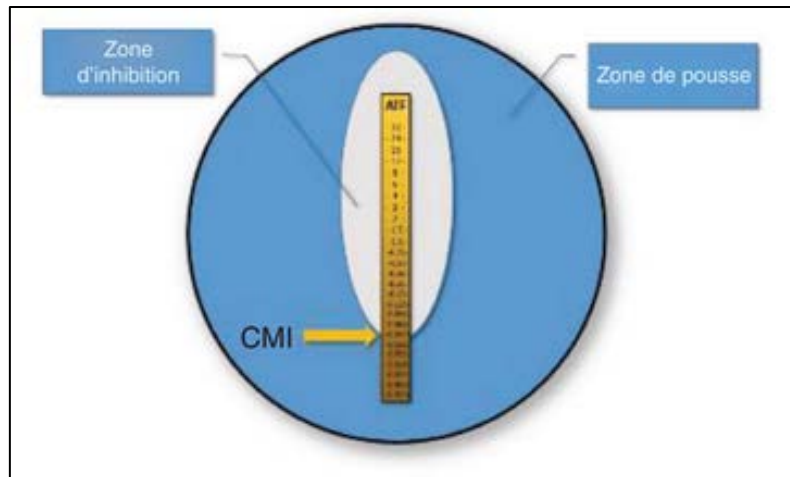
Il existe actuellement deux méthodes de référence, pour la détermination in vitro de la sensibilité des champignons aux antifongiques. Ce sont des techniques de micro-dilution en milieu liquide, développées soit par le CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) aux USA, soit par l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) en Europe qui permettent d'obtenir des valeurs fiables de Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). Des valeurs seuils ont été définies et ont permis de classer des souches selon leurs sensibilités aux antifongiques en trois groupes : sensible, sensibilité dose dépendant et résistant.

Ces deux méthodes de références internationales ont été standardisées afin d'établir un profil de sensibilité in vitro des levures et des champignons filamenteux aux antifongiques. Méthodologiquement, ces deux techniques sont très proches mais diffèrent par la taille de l'inoculum, la composition du milieu, le temps d'incubation et la lecture des CMI (visuel ou par spectrophotométrie). Ces deux méthodes non commercialisées, sont très lourdes de réalisation et non adaptées pour la routine en laboratoire.

En pratique, le service utilise des méthodes commercialisées bandelettes Etest® (BioMérieux) pour déterminer les CMI en milieu gélosé par diffusion. Ces bandelettes contiennent un gradient de concentrations d'antifongiques. Une suspension de champignon est préparée et ajustée à 0,5 McFarland à l'aide d'un étalon standard.

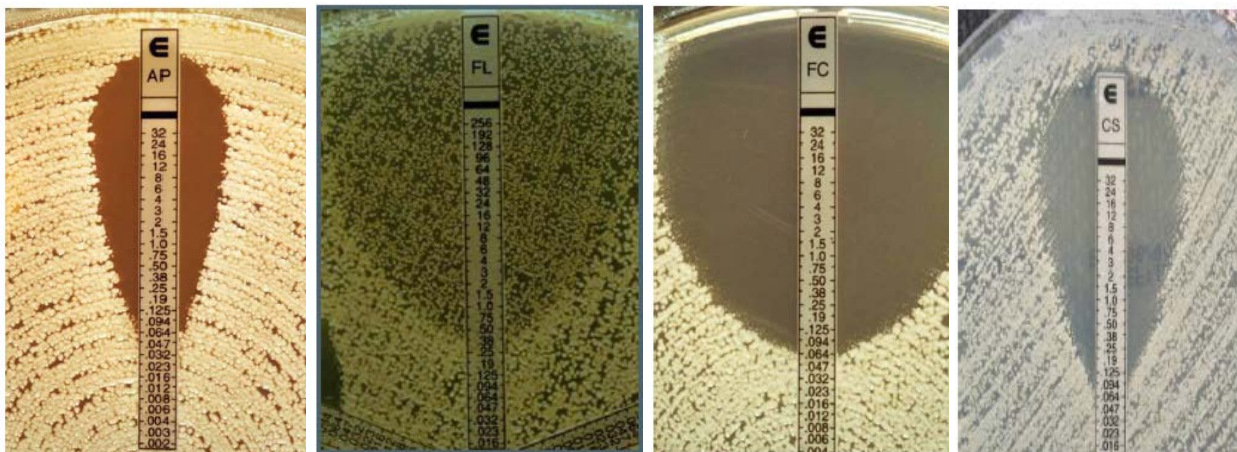
Le milieu de culture RPMI (milieu gélosé commercialisé et prêt à l'emploi) estensemencé de façon homogène à partir d'un écouvillon. Après séchage, la bandelette contenant le gradient exponentiel d'antifongique est déposée à la surface de la gélose, ce qui permet la diffusion de l'antifongique.

Après une incubation à 37°C pendant 48 heures, la CMI est déterminée au niveau de l'intersection de l'ellipse d'inhibition avec la bandelette graduée<sup>3</sup> (Cf. figures 2 et 3).



**Figure 2 : Schéma pour déterminer la CMI**

Pour les levures, les principaux antifongiques utilisés sont l'amphotéricine B (AP), le voriconazole (VO), le fluorocytosine (5FC), la caspofungine (CS) et le fluconazole.



**amphotéricineB**

**Azolés**

**5-fluorocytosine**

**Echinocandine**

**Figure 3 : exemples de lecture de CMI**

- **Amphotéricine B** : la lecture de la CMI est à **100% d'inhibition**

L'ellipse doit être claire (généralement mince) et tenir compte de toutes les colonies.

- **Azolés (fluconazole, voriconazole)** : Lire à **80% d'inhibition**

- Observer le premier changement de croissance
- Possible tapis de microcolonie (à ne pas prendre en compte)
- Prendre en compte les macrocolonies.

- **5-Fluorocytosine** : Lire à 90-95% d'inhibition et l'ellipse est généralement large  
Ignorer les petites colonies (mais attention aux sous populations éventuelles = macrocolonies)
- **Echinocandines (caspofungine)** : Lire à inhibition partielle (80%)

L'interprétation de l'antifongigramme permet de repérer les mécanismes de résistances aux antifongiques et de traduire l'estimation d'une activité *in vitro* en une catégorisation clinique S (Sensible), I (Intermédiaire) et R (Résistant).

En ce qui concerne les seuils cliniques ou breakpoint (CBP), le laboratoire suit les recommandations du comité EUCAST (cf. annexe III). Cependant les limites permettant de définir les seuils de sensibilité et de résistance n'ont été définis que pour certains antifongiques pour cette technique. Par conséquent, les seuils retenus par le service sont ceux émis par le rapport annuel CNR de Pasteur<sup>4</sup>. En effet, les résultats de CMI obtenus proviennent d'un très grand échantillonnage d'isolats d'espèces dont les concentrations correspondent aux concentrations minimales de l'antifongique inhibant 50% (CMI50) et 90% (CMI90) des isolats de l'espèce concernée (cf. annexe IV).

## **3. Etat des lieux, problématique et limite**

### **3.1 Etat des Lieux**

Aucune disposition n'a été formellement définie quant à la mise en place d'un contrôle de qualité interne pour la méthode des antifongigrammes. Or le laboratoire doit s'assurer de la maîtrise des processus analytiques et de la fiabilité des résultats d'examens selon le chapitre 5.6 de la norme. La méthode étant manuelle, il est donc intéressant dans ce travail de vérifier la qualité des performances analytiques obtenues et de surveiller des erreurs éventuelles (techniques, réactifs).

### **3.2 Problématique**

L'objectif de ce travail est de mettre en place un système de contrôle interne de qualité pour l'étude de sensibilité des antifongiques afin de respecter les exigences normatives et présenter cet examen à l'accréditation par le COFRAC :

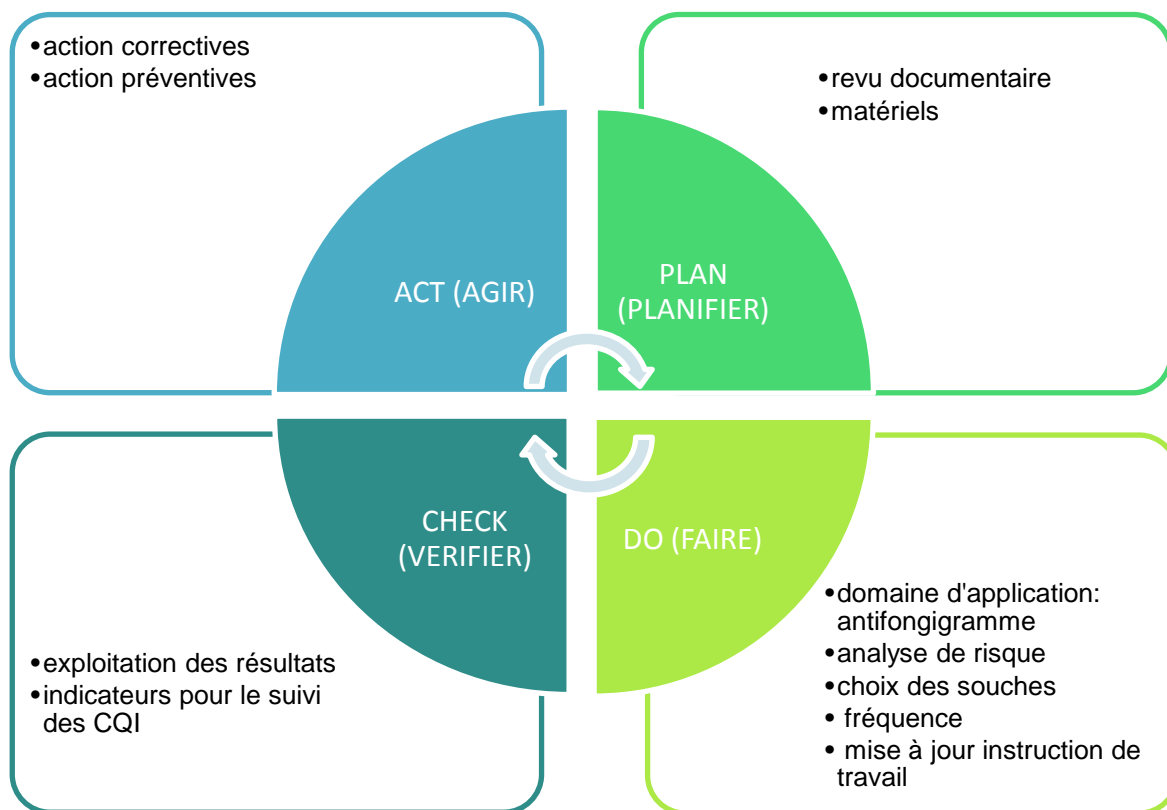
- choix des souches ATTC
- fréquence des passages
- interprétation des résultats

### **3.3 Limite**

Dans le cadre du mémoire, la limite de l'étude est restreinte aux genres levures. Par faute de moyens matériels (marchés hors AP-HP), je n'ai pas pu aborder les champignons filamenteux. Pour améliorer le dispositif mis en place, il faudra réaliser un suivi dans le temps afin de modifier les éléments inappropriés et réajuster le système. Dans le temps imparti de ce mémoire, la mise en place du CIQ se limitera par son efficacité et son application.

## 4. METHODE

Afin de mener à bien le projet, je me suis servie des étapes de la méthode PDCA (PLAN, DO, ACT, CHECK) de Deming suivant le plan ci-dessous :



*Figure 4 : Roue de DEMING*

### 4.1 Planifier (PLAN)

#### 4.1.1 Revu documentaire

Les exigences normatives mettent l'accent sur la nécessité de mettre en place un CIQ pour l'antifongigramme, ce processus analytique est un point critique en Mycologie car soumis à de nombreuses variations (techniques et biologiques) pouvant influencer significativement le résultat.

#### « 5.6.2 Contrôle qualité

Le laboratoire doit concevoir des procédures de contrôle de qualité permettant de vérifier que la qualité prévue des résultats est bien obtenue. » Norme NF EN ISO 15189 2012

#### « 5.6.2.1 Généralités

Le laboratoire peut se référer au guide technique d'accréditation du COFRAC, "Les contrôles de qualité en Biologie Médicale", SH GTA 06<sup>5</sup>.

La mise en place du contrôle de qualité en biologie médicale s'inscrit dans le cadre de la vérification continue des performances lors de l'utilisation (routine) dans le laboratoire du couple équipements-réactifs, afin d'apporter une confirmation et une preuve permanente de la validité des résultats rendus, en rapport avec les besoins définis de ses clients. Le contrôle de qualité constitue un moyen de vérification de la maîtrise en continu du processus analytique.

La détermination de la fréquence des contrôles relève d'une analyse de risques, chaque laboratoire définit pour chaque type d'examen la fréquence optimale (cf. 5.6.2 SH REF 02). » SH GTA 01<sup>6</sup>

En termes de recommandations relatives aux CIQ, les sociétés savantes (EUCAST, QUAMIC<sup>7</sup>) préconisent l'utilisation de souches ATCC (American Type Culture Collection) dans l'étude de la sensibilité aux antifongiques. Elles proviennent de collections internationales de référence sous forme lyophilisées.

#### 4.1.2 Matériels

Les CIQ utilisés en mycologie sont transportées généralement à température ambiante, elles se conservent au réfrigérateur et leur stabilité est de plusieurs années. On utilise actuellement les souches ATCC Kwik-Stik® de *Candida glabrata* ATCC®MYA-2905 et *Candida tropicalis* ATCC 750 en tant que CIQ pour l'identification des levures par spectrométrie de masse Vitek MS.

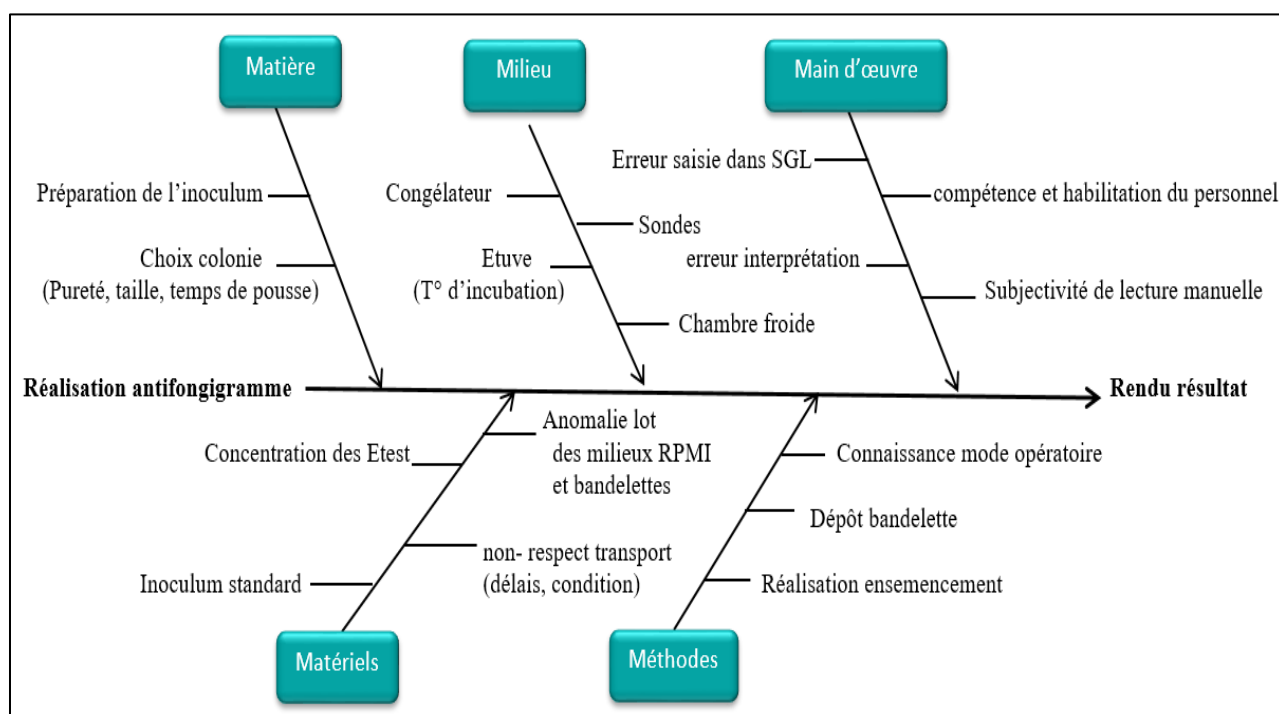
Ces échantillons se présentent sous forme d'écouvillons lyophilisés prêt à l'emploi. Leur reconstitution ainsi que leur isolement constituent un facteur de variabilité. Une souche ATCC Kwik-Stik est constitué de 2 blisters contenant chacun un écouvillon. Cependant, le repiquage successif d'une souche est de 5 fois maximum. Ce qui nécessite de réaliser des commandes très fréquemment. Mais l'utilisation de ces souches ATCC au quotidien constitue un coût non négligeable. C'est pourquoi, elles sont congelées après réisolement. Chaque souche a été ensemencée selon le mode opératoire du fournisseur sur des géloses Sabouraud chloramphénicol à 37°C. Après 48h de pousse, elles sont ensuite congelées à -20°C dans des cryobilles. Cela permet de congeler plusieurs répliquats. J'ai réalisé une étude sur la stabilité après chaque utilisation des perles poreuses d'un cryobille.

Pour la mise en œuvre d'un CIQ, il est donc essentiel d'identifier les risques susceptibles d'influencer la phase analytique. La gestion des risques consiste à maîtriser les risques avérés et prévenir les risques potentiels.

## 4.2 Faire (DO)

### 4.2.1 Analyse de risque

Il est donc nécessaire d'établir une analyse de risque des 5M permettant ainsi d'identifier les erreurs pouvant influencer la qualité analytique. En effet, les risques potentiels seront identifiés à partir de l'étude minutieuse du processus en mettant en évidence les étapes sensibles lors de la réalisation de l'antifongogramme. Les risques sont répartis en 5 catégories constituant les 5M : Matière, Matériel, Méthode, Main d'œuvre et Milieu.



**Figure 5 : Diagramme d'Ishikawa : réalisation de l'antifongogramme**

Après identification des risques il est possible de les évaluer à l'aide d'une échelle de criticité selon la procédure générale SLL-B2P-QUAL-PG-005 « Identifier et maîtriser les risques du laboratoire B2P » (cf. annexe V) :

L'indice de Criticité d'un risque (C) est le produit de sa Fréquence (F) et de sa Gravité (G) :

$$\mathbf{C = F \times G}$$

Cependant, l'analyse de risque étant réalisée « a priori », la fréquence F est remplacée par la probabilité d'occurrence (cf. annexe VI procédure générale § 7.2 pour la cotation de la fréquence et de la gravité).

Selon sa valeur, la criticité d'un risque peut être faible (1 à < 4 en vert), modérée (4 à < 10 en orange) ou élevée (e 10 en rouge).

Pour tous les risques mis en évidence, une action sera alors prévue pour chacun soit par la mise en place de moyens de maîtrise, soit par l'amélioration des moyens existants.

5M	Points critiques	F	G	C	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise Documents
Matière	Choix de la colonie (pureté, taille, âge)	2	1	2	-non contamination -réisolement	- vérification visuelle pureté - identification MALDI-TOF
	Préparation de l'inoculum	2	3	6	-Qualité de l'inoculum	-Utilisation d'une gamme Mc Farland -mesure densitométrique
Milieu	Condition de conservation des milieux de cultures pour ATF RPMI et Etest	1	3	3	-métrologie des enceintes froides	-maîtrise métrologie (cartographie et suivi métrologique Oceasoft) <i>SLL-B2P-METRO-PT-003</i> -respect instructions fournisseur
	Condition d'utilisation des milieux de culture et Etest	1	3	3	-métrologie des enceintes : étuve 37°C enceinte froide (-20°C et +4°C)	-maîtrise métrologie (cartographie et suivi métrologique Oceasoft) <i>SLL-B2P-METRO-PT-003</i> <i>SLL-B2P-METRO-PT-004</i>
Matériels (réactifs)	Etalon (McFarland)	2	1	2	-Acceptation des lots à la réception	-Fiche qualité fournisseur
	Concentration des bandelettes E-test (CMI)	2	3	6	-Gestion du stock	-Suivi de traçabilité réactif <b>-Présence d'un CIQ</b> pour vérifier défaillance
	Non-respect délais condition de transport réactifs	2	2	4		-Fiche de stress fournisseur
	Survenue d'une anomalie de lot milieu RPMI et bandelettes	1	3	3		-Suivi traçabilité réactif -test d'acceptation des lots -certificat de conformité réactif -Réactovigilance <i>SLL-B2P-QUAL-DE-107</i>
Méthodes	Connaissance modes opératoires	2	2	4	-Attestation de lecture des documents de travail	-Suivi attestation de lecture sur Kalilab

	Ensemencement manuelle ATF et dépôt bandelettes	2	2	4	-Qualité d'ensemencement	-formation et habilitation du personnel (initiale et maintien)
Main d'œuvre (personnel)	Lecture visuelle CMI	3	3	9	- Subjectivité des lectures visuelles - Variabilité inter-opérateur	-double lecture technicien/ biologiste  - <b>Test de lecture d'un CIQ</b> inter-opérateur et suivi périodique
	Erreur interprétation	2	3	6	Mise à jour seuil d'interprétation	- Développement professionnel Continu (DPC), congrès pour biologiste
	Erreur de saisie dans le SGL(GLIMS)	2	3	6	-Formation à l'utilisation SGL	-Contrôle de saisie : Vérification biologique

**Tableau 2 : Analyse des risques 5M (Ishikawa)**

➤ **Risques liés à la matière :**

Après un délai de 48h d'ensemencement, les souches sont identifiées grâce au MALDI-TOF. Le risque lié à une erreur d'identification de la souche est minime. De plus, il est possible visuellement de vérifier sa pureté par l'aspect macroscopique sur gélose CHROMagar.

La qualité de l'inoculum repose sur plusieurs facteurs :

- L'homogénéité : après avoir prélevé la ou les colonie(s), il est important de bien disperser la colonie dans l'inoculum et de vortexer le mélange.
- Sa richesse : La préparation de l'inoculum est standardisée à l'aide d'un étalon à 0,5 McFarland. Mais ce paramètre peut-être toutefois sensible dans la mesure où la suspension n'est pas mesurée correctement. Actuellement, l'inoculum préparé est comparé visuellement à l'étalon standard. Ceci peut engendrer une erreur d'appréciation de la turbidité de la suspension par chaque technicien. Ce point soulève la nécessité d'acquérir et d'utiliser un densitomètre.

➤ **Risques liés au milieu :**

En ce qui concerne la conservation des réactifs, les enceintes de stockage sont raccordées métrologiquement. Un suivi des températures sur Oceansoft nous alerte en cas de dysfonctionnement. (« Gérer la métrologie des enceintes thermostatiques critiques » Réf SLL-B2P-METRO-PT-004).

➤ **Risques liés aux matériels :**

Le CQI doit être réalisé à chaque changement de lot de réactifs (géluses RPMI et bandelettes). Le suivi sera effectué à partir du formulaire de traçabilité des lots de réactifs. (« *Formulaire de traçabilité des lots de réactifs* » réf. : SLL-SLPAR-PLUS-DE-066). Afin d'éviter d'avoir plusieurs lots différents, une demande de réservation de lot pour chaque E-test a été faite auprès du fournisseur mais celui-ci a répondu défavorablement. Selon la norme, § 5.3.2.3 à chaque nouvelle livraison, les réactifs doivent être vérifiés en termes de performance avant utilisation.

En ce qui concerne les géluses RPMI, le SH GTA 01 nous assure que le certificat de conformité du fournisseur est suffisant et prouve que le fabricant a respecté les normes de performances émises. Cet argument nous laisse la possibilité de ne pas réaliser de CQI à chaque changement de lot de géluse RPMI. De plus, la présence des fiches de stress de chaque réactif nous permet de vérifier la stabilité et les conditions maximales de conservations tolérées (attente d'une réponse du fournisseur pour les fiches de stress réactifs). Les certificats de conformités sont disponibles sur le site du fournisseur, elles sont enregistrées dans le « commons » du laboratoire sous le fichier qualité/ réactifs/ fiche réactif.

Cependant, le risque induit par la dégradation du gradient de concentrations des Etest n'est pas négligeable lors de manipulations successives tels que la congélation et la décongélation par les opérateurs. Un CQI sera nécessaire pour vérifier la stabilité de ces bandelettes.

Aussi, le risque lié à la survenue d'une anomalie de lot de RPMI et de bandelettes est d'une incidence faible du fait des alertes de la réactovigilance.

➤ **Risques liés à la méthode :**

La prise de connaissance du mode opératoire par l'ensemble des techniciens est indispensable dans la réalisation de l'antifongigramme. Il est donc nécessaire de mettre à jour le mode opératoire des antifongigrammes afin d'harmoniser les pratiques. (Cf. annexe VI « réalisation d'un antifongigramme et test de sensibilité aux antifongiques Etest Réf : SLL-SLPAR-MYCO-MT-003).

➤ **Risques liés à la main d'œuvre :**

Le risque recensé et qui apparaît comme le plus critique après calcul de la criticité est celui de la variabilité inter-opérateur. Du fait de la réalisation manuelle de l'examen, il est difficile d'apprécier la qualité de réalisation de l'antifongigramme par chaque opérateur. En effet, en

dehors de la préparation de l'inoculum (abordé dans les risques liés à la matière), la qualité de l'ensemencement (ensemencement non régulier, gélose peu ou trop chargée) ainsi que le dépôt des bandelettes (bandelettes repositionnées ou mauvaise adhérence à la gélose) peuvent influencer la lecture du résultat. Un CQI permet de déceler la variabilité des résultats et les dérives liées à une mauvaise pratique.

Cependant, la lecture des CMI étant visuelle, elle reste néanmoins subjective à chaque technicien. Cette variabilité induite par la technique manuelle de l'antifongigramme est un point critique du processus. C'est pourquoi une seconde lecture sera réalisée par le biologiste. De plus, un test de lecture inter-opérateur pourrait permettre de signifier le degré de dérive existant. La maîtrise de ce risque sera assurée par la mise en œuvre de test de lecture à intervalle régulier.

Suite aux résultats de l'analyse de risques, les causes identifiées ci-dessous révèlent que deux points sensibles semblent avoir un impact important sur le résultat, à savoir la concentration des Etest et la lecture subjective. Il convient donc de maîtriser ces risques par la mise en place de CIQ.

#### **4.2.2 Mise en place des CIQ**

Selon les sociétés savantes, il n'y'a pas de spécificité quant au choix des CIQ. Les souches ATCC commercialisées sont *C. albicans*, ATCC® 14053, *C. tropicalis*, ATCC® 750, *C. glabrata*, ATCC®MYA-2905, *C. krusei*, ATCC® 6258, *C. parapsilosis* ATCC® 22019. Afin de vérifier la stabilité du gradient de concentration il est judicieux d'utiliser une souche sensible aux Etest utilisés et selon l'intérêt clinique pour le service.

Cependant le profil de sensibilité des souches ATCC n'est pas communiqué par le fournisseur, il était utile dans cette démarche de réaliser des tests de reproductibilité aux antifongiques.

J'ai mené cette étude en demandant à tous les techniciens au poste de travail (mycologie) de réaliser des ensemencements des souches en question à partir des cryobilles. Il était important d'isoler la souche à partir du même cryobille sur CHROMagar et de vérifier la pureté de l'isolat. Ensuite, une identification des souches ATCC est effectuée au MALDI-TOF puis un antifongigramme est réalisé pour chacune d'entre elles pendant 3 mois.

La CMI de chaque antifongique reste relativement stable en fonction de la souche ATCC. La concordance de catégorie sensible, intermédiaire ou résistant est reproductible. Ce test a

permis de vérifier que pour une préparation de souche ATCC, la congélation n'a pas d'impact sur les caractères cultureux de la souche, sur l'identification fongique au MALDI-TOF ainsi que sur la sensibilité aux antifongiques et quel que soit l'opérateur (Cf. annexe VII).

	<i>C. albicans</i> ATCC® 14053	<i>C.glabrata</i> ATCC ® MYA-2905	<i>C.tropicalis</i> ATCC® 750	<i>C.parapsilosis</i> ATCC® 22019	<i>C.krusei</i> ATCC® 6258
Amphotéricine B	S	S	S	S	S
Caspofongine	R	R	R	R	R
Fluorcytosine 5FC	S	S	R	S	R
Voriconazole	S	S	S	S	S
Fluconazole	S	I	S	S	R

**Tableau 3 : Profil de sensibilité des souches ATCC aux antifongiques**

**R** : Résistant

**S** : Sensible

**I** : Intermédiaire

Ayant des profils variables, il est peut-être intéressant de varier les souches de passages de CIQ et de réaliser un tableau prévisionnel de passage des souches ATCC à réaliser. Ainsi, les souches retenues sont *C. glabrata* ATCC®MYA-2905 et *C.tropicalis* ATCC® 750. Elles sont actuellement utilisées en CIQ pour l'identification au MALDI-TOF.

#### 4.2.3 Périodicité des CIQ

Hormis le passage systématique d'un CIQ lors du changement de lot ou lors d'une nouvelle livraison, il revient aux biologistes de fixer la fréquence de passage en fonction de l'activité de l'examen réalisé et de sa criticité. Le nombre de demande étant très limité pour cet examen à raison de 13 antifongigrammes par mois, il paraît raisonnable de réaliser un CIQ mensuel. Cette périodicité sera réajustée selon la roue de Deming (ACT) et à compléter par une analyse de risque § 5.6.2.1 afin de déterminer la fréquence optimale.

La mise en place d'un CIQ mensuel semble être une fréquence correcte pour assurer la qualité de l'analyse nécessitant plusieurs réactifs de nature différente (gélouse, bandelette).

#### 4.2.4 Revue documentaire

Grâce au diagramme d'Ishikawa, le mode opératoire des antifongogrammes a été revu et modifié en insistant sur les points critiques de sa réalisation. (Cf. annexe IV « Réalisation d'un antifongogramme et test de sensibilité aux antifongiques Etest Réf : SLL-SLPAR-MYCO-MT-003).

### 4.3 Vérifier (CHECK)

#### 4.3.1 Répétabilité de l'antifongogramme

Afin de vérifier la répétabilité de cette méthode, une même souche a été réisolée avec la même méthode, au même instant et par le même opérateur.

L'estimation de la répétabilité est effectuée à partir du CV (en %)  $= (s/m) \times 100$  comparé à un CVa limite admissible (correspondant à un biologiste référent)

CVd CVa méthode répétable

CV > CVa méthode non répétable

Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
Amphotéricine B	10	0.51	0.14	29.07	30.5	satisfaisant
Caspofongine	10	0.08	0.02	25.8	27.7	satisfaisant
Voriconazole	10	0.016	0.003	18.85	8.11	Non satisfaisant
Fluconazole	10	0.26	0.04	15.63	20.61	satisfaisant

Remarque : fluorocytosine non applicable souche résistante

**Tableau 4 : répétabilité souche C.tropicalis**

Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
Amphotéricine B	10	0.3	0.04	11.2	11.2	satisfaisant
Caspofongine	10	0.12	0.009	8.04	11.00	satisfaisant
Fluorocytosine	10	0.01	0.002	15.2	8.11	Non satisfaisant
Voriconazole	10	0.06	0.03	53.6	53.6	satisfaisant
Fluconazole	10	5.2	1.03	19.8	15.05	Non satisfaisant

**Tableau 5 : répétabilité souche *C.glabrata***

D'après les tableaux 4 et 5, les résultats de CV obtenus des souches étudiées sont acceptables. Malgré un CV supérieur au CVa pour les deux souches (en rouge), la variabilité des CV n'interfèrent pas dans le seuil d'interprétation du résultat.

#### 4.3.2 Focus sur la variabilité inter-opérateur

La variabilité inter-opérateur a été évalué par la lecture du même antifongigramme par 5 opérateurs différents pour les souches ATCC *C.glabrata* et *C.tropicalis*.

	AP B	CS	5 FC	VO	FL
Opérateur 1	0.38 (S)	0.125 (R)	0.016 (S)	0.094 (R)	4 (I)
Opérateur 2	0.38 (S)	0.125 (R)	0.012 (S)	0.094 (R)	4 (I)
Opérateur 3	0.38 (S)	0.094 (R)	0.012 (S)	0.032 (R)	4 (I)
Opérateur 4	0.38 (S)	0.125 (R)	0.016 (S)	0.094 (R)	6 (I)
Opérateur 5	0.38 (S)	0.125 (R)	0.012 (S)	0.032 (R)	4 (I)
% écart lecture	0	20	40	40	20
% concordance seuil interprétation	100	100	100	100	100

**Tableau 6 : variabilité inter-opérateur pour la souche ATCC *C.glabrata***

	AP B	CS	5 FC	VO	FL
Opérateur 1	0.75 (S)	0.125 (R)	> 32 (R)	0.016 (S)	0.25 (S)
Opérateur 2	0.38 (S)	0.125 (R)	> 32 (R)	0.023 (S)	0.25 (S)
Opérateur 3	0.50 (S)	0.094 (R)	> 32 (R)	0.023 (S)	0.25 (S)
Opérateur 4	0.50 (S)	0.125 (R)	> 32 (R)	0.016 (S)	0.25 (S)
Opérateur 5	0.50 (S)	0.125 (R)	> 32 (R)	0.023 (S)	0.25 (S)
% écart lecture	40	20	0	40	0
% concordance seuil interprétation	100	100	100	100	100

**Tableau 7 : variabilité inter-opérateur pour la souche ATCC C.glabrata**

Les résultats indiquent que l'écart de lecture par chaque opérateur est significatif pour certains Etest. Cependant, le pourcentage consécutif à la lecture correspondant au seuil d'interprétation est concordant. Le résultat de lecture des CMI est compris dans les zones de catégorisation (S, I ou R), il reste inchangé. Les variations de lectures inter-opérateur n'ont pas d'influence sur le résultat de l'interprétation de l'antifongogramme et sur la prise en charge thérapeutique du patient.

#### **4.4 Agir (ACT)**

Les résultats de cette étude qui porte sur la mise en place d'un CIQ pour les antifongogrammes mettent l'accent sur la nécessité d'une formation adéquate et continue du personnel de laboratoire notamment sur les règles de lecture des CMI. De plus, une participation régulière aux contrôles de qualité internes permettrait de minimiser les discordances et d'améliorer la fiabilité des résultats. Pour cela, il est important de mettre en place un indicateur qualité dont je serai le pilote. Cet indicateur sera la lecture d'un test de lecture de CIQ pour chaque technicien au poste de travail à intervalle régulier (non défini pour l'instant) selon les mêmes modalités du §4.3.2. Ainsi les résultats obtenus pourront être comparés aux résultats du test de lecture initial. Cela permettra de vérifier la présence ou non d'une dérive de lecture et de suivre également l'amélioration de notre pratique.

Il sera également possible d'envisager ce test de lecture comme un critère de maintien d'habilitation pour chaque technicien.

## CONCLUSION

L'objectif de ce travail était de mettre en place un système de CIQ dans le cadre d'une analyse qualitative importante en routine mais peu demandée (13 demandes par mois en moyenne). La demande d'antifongigramme est en effet rajoutée la plupart du temps par le biologiste en fonction du contexte clinico-biologique du patient.

La difficulté principale de la mise en place de CIQ sur une méthode qualitative consiste à bien adapter le choix et la fréquence de ces CIQ en fonction de l'analyse de risques 5M, surtout ceux liés à la main d'œuvre. En effet, la fiabilité des résultats rendus repose essentiellement sur le résultat de la lecture des CMI de chaque personnel. Aussi, le maintien des compétences du personnel habilité sera un point sensible pour cette méthode des antifongigrammes.

Afin de garantir de façon pérenne la fiabilité des résultats, il est important de réaliser des tests de lectures à fréquences régulières.

Dans la logique des exigences normatives et d'amélioration continue, l'inscription à un organisme d'EEQ (Evaluation externe de la Qualité) a été envisagée de manière à confronter nos résultats à d'autres laboratoires.

Ce mémoire m'a permis de mettre en place un projet au sein de ma structure en utilisant divers outils qui m'ont été enseignés durant cette année (diagramme d'Ishikawa, roue de Deming...). De plus, l'élaboration de ce mémoire a été très enrichissante sur le plan personnel.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Norme NF EN ISO 15189 : 2012 - Laboratoires d'analyses de biologie médicale – Exigences particulières concernant la qualité et la compétence, AFNOR– Décembre 2012.
  2. Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale. Ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010, NOR: SASX0927179R – Journal Officiel de la République Française, 15/01/2010.
  3. Cours « Méthodes d'étude in vitro de la sensibilité aux antifongiques » E. Dannaoui
  4. Rapport annuel d'activité 2018, « centre de national de référence Mycoses Invasives et Antifongiques, année d'exercice 2017 » F. Dromer, S. Bretagne, O. Lortholary.
  5. SH GTA 06 Révision 00, Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale
  6. SH GTA 01 Révision 01, Guide technique d'accréditation en biologie médicale ; section humaine
  7. Société Française de Microbiologie « contrôle de la qualité interne en mycologie » QUAMIC de la SFM recommandation 2016 version1
- Cours DU de qualité « Vérification/ Validation des méthodes qualitatives » C. Kauffmann-Lacroix

## TABLES DES ANNEXES

ANNEXE I : Organigramme du laboratoire B2P.....	p31
ANNEXE II : Organigramme du service de Mycologie/ parasitologie.....	p32
ANNEXE III : Seuil clinique de l'EUCAST pour les levures <i>Candida spp</i> .....	p33
ANNEXE IV : Profil de sensibilité des levures aux antifongiques PASTEUR.....	p34
ANNEXE V : « Identifier et maîtriser les risques du laboratoire B2P» .....	p35
ANNEXE VI : «Réalisation d'un antifongigramme et test de sensibilité aux antifongiques Etest».....	p45
ANNEXE VII : Profils de sensibilité des souches ATCC – test de reproductibilité.....	p50
ANNEXE VIII : Test de répétabilité.....	p.55

## Résumé


Les CIQ s'inscrivent dans une démarche de vérification et d'amélioration continue des performances des processus analytiques. En d'autres termes, ils englobent l'ensemble des procédures permettant de surveiller en permanence et de manière indépendante la reproductibilité des méthodes de réalisation des examens de biologie et la fiabilité des résultats obtenus, mais aussi de déceler les erreurs du processus analytique, de les corriger et de les prévenir (selon le chapitre 5.6 de la norme NF EN ISO 15189).

La méthode des antifongigrammes a pour but de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'une souche fongique vis-à-vis de divers antifongiques. La fiabilité d'un antifongigramme est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés. Ce mémoire a pour objectif la mise en place d'un CIQ pour la méthode des antifongigrammes.

Pour chaque étape de la méthode des antifongigrammes, il a donc été réalisé une analyse de risques par la méthode des 5M et une cotation afin d'identifier et de hiérarchiser les points critiques de chaque étape. Sur la base de ces données, il a été défini des moyens de maîtrise à mettre en place. Cette mise en place a été planifiée et l'efficacité des actions a été évaluée a priori.

L'analyse de ces résultats nous a démontré que l'habilitation du personnel est un point clef dans la maîtrise du processus.

ANNEXE I :

	<p><b>Organigramme du laboratoire de biologie médicale et d'anatomie et cytologie pathologiques B2P</b></p> <p><i>Version du 26/04/2018</i></p>
---	---

**EXECUTIF DE PÔLE** François SIMON, Chef de Pôle Elisabeth FAURE, Cadre Paramédical de Pôle Emmanuel WAÏSS, Cadre Administratif de Pôle

**Cellule Qualité Métrologie** Responsable : Nathalie SCHNEPF

Site Saint-Louis (076)

Site Lariboisière (047)

<b>ANATOMIE PATHOLOGIQUE SLS</b> Responsable : Philippe BERTHEAU	<b>DEPARTEMENT D'ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES</b> Responsable : Philippe BERTHEAU	<b>ANATOMIE PATHOLOGIQUE LRB</b> Responsable : Homa ADLE-BIASSETTE
---	---	---

<b>BIOCHIMIE GENERALE ET HORMONALE</b> Responsable : Philippe BOUDOU	<b>DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE</b> Responsable : Jean-Louis LAPLANCHE	<b>BIOCHIMIE GENERALE ET DE L'URGENCE</b> Responsable : Elisabeth MASSON  <b>BIOCHIMIE SPECIALISEE ET GENETIQUE MOLECULAIRE</b> Responsable : Corinne COLLET
---	---	--

<b>HÉMATOLOGIE BIOLOGIQUE SLS</b> Responsable : Jean SOULIER  <b>BIOLOGIE CELLULAIRE</b> Responsable : Christine CHOMIENNE	<b>DEPARTEMENT D'HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE</b> Responsable : François SIGAUX	<b>HÉMATOLOGIE BIOLOGIQUE LRB</b> Responsable : Agnès VEYRADIER
--	--	--

<b>PHARMACOCINETIQUE ET SUIVI THERAPEUTIQUE</b> Responsable : Samia MOURAH	<b>DEPARTEMENT DE PHARMACOLOGIE-TOXICOLOGIE</b> Responsable : Laurence LABAT	<b>TOXICOLOGIE BIOLOGIQUE</b> Responsable : Laurence LABAT
---	---	---

<b>BACTERIOLOGIE MOLECULAIRE ET AUTOMATISEE</b> Responsable : Béatrice BERCOT  <b>VIROLOGIE VIH - HEPATITES SEROLOGIQUES</b> Responsable : Constance DELAUGERRE  <b>VIROLOGIE ET GREFFES</b> Responsable : Jérôme LE GÖFF  <b>MYCOLOGIE - PARASITOLOGIE</b> Responsable : Alexandre ALANIO	<b>DEPARTEMENT DES AGENTS INFECTIEUX</b> Responsable : Stéphane BRETAGNE	<b>URGENCES MICROBIOLOGIQUES ET MYCOBACTERIOLOGIE</b> Responsable : Emmanuelle CAMBAU
--	---	--

<b>PHARMACOCINETIQUE ET SUIVI THERAPEUTIQUE</b> Responsable : Samia MOURAH	<b>DEPARTEMENT DE PHARMACOLOGIE-TOXICOLOGIE</b> Responsable : Laurence LABAT	<b>TOXICOLOGIE BIOLOGIQUE</b> Responsable : Laurence LABAT
---	---	---

<b>BACTERIOLOGIE MOLECULAIRE ET AUTOMATISEE</b> Responsable : Béatrice BERCOT  <b>VIROLOGIE VIH - HEPATITES SEROLOGIQUES</b> Responsable : Constance DELAUGERRE  <b>VIROLOGIE ET GREFFES</b> Responsable : Jérôme LE GÖFF  <b>MYCOLOGIE - PARASITOLOGIE</b> Responsable : Alexandre ALANIO	<b>DEPARTEMENT DES AGENTS INFECTIEUX</b> Responsable : Stéphane BRETAGNE	<b>URGENCES MICROBIOLOGIQUES ET MYCOBACTERIOLOGIE</b> Responsable : Emmanuelle CAMBAU
--	---	--

<b>DEPARTEMENT GENOMIQUE DES TUMEURS SOLIDES</b> Responsable : Samia MOURAH	
<b>PHARMACOGENOMIQUE</b> Responsable : Samia MOURAH	<b>ONCOLOGIE MOLECULAIRE</b> Responsable : Jacqueline LEHMANN-CHE
<b>GENOMIQUE DES TUMEURS SOLIDES</b>	

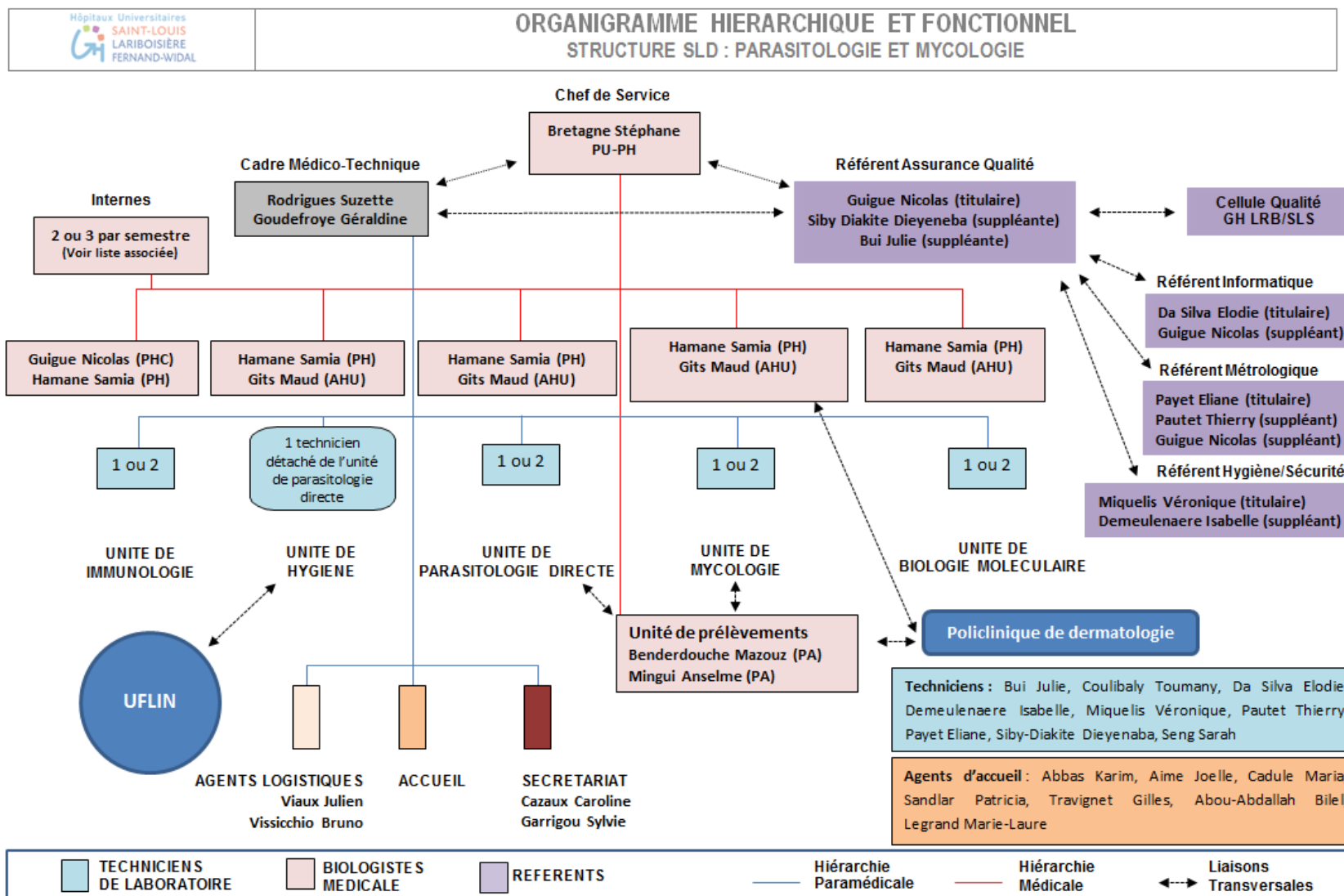
<b>ACCUEIL CENTRALISE DE BIOLOGIE ET DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE AUTOMATISE (DBA)</b> Responsable : Marc CHEVRIER
--

<b>RECEPTION CENTRALISEE DE BIOLOGIE (RCB)</b> Responsable : Julien FONSAERT
---

<b>IMMUNOLOGIE-HISTOCOMPATIBILITE</b> Responsable : Sophie CAILLAT-ZUCMAN
--

<b>GENETIQUE NEUROVASCULAIRE</b> Responsable : Elisabeth TOURNIER-LASSERVE
---

ANNEXE II :



## ANNEXE III :

**Candida spp.** **EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint Table v. 9.0 valid from 2018-02-12****MIC method (EUCAST standardised broth microdilution method)****Medium:** RPM1640-2% glucose, MOPS buffer**Inoculum:** Final  $0.5 \times 10^5$  -  $2.5 \times 10^5$  cfu/mL**Incubation:** 18-24h**Reading:** Spectrophotometric, complete (> 90%) inhibition for amphotericin B but 50% growth inhibition for other compounds

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)															
	<i>C. albicans</i>		<i>C. dubliniensis</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. guilliermondii</i>		Non-species related breakpoints <sup>1</sup>	
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >
Amphotericin B	1	1	IE	IE	1	1	1	1	1	1	1	1	IE	IE	IE	IE
Anidulafungin	0.032	0.032	IE	IE	0.064	0.064	0.064	0.064	0.002	4	0.064	0.064	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE
Caspofungin	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	IE	IE	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE
Fluconazole	2	4	IE	IE	0.002	32	-	-	2	4	2	4	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	2	4
Isavuconazole	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE
Itraconazole	0.064	0.064	0.064	0.064	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	0.125	0.125	0.125	0.125	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE
Micafungin	0.016	0.016	IE	IE	0.032	0.032	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	0.002	2	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	IE	IE
Posaconazole	0.064	0.064	0.064	0.064	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	0.064	0.064	0.064	0.064	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE
Voriconazole <sup>6</sup>	0.064 <sup>5</sup>	0.25 <sup>5</sup>	0.064	0.25	IE	IE	IE	IE	0.125 <sup>5</sup>	0.25 <sup>5</sup>	0.125 <sup>5</sup>	0.25 <sup>5</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE

**Notes**

1. Non-species related breakpoints have been determined mainly on the basis of PK/PD data and are independent of MIC distributions of specific species. They are for use only for organisms that do not have specific breakpoints.

2. The ECOFFs for these species are in general higher than for *C. albicans*.

3. Isolates that are susceptible to anidulafungin as well as micafungin should be considered susceptible to caspofungin, until caspofungin breakpoints have been established. Similarly, *C. parapsilosis* isolates intermediate to anidulafungin and micafungin can be regarded intermediate to caspofungin. EUCAST breakpoints have not yet been established for caspofungin, due to significant inter-laboratory variation in MIC ranges for caspofungin.

4. MICs for *C. tropicalis* are 1-2 two-fold dilution steps higher than for *C. albicans* and *C. glabrata*. In the clinical study successful outcome was numerically slightly lower for *C. tropicalis* than for *C. albicans* at both dosages (100 and 150 mg daily). However, the difference was not significant and whether it translates into a relevant clinical difference is unknown. MICs for *C. krusei* are approximately three two-fold dilution steps higher than those for *C. albicans* and, similarly, those for *C. guilliermondii* are approximately eight two-fold dilutions higher. In addition, only a small number of cases involved these species in the clinical trials. This means there is insufficient evidence to indicate whether the wild-type population of these pathogens can be considered susceptible to micafungin.

5. Strains with MIC values above the S/I breakpoint are rare or not yet reported. The identification and antifungal susceptibility tests on any such isolate must be repeated and if the result is confirmed the isolate sent to a reference laboratory. Until there is evidence regarding clinical response for confirmed isolates with MIC above the current resistant breakpoint they should be reported resistant. A clinical response of 76% was achieved in infections caused by the species listed below when MICs were lower than or equal to the epidemiological cut-offs. Therefore, wild type populations of *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* are considered susceptible.

6. For *Candida* the intermediate category is introduced to acknowledge that the increased exposure obtained by iv dosing is sufficient (potentially confirmed by TDM). There is not enough information available for the response to voriconazole of infections caused by *Candida* isolates with higher MICs.

ANNEXE IV :

**Tableau 11 : Profil de sensibilité des levures aux antifongiques**  
(mise à jour 09/03/2018)

Espèces étudiées		Valeurs des CMI50 / CMI90 mg/L pour les antifongiques*						
Nom d'usage en clinique (nombre d'isolats testés)	Nom actuel	AMB	5-FC	Fluco	Vori	Posa	Caspo**	Mica**
<i>C. albicans</i> (n=3007)		0.06/0.12	≤0.12/0.5	0.25/0.5	≤0.01/≤0.01	0.03/0.06	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>C. dubliniensis</i> (n=120)		≤0.014/0.06	≤0.12/≤0.12	≤0.12/0.25	≤0.01/≤0.01	0.03/0.06	0.03/0.03	0.015/0.03
<i>C. glabrata</i> (n=1173)		0.12/0.25	≤0.12/≤0.12	16/64	0.25/1	0.5/2	0.06/0.12	0.03/0.03
<i>C. nivariensis</i> (n=10)		0.12/0.12	1/1	4/4	0.06/0.12	0.25/0.25	0.06/0.12	0.015/-
<i>C. parapsilosis</i> (n=733)		0.06/0.12	≤0.12/0.25	0.5/2	≤0.01/0.06	0.06/0.12	0.25/1	0.25/0.5
<i>C. orthopsilosis</i> (n=39)		0.03/0.06	≤0.12/≤0.12	0.5/16	0.03/1	0.06/0.12	0.12/0.25	0.12/0.25
<i>C. metapsilosis</i> (n=35)		0.06/0.12	≤0.12/≤0.12	1/2	0.03/0.06	0.03/0.12	0.06/0.25	0.12/0.25
<i>C. tropicalis</i> (n=592)		0.06/0.12	≤0.12/32	0.5/4	0.03/0.25	0.06/0.25	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>C. krusei</i> (n=312)	<i>Pichia kudryavzevii</i>	0.12/0.25	2/4	32/64	0.25/0.5	0.12/0.25	0.12/0.25	0.06/0.12
<i>C. inconspicua</i> (n=35)		0.12/0.25	2/4	16/32	0.12/0.5	0.12/0.25	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>C. kefyr</i> (n=159)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0.06/0.25	0.5/8	0.25/1	≤0.01/≤0.01	0.06/0.12	0.015/0.03	0.03/0.06
<i>C. guilliermondii</i> (n=102)	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0.03/0.06	≤0.12/≤0.12	8/64	0.06/0.5	0.25/0.5	0.06/0.25	0.12/0.25
<i>C. fermentati</i> (n=32)	<i>Meyerozyma caribbica</i>	0.12/0.25	≤0.12/≤0.12	8/64	0.12/2	0.25/0.5	0.12/0.5	0.25/2
<i>C. lusitanae</i> (n=180)	<i>Clavospora lusitanae</i>	0.06/0.25	≤0.12/1	0.25/0.5	≤0.01/0.03	0.03/0.06	0.03/0.06	0.03/0.06
<i>C. haemulonii</i> (n=39)		<b>0.5/2</b>	≤0.12/0.25	32/64	≥8/≥8	2/≥8	0.03/0.06	0.06/0.12
<i>C. haemulonii</i> type II (n=38)	<i>Candida duboisii</i>	2/8	≤0.12/≥64	32/≥64	≥8/≥8	4/≥8	0.03/0.03	0.03/0.06
<i>C. palmivora</i> (n=20)		0.12/0.5	≤0.12/0.5	8/32	0.12/0.25	0.12/0.25	0.06/0.25	0.03/0.25
<i>Pichia jadinii</i> (n=23)	<i>Cyberlindnera jadinii</i>	0.06/0.12	≤0.12/1	1/4	0.06/0.12	0.12/0.25	0.015/1	0.015/2
<i>C. pelliculosa</i> (n=32)	<i>Plicostictia monstrei</i>	0.06/0.12	≤0.12/16	2/4	0.12/0.25	0.25/0.5	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>Pichia ohaveri</i> (n=29)	<i>Kodanota ohaveri</i>	0.06/0.06	≤0.12/1	4/16	0.03/0.12	0.06/0.12	0.06/≥8	0.06/0.12
<i>Pichia norvegensis</i> (n=15)		0.06/0.12	4/8	32/64	0.25/0.5	0.12/0.25	0.06/0.06	0.03/0.06
<i>S. cerevisiae</i> (n=56)		0.06/0.12	≤0.12/≤0.12	8/16	0.12/0.25	0.5/1	0.12/0.25	0.12/0.25
<i>C. lipolytica</i> (n=23)	<i>Yarrowia lipolytica</i>	0.5/2	16/≥64	4/8	0.06/0.12	0.25/1	0.12/0.5	0.25/0.25
<i>Geotrichum candidum</i> (n=34)	<i>Galactomyces candidus</i>	0.25/0.5	0.25/1	16/64	0.25/1	0.25/1	1/≥8	0.5/≥8
<i>G. capitatum</i> (n=54)	<i>Magnusiomyces capitatus</i>	0.25/0.5	≤0.12/0.25	8/16	0.06/0.5	0.12/1	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>G. clavatum</i> (n=158)	<i>Saprochaete clavata</i>	0.25/0.5	0.5/1	32/64	0.5/2	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Cr. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (n=869)		0.25/0.5	4/16	4/8	0.06/0.12	0.12/0.25	≥8/≥8	4/≥8
<i>Cr. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (n=203)		0.12/0.25	4/16	1/4	≤0.015/0.06	0.03/0.25	≥8/≥8	1/≥8
<i>Cr. neoformans</i> hybrides AD (n=120)		0.12/0.25	4/16	2/8	0.03/0.12	0.06/0.12	≥8/≥8	2/≥8
<i>Cr. guillii</i> (n=27)		0.12/0.25	2/8	8/16	0.12/0.5	0.25/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhodoascus muciliginosus</i> (n=45)		0.25/0.5	0.25/0.5	≥64/≥64	2/8	1/2	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Trichosporon asahii</i> (n=52)		2/≥8	32/≥64	4/16	0.06/0.25	0.25/0.5	≥8/≥8	4/≥8

\* AMB (amphotéricine B), 5-FC (5-fluorocytosine), Fluco (fluconazole), Vori (voriconazole), Posa (posaconazole), Caspo (caspofungine), Mica (micafungine) \*\* En raison d'un changement du milieu test (RPMI remplacé par AM3), les résultats ne concernent que les souches testées depuis début 2005 pour la caspofungine ou début 2008 pour la micafungine.


## ANNEXE V :

	<b>Identifier et maîtriser les risques du laboratoire B2P</b>
---	---

### SOMMAIRE

<b>1</b>	<b>OBJET DE LA PROCÉDURE</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>DOMAINE D'APPLICATION</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>DOCUMENTS DE RÉFÉRENCE ET DOCUMENTS ASSOCIÉS</b>	<b>3</b>
3.1	Documents de référence	3
3.2	Documents associés	3
3.3	Personnes concernées	3
<b>4</b>	<b>DÉFINITIONS</b>	<b>3</b>
<b>5</b>	<b>EXIGENCES REGLEMENTAIRES ET NORMATIVES</b>	<b>4</b>
5.1	Norme NF EN ISO 15189 : 2012	4
5.2	Document SH GTA 01	4
5.3	Document SH GTA 01	5
<b>6</b>	<b>RISQUES ET GESTION DES RISQUES EN LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICALE</b>	<b>5</b>
6.1	Qu'est-ce qu'un risque ?	5
6.2	Qui est concerné ?	5
6.3	Quels sont les risques encourus ?	6
6.4	Gestion des risques	7
6.5	Identification des risques dans un laboratoire de biologie médicale	8
<b>7</b>	<b>GESTION DES RISQUES ET VIGILANCES AU LABORATOIRE B2P</b>	<b>9</b>
7.1	Identifier les risques	10
7.2	Evaluer la criticité des risques	11
7.3	Evaluer le niveau de maîtrise des risques	13
7.4	Analyser la nécessité de mettre en place des actions de maîtrise	15
7.5	Représenter visuellement le nombre de risques, leur criticité et leur niveau de maîtrise	16
7.6	Identification et maîtrise des risques transversaux	17
7.7	Déploiement 2015-2018 de la gestion des risques à l'échelle des structures et du LBM B2P	19

	<b>Identifier et maîtriser les risques du laboratoire B2P</b>
---	---

Les modifications apportées à la version précédente sont identifiées par le symbole .

### 1 OBJET DE LA PROCÉDURE

La présente procédure décrit les dispositions prises par le laboratoire B2P (LBM B2P) pour assurer l'identification et la maîtrise des risques inhérents à chacun de ses processus. Elle définit les responsabilités au sein du laboratoire en termes de contrôles nécessaires à l'évaluation de défaillances potentielles pouvant avoir un impact sur la qualité des résultats des examens de biologie médicale.

### 2 DOMAINE D'APPLICATION

Cette procédure s'applique :

- Au biologiste-responsable du LBM B2P ;
- Aux responsables qualité et adjoint(s) ;
- Aux responsables informatique et métrologie et adjoint(s) ;
- Aux responsables des structures (chefs de services) ;
- Aux référents qualité, informatique, métrologie des structures ;
- Aux pilotes de processus ;
- Aux référents hygiène des structures ;
- Aux cadres des structures ;
- Aux biologistes et pathologistes ;
- Au responsable des audits internes et aux auditeurs internes.

#### Note 1 :

Conformément à la réponse faite à la fiche d'écart non critique n°3 d'avril 2016 (surveillance S2), la liste de diffusion avec demande de validation de l'attestation de lecture de cette procédure générale dans le logiciel KallLab a été volontairement restreinte. Cette liste de diffusion est consultable dans KallLab.

**Cette procédure générale étant disponible dans la base documentaire de l'ensemble des structures du LBM B2P, toute personne du laboratoire peut en prendre connaissance.**

### 3 DOCUMENTS DE RÉFÉRENCE ET DOCUMENTS ASSOCIÉS

#### 3.1 Documents de référence

NORME NF EN ISO 15189 : 2012 et son SH REF 02 associé

SH GTA 01 –rév.01 « Guide technique d'accréditation en biologie médicale »

SH GTA 04 – rév.01 « Guide technique d'accréditation de vérification (portée a) / validation (portée b) des méthodes en biologie médicale ».

#### 3.2 Documents associés

Les documents associés à cette procédure sont liés informatiquement dans KallLab et sont visibles dans l'onglet « Informations supplémentaires », rubrique « Documents joints ».

#### 3.3 Personnes concernées

Cette procédure concerne l'ensemble du personnel du LBM B2P.

### 4 DÉFINITIONS

**Accident** : événement ou suite d'événements néfastes, entraînant des dommages notamment corporels, parfois mortels.

**Détection** : évaluation de la probabilité que les contrôles détecteront la cause d'une défaillance ou la défaillance elle-même.

**Effet** : conséquence défavorable que les personnes pourraient subir

**Événement indésirable** : changement non souhaité affectant le déroulement d'un processus

**Incident** : événement dégradant n'entraînant pas de dommages corporels, mais susceptible d'être considérés comme précurseur d'accident

**Non-conformité** : non-satisfaction à une exigence spécifiée.

**Occurrence** : évaluation de l'apparition d'une défaillance particulière.

**Sévérité (gravité)** : évaluation de l'importance de l'effet de la défaillance potentielle.

### 5 EXIGENCES REGLEMENTAIRES ET NORMATIVES

#### 5.1 Norme NF EN ISO 15189 : 2012

##### 4.14.6 Gestion des risques

Le laboratoire doit évaluer l'impact des processus de travail et défaillances potentielles sur la sécurité des résultats des examens et doit modifier les processus pour réduire ou éliminer les risques identifiés, et documenter les décisions et actions menées.

#### 5.2 Document SH GTA 01

##### 4.14.6 Gestion des risques

Pour respecter les exigences normatives et en particulier celles du § 4.14.6 de la norme NF EN ISO 15189, le laboratoire doit tout mettre en œuvre pour réduire et/ou éliminer les risques potentiels identifiés. La gestion des risques de chaque processus comporte plusieurs étapes :

- l'identification des risques potentiels
- l'estimation du risque (gravité et fréquence)
- la maîtrise du risque

Les risques potentiels dans un laboratoire de biologie médicale sont par exemple de fournir des résultats trop tardifs, inexacts ou accompagnés d'une interprétation erronée pouvant avoir un impact sur le diagnostic ou le traitement médical.

L'identification des risques peut être effectuée à partir de l'étude de l'étendue des non-conformités et des réclamations. Les risques potentiels peuvent être identifiés soit à partir des analyses de tendance (contrôles qualité, suivi métrologique, ...), soit à partir de l'étude minutieuse des processus permettant l'identification des étapes sensibles lors de leur réalisation (norme ISO/TS 22367 « Laboratoires médicaux – Réduction d'erreurs par gestion du risque et amélioration continue »).

L'estimation du risque permet de hiérarchiser / prioriser les actions de maîtrise à mettre en place. Le laboratoire sera donc amené à établir une échelle de criticité tenant compte de la fréquence et de la gravité des événements indésirables afin de les maîtriser (méthode d'analyse de type AMDEC, HACCP, ...). Suite aux actions, le laboratoire peut être amené, si nécessaire, à modifier les processus ou procédures associées. Les actions mises en place sont tracées (sous forme d'actions préventives, plans d'action ...).

La gestion des risques est un élément d'entrée de la revue de direction.

### 5.3 Document SH GTA 01

#### 8 GESTION DES RISQUES

La maîtrise des risques dans le cadre de la vérification / validation de méthodes consistera à identifier les critères de qualité de la méthode et les étapes critiques de la phase analytique à maîtriser. La méthode des 5M pourra être utilisée en envisageant tous les points critiques concernant les locaux et conditions environnementales (agencement, température, ...), les réactifs (préparation, variations lot à lot et stabilité), les équipements (respect des modes opératoires et instructions fournisseur, maintenance, étalonnage, raccordement métrologique), le personnel (formation, évaluation des compétences), la méthode (critères de performance : fidélité, justesse, incertitudes, interférences...), sans négliger les critères de qualité des échantillons analysés.

## 6 RISQUES ET GESTION DES RISQUES EN LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICALE

### 6.1 Qu'est-ce qu'un risque ?

Un risque est une situation non souhaitée ayant des conséquences négatives résultant de la survenue d'un ou plusieurs événements dont l'occurrence est incertaine (ANAES). Il s'agit d'un événement entravant la mission qui consiste à assurer des soins de qualité aux personnes en toute sécurité. Dans un laboratoire de biologie médicale, le risque potentiel est de fournir des résultats erronés, trop tardifs, inexacts ou accompagnés d'une interprétation inappropriée pouvant avoir un impact sur le diagnostic ou le traitement médical.

### 6.2 Qui est concerné ?

- Les patients, prescripteurs et autres clients du LBM ;
- Le personnel du LBM ;
- L'environnement.

### 6.3 Quels sont les risques encourus ?

Il existe deux grands types de risques : les risques réglementés et les risques non réglementés.

#### 6.3.1. Les risques « réglementés »

Les risques réglementés sont liés à l'incendie, à la construction, au risque infectieux, chimique, radioactif, aux dispositifs, etc...

Ces risques sont gérés par les établissements dans le cadre d'une sécurité réglementaire organisée (ex : CLIN, vigilances...). Il s'agit d'une étape légale indispensable. Une gestion optimale de ces risques réglementés n'entraîne pas pour autant l'absence de risque car ils ne représentent que 4% des risques d'un établissement.

Les vigilances sanitaires permettent de surveiller les risques d'incidents ou d'effets indésirables liés aux produits de santé après leur mise sur le marché. Elles concourent à assurer une veille sanitaire par un processus continu de recueil, d'enregistrement, d'identification, de traitement, d'évaluation et d'investigation des événements indésirables liés à l'utilisation des produits de santé afin d'optimiser leur sécurité d'emploi.

La loi pose notamment le principe général de déclaration par les professionnels et les établissements de santé des différents types d'événements indésirables. Déclarer les effets indésirables et les incidents constatés permet d'appréhender au plus vite le profil de sécurité d'un produit, et de renforcer la sécurité sanitaire des patients, et d'améliorer les pratiques de gestion du risque.

Le laboratoire peut être confronté aux vigilances suivantes :

- **Identivigilance** : système de surveillance et de gestion des risques et erreurs liés à l'identification des patients ;
- **Infectiovigilance** : ensemble des mesures spécifiques de surveillance, de prévention et de maîtrise des infections nosocomiales ;
- **Matérovigilance** : elle a pour objet la surveillance des incidents ou des risques d'incidents résultant de l'utilisation des dispositifs médicaux. On entend par dispositif médical tout instrument, appareil, équipement, matière, produit, à l'exception des produits d'origine humaine ou autre article utilisé seul ou en association, y compris les accessoires et logiciels intervenant dans son fonctionnement, destiné par le fabricant à être utilisé chez l'homme à des fins médicales et dont l'action principale voulue n'est pas obtenue par des moyens pharmaceutiques ou immunologiques ni par métabolisme, mais dont la fonction peut être assistée par de tels moyens ;
- **Radioprotection** : elle désigne l'ensemble des mesures destinées à prévenir ou à réduire les effets des rayons ionisants afin de protéger les populations et les travailleurs qui y sont exposés. Ces mesures ne se limitent pas à la protection des personnes, elles tiennent aussi en compte l'environnement dans lequel elles évoluent ;
- **Réactovigilance** : elle consiste en la surveillance et l'évaluation des incidents et risques d'incidents résultant de l'utilisation d'un dispositif médical de diagnostic in vitro (voir procédures générales SLL-B2P-QUAL-PG-007 et SLL-B2P-INF-PG-001).

- **Toxicovigilance** : elle a pour objet la surveillance des effets toxiques pour l'homme d'un produit, d'une substance ou d'une pollution aux fins de mener des actions d'alerte, de prévention, de formation et d'information.

Sur le GH Saint-Louis / Lariboisière / Fernand Widal, une liste de vigilants a été établie pour réagir au plus vite à tout événement indésirable grave concernant les vigilances (voir document SLL-B2P-QUAL-DX-081).

### 6.3.2. Les risques « non réglementés »

Oubli, maladresse, qualification incertaine, erreur, accident (chute), recopiage, transcription verbale, malveillance, non encadrement des juniors, absence de protocole, procédure non respectée, défaut de consentement, suivi défectueux, charge de travail, réactifs périmés...

Ces risques ont un impact sur la qualité des résultats : variations pré-analytiques, per-analytiques, post-analytique.

## 6.4 Gestion des risques

### 6.4.1 Généralités

La gestion des risques consiste à maîtriser les risques avérés et prévenir les risques potentiels. Elle vise à réduire les risques de survenue d'événements indésirables ou d'accidents concernant les patients ou le personnel. Elle permet à l'établissement de continuer à fonctionner.

L'évaluation et la maîtrise des risques fait partie intégrante des responsabilités d'un directeur de laboratoire. Par exemple, l'analyse des risques d'erreurs concernant les résultats d'examen de biologie médicale fournis, potentiellement déléteurs pour la prise en charge des patients, doit avoir été conduite et les mesures nécessaires à leur prévention mises en œuvre.

Pour prévenir les risques en laboratoire de biologie médicale, deux approches sont possibles :

- La prévention secondaire, faite *a posteriori* (ou réactive) : elle permet, en présence d'événements indésirables qui sont survenus, de s'interroger sur ce qu'il s'est passé ;
- La prévention primaire qui est faite *a priori* (ou proactive) : elle permet de se demander ce qui pourrait mal se passer et d'anticiper au maximum la survenue d'événements indésirables.

Les deux approches sont à combiner car il est important d'analyser le passé (approche *a posteriori*), mais aussi d'identifier les risques potentiels (approche *a priori*).

### 6.4.2 Les différentes étapes de la gestion des risques

La gestion des risques dans un laboratoire de biologie médicale comporte plusieurs étapes représentées dans la figure 1.



Figure 1 : Les 4 étapes de la gestion des risques.

L'efficacité de la prévention doit être évaluée par l'inventaire périodique des risques résiduels, voire de nouveaux risques à prendre en compte, et les stratégies de prévention régulièrement réadaptés à l'évolution de ces données (application du principe d'amélioration continue au domaine de la prévention des risques).

## 6.5 Identification des risques dans un laboratoire de biologie médicale

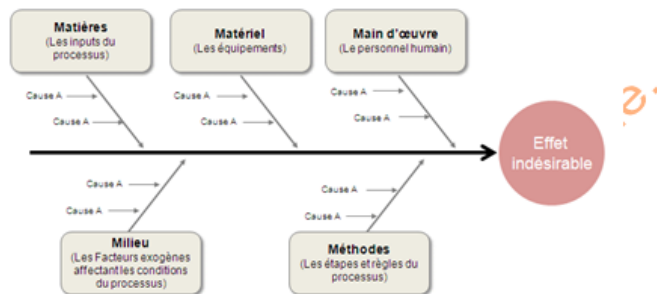
Les risques et leurs origines peuvent être identifiés par la méthode des 5M, puis leur criticité est évaluée par la méthode AMDEC.

Les risques potentiels peuvent être décrits à l'aide du graphe d'ISHIKAWA (méthode des 5 M) :

- **Main d'œuvre** : erreur humaine, personne incompétente ou pas suffisamment formée, personne non habilitée ;
- **Méthode** : inexistante, documents pas adaptés, responsabilités mal définies (la façon de faire, orale et écrite, procédure, instruction...) ;
- **Matériel** : déréglé, endommagé, non adapté, maintenances non effectuées (équipement, machine, petit matériaux, systèmes d'information,...) ;
- **Matière** : non conforme, manquant, pas adapté (consommable, échantillon biologique,...) ;
- **Milieu** : dégradé, non adapté (environnement physique et humain, conditions de travail).

On peut ajouter un 6ème « M » à l'analyse pour Management.

Diagramme d'Ishikawa



## 7 GESTION DES RISQUES ET VIGILANCES AU LABORATOIRE B2P

L'étude des risques au laboratoire s'inscrit dans le cadre de la démarche qualité exigée par la norme NF EN ISO 15189 : 2012 (voir § 5 de cette procédure). Elle permet de ne rien négliger, d'anticiper d'éventuelles défaillances qui pourraient conduire à une incapacité partielle voire totale de produire un résultat d'examen fiable et de qualité. Pour répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189, l'analyse des risques doit se faire à plusieurs niveaux :

- A l'échelle du laboratoire. Pour chacun des processus du LBM B2P, les risques sont identifiés, leur criticité et leur niveau de maîtrise évalués et pour les risques les plus critiques, des actions de maîtrise doivent être proposées et suivies.

Les pilotes de processus initient et guident la description des risques inhérents à leur processus mais il est du devoir de chaque membre du personnel de leur faire part d'un risque qu'il aurait identifié lors d'une situation / source particulière.  
 L'identification des risques transversaux, de leur criticité et de leur niveau de maîtrise est intégrée dans les fiches processus.

☑ A noter que la gestion des risques et vigilances fait elle-même l'objet d'un processus (M4 – Gestion des risques et vigilances).

- A l'échelle des structures où les risques doivent également être identifiés, par exemple par l'analyse des non-conformités. La gestion des risques du processus P2-Analytiques fait désormais partie intégrante des dossiers de vérification / validation de méthode (voir procédure générale SLL-B2P-ANA-PG-005).

### 7.1 Identifier les risques

De nombreuses situations permettent d'identifier les risques *a priori* ou *a posteriori*. Quelques exemples (listes non exhaustives) sont donnés ci-dessous.

#### 7.1.1. Situations / sources permettant d'identifier un risque *a posteriori*

Elles sont multiples :

- Non-conformités ;
- Réclamations et événements indésirables ;
- Audits internes et externes ;
- Document Unique des risques professionnels ;
- Accidents du travail ;
- Indicateurs qualité ;
- Enquêtes de satisfaction ;
- Autres.

#### 7.1.2. Situations / sources permettant d'identifier un risque *a priori*

L'identification des risques est faite avant que ceux-ci n'aient eu lieu. Cette évaluation peut provenir de sources diverses :

- Ecart Cofrac obtenu par un autre LBM ;
- Congrès ;
- Réunion interne ou externe au LBM B2P ;
- Formation interne ou externe au LBM B2P ;
- Etude minutieuse d'un processus ;
- Suggestions du personnel ;
- Autres.

## 7.2 Evaluer la criticité des risques

L'évaluation des risques passe par la détermination d'un indice de criticité.

L'indice de **criticité** d'un risque (C) est :

- Pour un risque identifié *a posteriori* : le produit de sa **Fréquence F** (voir tableau 1) et de sa **Gravité G** (voir tableau 2)
- Pour un risque identifié *a priori* : la fréquence est remplacée par la **Probabilité d'Occurrence**. Pour simplifier, cette probabilité d'occurrence est aussi désignée par la lettre F.

La criticité d'un risque est ainsi définie par le produit de la fréquence (ou probabilité d'occurrence) par la gravité :

$$C = F \times G.$$

Une cotation de 1 à 5 est attribuée à chaque paramètre.

Fréquence	Signification	Cotation
Très rare	Moins de 1 fois par an	1
Rare	1 à 3 fois par an	2
Peu fréquente	4 à 12 fois par an	3
Fréquente	13 à 50 fois par an	4
Très fréquente	> 50 fois par an	5

Tableau 1 : Détermination de la fréquence d'un risque

Gravité	Signification	Cotation
Mineure	Conduit à des événements indésirables non graves. Impact mineur sur le rendu des résultats et le SMLQ sans préjudices sur la prise en charge du patient ou le patient lui-même. Sans effet sur la performance, les processus, la poursuite de l'activité ou la sécurité. Incident du travail.	1
Significative	Conduit à des événements indésirables non graves. ☒ Impact sur le rendu des résultats (examen oublié, erreur, retard,...) ayant un effet significatif sur la prise en charge du patient, mais sans conséquence grave pour le patient. Effet ne remettant pas en cause le fonctionnement du processus. Atteinte superficielle, sentiment d'insécurité. Dégradations mineures. Accident du travail sans arrêt.	2
Grave	Conduit à des événements indésirables de gravité intermédiaire. ☒ Impact sur le rendu des résultats (examen oublié, erreur, retard,...) ayant une conséquence grave sur la prise en charge du patient (report d'intervention chirurgicale, prolongation d'hospitalisation, traitement médicamenteux inadapté, transfert non prévu en réanimation) et/ou le patient lui-même (perte de fonction transitoire). Arrêt temporaire de l'activité avec solution de remplacement. Arrêt de travail ≤ 21 jours	3
Critique	Conduit à des événements indésirables graves. ☒ Impact sur le rendu des résultats (examen oublié, erreur, retard,...) avec des conséquences critiques sur la prise en charge du patient (traitement médicamenteux inadapté, réintervention chirurgicale,...) et/ou le patient lui-même (pronostic vital engagé, séquelles, retentissement sur la vie quotidienne, incapacité partielle permanente). Dégradation permanente de l'activité avec impact sur les performances et la sécurité Dégradation de matériel de valeur. Arrêt de travail > 21 jours.	4
Catastrophique	Conduit à des événements indésirables non graves. ☒ Impact sur le rendu des résultats (examen oublié, erreur, retard,...) avec décès, séquelles graves irréversibles, invalidité permanente. Arrêt de l'activité sans solution de remplacement. Dégradation majeure ne permettant pas de réaliser l'activité. Arrêt du travail entraînant le décès ou des séquelles graves irréversibles.	5

Tableau 2 : Détermination de la gravité d'un risque.

La criticité C du risque est alors égale à :

**C = cotation fréquence ou probabilité d'occurrence F x cotation gravité G**

Selon sa valeur, cette criticité peut être faible (1 à < 4), modérée (4 à < 10) ou élevée (≥ 10) (Figure 3).

F \ G	1	2	3	4	5
1	1	2	3	4	5
2	2	4	6	8	10
3	3	6	9	12	15
4	4	8	12	16	20
5	5	10	15	20	25

**Figure 2 : Criticité d'un risque.**  
Selon sa valeur, la criticité d'un risque peut être faible (en vert), modérée (en orange) ou élevée (en rouge).

### 7.3 Évaluer le niveau de maîtrise des risques

Le niveau de maîtrise des risques doit être évalué :

- Lors de l'identification d'un risque, en fonction de la mise en place ou non d'un plan d'action ;
- A la fin du délai du plan d'action pour les risques à criticité modérée ou élevée. Cette évaluation permet de vérifier que les actions ont été efficaces ;
- Au moins une fois par an pour tous les risques et ce quelle que soit la criticité initiale.

Le niveau de maîtrise est évalué par la cellule qualité du Pôle à partir des informations de gravité et fréquence transmises par les structures

L'échelle choisie pour évaluer le niveau de maîtrise d'un risque est celle que le GH utilise pour la gestion des risques des processus dans le cadre de démarche de certification.

Le niveau de maîtrise d'un risque est de 1 à 5 selon le tableau ci-après (Tableau 3) :

Niveau	Description synthétique
Niveau 1	On découvre le risque : plan d'action non rédigé, aucune action n'est en place. Ou plan d'action rédigé avec quelques actions effectuées, mais celles-ci sont inefficaces (il faut donc réviser le plan d'action).
Niveau 2	On est en alerte : plan d'action rédigé mais aucune action n'est en cours ou effectuée.
Niveau 3	On a organisé : plan d'action rédigé, actions en cours ou effectuées, mais pas d'évaluation de l'efficacité des actions
Niveau 4	On a tout prévu : plan d'action en place avec indicateur(s). Évaluation de l'efficacité initiée.
Niveau 5	On sait faire, bonne maîtrise du risque : plan d'action suivi, veille, contrôle, amélioration continue.

**Tableau 3 : Évaluer le niveau de maîtrise**

#### 7.4 Analyser la nécessité de mettre en place des actions de maîtrise

En fonction de la gravité et/ou de la criticité d'un risque, des actions destinées à la maîtrise de ce risque peuvent/doivent être mises en place. Tout risque présentant une cotation  $C \geq 10$  ou une gravité  $G = 5$  doit obligatoirement faire l'objet d'une action curative immédiate pour les risques *a posteriori* et de la mise en œuvre d'un plan d'action (actions correctives et/ou préventives) dans les délais les plus brefs (Tableau 4).

Gravité et criticité	Nécessité de mettre en place des actions de maîtrise (actions curatives / correctives / préventives) et délai de cette mise en place
Gravité 1 à 4 et criticité faible (1 à 4)	Risque acceptable ne nécessitant aucune action particulière.
Gravité 1 à 4 et criticité modérée (4 à 9) et niveau de maîtrise 3 à 5	Risque indésirable mais assez bien maîtrisé ne nécessitant aucune action particulière.
Gravité égale à 5 ou criticité élevée ( $\geq 10$ ) et niveau de maîtrise 4 à 5	Risque Inacceptable suffisamment maîtrisé Ne nécessite en général aucune action supplémentaire que celles déjà existantes
Gravité 1 à 4 et criticité modérée (4 à 9) et niveau de maîtrise 1 à 2	Risque indésirable non suffisamment maîtrisé Nécessite obligatoirement la mise en œuvre d'une action ou d'un plan d'action (actions curatives immédiates pour les risques <i>a posteriori</i> , puis correctives pour les risques <i>a posteriori</i> ou préventives pour les risques <i>a priori</i> ). Les actions sont à effectuer dans les 6 mois.
Gravité égale à 5 ou criticité élevée ( $\geq 10$ ) et niveau de maîtrise 1 à 2	Risque inacceptable nécessitant obligatoirement la mise en œuvre d'une action ou d'un plan d'action de façon urgente (actions curatives immédiates pour les risques <i>a posteriori</i> , puis correctives pour les risques <i>a posteriori</i> ou préventives pour les risques <i>a priori</i> ). Les actions curatives sont à effectuer dans les 3 mois, les correctives dans les 6 mois.

Tableau 4 : Criticité et nécessité de mettre en place des actions correctives et/ou préventives

#### 7.5 Représenter visuellement le nombre de risques, leur criticité et leur niveau de maîtrise

Chaque risque identifié (pour un processus transversal ou dans une structure du LBM) peut ensuite figurer dans une grille « Criticité/niveau de maîtrise des risques » (Figure 3) :



Figure 3 : Grille Criticité / niveau de maîtrise

Chaque risque est identifié par une lettre et un chiffre (R1, R2,...). Il est ensuite inscrit dans la case correspondante à la valeur de son niveau de maîtrise (en abscisse) et de sa criticité (en ordonnée).

Cette grille est un outil facilitant le bilan annuel de la gestion des risques. En effet, d'une année sur l'autre, elle permet d'observer :

- Si le niveau de maîtrise des risques augmente ; ils se déplacent alors dans la grille de gauche à droite ;
- Si la criticité des risques diminue du fait de leur maîtrise (essentiellement suite à la diminution de leur fréquence) ; les risques se déplacent alors de haut en bas dans la grille.

### 7.6 Identification et maîtrise des risques transversaux

L'identification des risques de chaque processus est intégrée à chaque fiche processus. Les risques majeurs sont identifiés dans un tableau qui comprend les colonnes suivantes :

- **Code du risque** : dans cette colonne, chaque risque est identifié par un code comprenant le numéro du processus (P1, M3, S5,...) et le numéro du risque qui s'incrémente (R1, R2, R3,...). Par exemple, pour le processus P2 - Analytique, au fur et à mesure de leur description, les risques sont codés comme suit : P2 / R1, P2 / R2, P2 / R3...
- **Conséquence avérée** : décrire ce qui a été observé (par exemple, « Erreur de saisie manuelle d'un résultat ») ;
- **Risque induit** : incidence du risque sur la qualité des prestations du LBM à court, moyen et long terme (par exemple, pour la conséquence « Erreur de saisie manuelle d'un résultat », le risque induit est « Rendre un résultat erroné ») ;
- **Date d'identification du risque** : date de la description de la non-conformité correspondante,... Si cette date est inconnue, mettre la date de description du risque ;
- **Risque détecté a priori ou a posteriori** : mettre a priori, a posteriori ...
- **Fréquence** : à évaluer de 1 à 5 selon le tableau 1 (voir note 2) ;
- **Gravité** : à évaluer de 1 à 5 selon le tableau 2 (voir note 2) ;
- **Criticité** : faire le produit fréquence x gravité (voir note 2) ;
- **Niveau de maîtrise** : à évaluer de 1 à 5 selon le tableau 3 ;
- **Dispositif de maîtrise** : le décrire. Si le plan d'action a été intégré à une fiche qualité dans KaliLab, mettre le numéro de la fiche. Si un document fait partie de la maîtrise du risque, mettre si possible sa référence ;
- **Commentaire** : mettre toute remarque jugée utile.

Les identifiants des risques (P2 / R1, P2 / R2, P2 / R3,...) sont ensuite reportés dans la grille « Criticité/niveau de maîtrise des risques » (Figure 3).

#### Note 2 :

Dans la première ou les deux premières versions des fiches processus, la description des risques d'un processus n'est pas forcément complète. Les risques sont listés, mais leur criticité, niveau de maîtrise et moyens de maîtrise ne sont pas forcément décrits.

En effet, pour les risques applicables à plusieurs structures, il convient d'estimer la fréquence et la gravité du risque dans chaque structure concernée, puis celles du risque transversal à l'échelle du LBM. En effet, par exemple, pour un risque se produisant 4 à 12 fois par an (F=3) dans la structure A, 1 à 3 fois par an (F=2) dans les structures B et C, alors ce risque se produit jusqu'à  $12+3+3=18$  fois dans le LBM B2P, soit d'après le tableau 1, une fréquence estimée à 4. Si ce risque a une gravité G=2 dans la structure A, G=4 dans la structure B et G=2 dans la structure C, alors la gravité du risque transversal correspond à la gravité la plus élevée (c'est-à-dire 4 ici). La criticité du risque transversal est alors égale à  $3 \times 4$ , soit 12.

Le niveau de maîtrise est également évalué dans chaque structure et le niveau de maîtrise du risque transversal à l'échelle du LBM correspond au niveau de maîtrise le plus faible déterminé dans les structures.

Il est à noter que cette approche de calcul de la criticité et du niveau de maîtrise n'a pas encore débuté et sera mise en œuvre en 2017.

#### Note 3 :

Lors de l'identification d'un nouveau risque, le pilote de processus peut décider de créer une nouvelle version de la fiche processus et intégrer le nouveau risque au tableau de description des risques. Pour éviter de créer trop souvent des nouvelles versions de la fiche de son processus, il peut aussi noter en « Commentaire » en bas de la fiche processus la description du nouveau risque. Quand il le juge opportun, il déclenche une mise à jour de la fiche et intègre l'ensemble des risques notés en « Commentaire ».

### 7.7 Déploiement 2015-2018 de la gestion des risques à l'échelle des structures et du LBM B2P

Le tableau 5 ci-dessous décrit les prévisions de déploiement de la gestion des risques, à l'échelle des structures et à celle du LBM.



	Structure	Pilotes de processus	Cellule qualité
2015	GDR dans le cadre des vérifications/validations de méthode		Plan d'action pour la mise en place de la GDR par processus
2016	GDR dans le cadre des vérifications/validations de méthode Rattacher les NC aux processus		Modalités de la GDR Description de 1 à 3 risques /processus NC Gesdoc Rattachement des NC aux processus Détermination de la criticité et du niveau de maîtrise des risques transversaux.
2017	GDR dans le cadre des vérifications/validations de méthode Analyse des NC 2016	Implémentation de la base des NC Revue de processus	Analyse transversale des NC 2016 Bilan annuel des risques transversaux 1 <sup>er</sup> bilan en RDD
2018	GDR dans le cadre des vérifications/validations de méthode Analyse des NC 2017	Implémentation de la base des NC Revue de processus	Analyse transversale des NC 2016 Bilan annuel des risques transversaux 2 <sup>e</sup> bilan en RDD

Tableau 5 : Déploiement 2015-2018 de la gestion des risques dans le LBM B2P.

Note 4 : Ce tableau avait été présenté en Revue de Direction le 09/03/2016.



## ANNEXE VI

	SLS-MYCOLOGIE PARASITOLOGIE 1, avenue Claude Vellefaux 75475 cede PARIS	<b>Réalisation d'un antifongogramme et test de sensibilité aux antifongiques Etest</b>	Ref : SLL-SLPAR-MYCO-MT-003 Version : 01 Applicable le : 08-10-2018	

### 1 OBJET DU MODE OPERATOIRE :

Décrire toutes les étapes techniques nécessaires pour tester in vitro la sensibilité de levures ou de champignons filamenteux vis-à-vis des différents antifongiques.

### 2 DOMAINE D'APPLICATION ET PERSONNES CONCERNEES :

#### 2.1 Domaine d'application :

Secteur : Mycologie du laboratoire

Echantillons : souches de levures ou de filamenteux pour lesquelles il est nécessaire de tester les sensibilités aux fongiques

#### 2.2 Personnes concernées :

- Personnels concernés : biologistes, techniciens de laboratoire, internes.
- Responsabilité médicale : validation par le(s) biologiste(s) responsables de l'unité.
- Responsabilité paramédicale : techniciens de laboratoire.

### 3 DOCUMENTS DE REFERENCE ET DOCUMENTS ASSOCIES :

#### 3.1 Documents de référence :

- NORME NF ISO 15189



#### 3.2 Documents associés :

- Centre de national de référence Mycose invasive et antifongiques- rapport annuel d'activité 2018

### 4 DEFINITIONS ET ABBREVIATIONS :

#### 4.1 Définitions :

**Concentration Minimum Inhibitrice :** C'est la plus faible concentration d'antifongique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une souche donnée après une certaine période d'incubation.

	SLS-MYCOLOGIE PARASITOLOGIE 1, avenue Claude Vellefaux 75475 cede PARIS	<b>Réalisation d'un antifongogramme et test de sensibilité aux antifongiques Etest</b>	Ref : SLL-SLPAR-MYCO-MT-003 Version : 01 Applicable le : 08-10-2018	

### 4.2 Abréviations :

- ATF : antifongogramme
- CMI : Concentration minimale inhibitrice

### 5 PRINCIPE DE LA METHODE :

Le principe est de tester la sensibilité d'une levure ou d'un champignon filamenteux en milieu gélosé vis-à-vis de différents antifongiques.

Une bandelette, sur laquelle est présent un gradient d'antifongique, est déposée sur la gélose préalablement ensemencée avec le champignon. Une ellipse d'inhibition de pousse permet l'obtention de la CMI (concentration minimale inhibitrice).

### 6 PRECAUTIONS DE SECURITE :

Les cultures sont obligatoirement manipulées sous PSM (contamination possible du prélèvement par les champignons de l'environnement).

### 7 MATERIELS ET REACTIFS NECESSAIRES :

#### Souches de référence :

- *Candida tropicalis*, ATCC® 750
- *Candida glabrata* 750 ATCC®MYA-2905
- *Aspergillus niger* ATCC 980483435



Ces souches nous ont été fournies par le laboratoire commercialisant les bandelettes d'antifongiques. Elles se présentent sous forme d'écouvillons lyophilisés prêt à l'emploi (voir fiche du fournisseur). Après reconstitution, elles sont ensemencées et conservées sur microbilles au congélateur à -20°C.

Noter le numéro lot de chaque souche sur tableau Excel

#### Bandelettes d'antifongiques E-test (Biomérieux)

Coffret de 30 bandelettes conservés au congélateur (-20°C, de la pièce de mycologie) jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage.

Antifongique	CODE	PRESENTATION	REF
Amphotéricine B	AP	Lot de 3	412249
Fluconazole	FL	A l'unité	412350
Itraconazole	IT	Lot de 3	41380
Voriconazole	VO	A l'unité	412490
Posaconazole	POS	Lot de 3	412440
Caspofungine	CS	A l'unité	412269

	SLS-MYCOLOGIE PARASITOLOGIE 1, avenue Claude Vellefaux 75475 cedé PARIS	<b>Réalisation d'un antifongogramme et test de sensibilité aux antifongiques Etest</b>	Ref : SLL-SLPAR-MYCO-MT-003 Version : 01 Applicable le : 08-10-2018
			

5 Fluocytosine	FC	A l'unité	412352
----------------	----	-----------	--------

**Gélose RPMI** (AES Réf AEB122182, BioMérieux)

Les géloses RPMI + 2% glucose sont commercialisées coulées en boîte de Pétri (ø 140 mm), par boîtes de 10 et conservées à +4°C (dans la chambre froide) jusqu'à la date de péremption indiquée.

#### Autre matériel nécessaire

- Ecouillons stériles,
- Suspension médium 5ml API®,
- Tween® 20. (Cell culture grade. Euromedex. réf 2001-A) pour les filamenteux,
- Pince stérile,
- Agitateur Vortex,
- Hotte PSM

## 8 LOCAUX :

Ce mode opératoire est réalisé dans le secteur Mycologie du laboratoire

Secteur Mycologie pièce SLS 01- 001-00- R01-339-356

Secteur Parasitologie pièce SLS 01- 001-00- R01- 347-350 (Hotte PSM type OPTIMALE 9- 070523)

## 9 DESCRIPTION DU MODE OPERATOIRE :

### 9.1 Echantillons à analyser

Souches de levures ou de champignons filamenteux, isolées au laboratoire ou reçues d'un laboratoire extérieur pour lesquelles est demandé un test de sensibilité aux antifongiques est nécessaire. Pour une levure isolée d'une hémoculture cela est systématique. Pour les levures isolées d'autres prélèvements ou pour les filamenteux (*Aspergillus* spp.) c'est à la demande du responsable de l'unité de mycologie.



### 9.2 Préparation des réactifs

Prendre les bandelettes d'antifongiques nécessaires pour les souches à tester.

Souche à tester	Antifongiques à tester
<i>Candida spp.</i>	AB, FC, FL ,VO, CS
<i>Aspergillus spp.</i>	AB, IT, VO, CS, POS

En cas de doutes voir avec le biologiste !

**Laisser à température ambiante les bandelettes et les géloses RPMI nécessaires environ 20 minutes avant de les utiliser.**

	SLS-MYCOLOGIE PARASITOLOGIE 1, avenue Claude Vellefaux 75475 cedé PARIS	<b>Réalisation d'un antifongogramme et test de sensibilité aux antifongiques Etest</b>	Ref : SLL-SLPAR-MYCO-MT-003 Version : 01 Applicable le : 08-10-2018
			

## 9.3 Mode opératoire

Dès réception d'un nouveau lot de milieux RPMI, une boîte sera testée avec les souches de référence *Candida albicans* et les antifongiques : AB, FL, FC, VO, CS afin de s'assurer de sa qualité.

### 9.3.1. Préparation de l'inoculum de LEVURE

- Préparer un inoculum de 0.5 Mc Farland à partir d'une suspension Médium 5ml API®,
- Prendre une ou deux colonies en fonction de la taille de celles-ci
- Vortexer quelques seconde
- Vérifier l'inoculum à l'aide d'un densitomètre.

### 9.3.2. Préparation de l'inoculum de FILAMENTEUX

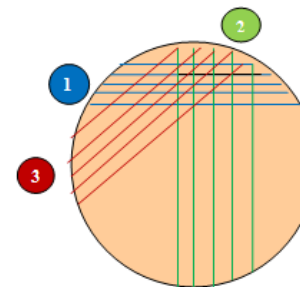
- Plonger l'écouvillon dans le Tween® 20,
- L'essorer sur les bords puis prendre toutes les colonies du champignon filamenteux à tester avant de le décharger dans la suspension médium.
- Bien décharger l'écouvillon dans la suspension.
- Vortexer quelques secondes.

### 9.3.3. Ensemencement des milieux

Plonger un nouvel écouvillon dans la suspension d'inoculum et bien l'imbiber, le sortir du tube en l'essorant doucement sur les parois.

**! NE PAS TROP ESSORER !**

- 1) Ensemencer le milieu RPMI en réalisant des stries serrées avec l'écouvillon.
- 2) Tourner la boîte de 90° et recommencer.
- 3) Tourner la boîte RPMI de 45° et recommencer. (Stries horizontales, verticales et en diagonale).



Laisser sécher les boîtes fermées, gélose en bas, 10 minutes sous le PSM avant de déposer les bandelettes

### 9.3.4 Dépôt des bandelettes

Prendre chaque bandelette avec une pince à usage unique stérile et la déposer sur la gélose selon le schéma ci-dessous. Vérifier que les chiffres et les initiales des bandelettes sont lisibles et dans le bon sens

**ATTENTION : Ne pas les déposer à l'envers.**

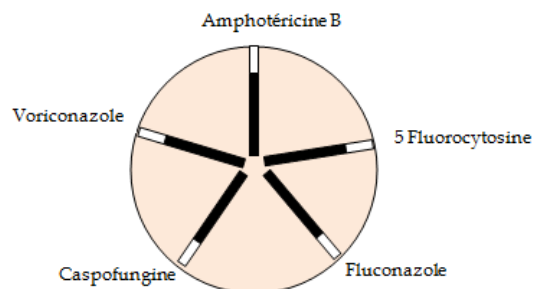


Figure 1 : Pour les levures, *Candida* spp.

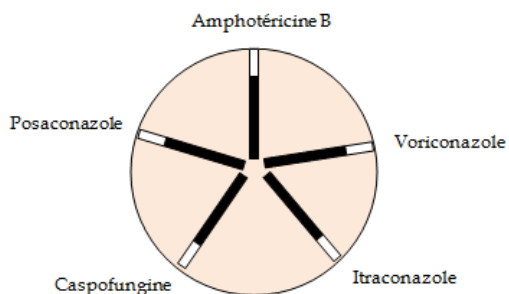


Figure 2 : Pour les filamenteux, *Aspergillus* spp.

**NE JAMAIS REDEPLACER UNE BANDELETTE UNE FOIS QU'ELLE EST ENTREE EN CONTACT AVEC LA GELOSE**

### 9.3.5. Incubation :

48 heures à 37°C pour *Candida* spp et *Aspergillus* spp (gélose en bas) pièce de mycologie SLS 01-001-00- R01-338-356

### 9.4 Critères de validité

Passage CIQ souche ATCC de référence *Candida tropicalis* ATCC et *glabrata* ATCC chaque mois

### 9.5 Interprétation des résultats

Après la période d'incubation, lire directement la valeur de la CMI (mg/l) correspondant à l'intersection des 2 ellipses d'inhibition, conformément aux recommandations de lecture.

Une interprétation est toujours nécessaire. Voir photos en annexe.

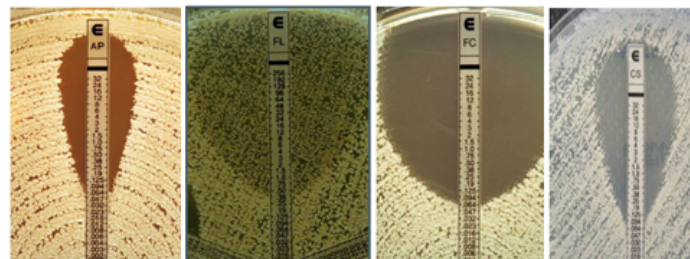


Figure 3 : amphotéricineB

Figure 4 : Azolés

Figure 5 : 5-fluorocytosine

Figure 6 : Echinocandine

- **Amphotéricine B** : la lecture de la CMI est à **100% d'inhibition**  
L'ellipse doit être claire (généralement mince) et tenir compte de toutes les colonies
- **Azolés (fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole)** : Lire à **80% d'inhibition**
  - Observer le premier changement de croissance
  - Possible tapis de microcolonie (à ne pas prendre en compte)
  - Prendre en compte les macrocolonies.
  - Vorico : ellipse en général plus nette.
  - *C. tropicalis* et *C. glabrata*, 2ème lecture à 48H (hétérorésistance)
- **5-Fluorocytosine** : Lire à **90-95% d'inhibition**
  - L'ellipse est généralement large
  - Ignorer les petites colonies (mais attention aux sous populations éventuelles = macrocolonies)

- **Echinocandines (caspofungine, micafungine)**: Lire à inhibition partielle (80%) / levures
  - inhibition partielle / filamenteux
  - Rétrécissement de l'ellipse au niveau du point de lecture (ne pas extrapoler)

## 10 TRANSMISSION DES RESULTATS

Tous les résultats sont enregistrés et validés dans le logiciel GLIMS par le biologiste.

## 11 CONSERVATION DESECHANTILLONSET ARCHIVAGE :

### 10.1 Conservations des échantillons

Le milieu RPMI est jeté après lecture.  
Le milieu de culture dont est issue la souche testée est conservée dans le frigo de stockage (jusqu'à 4 jours pour un Chromagar, 10 jours pour un milieu Malt et 21 jours pour un Sabouraud).

### 10.2 Archivage

Les résultats de CQI sont saisis sur un fichier Excel.

## 12 ANNEXES

Photos d'interprétation de la lecture des CMI.

## Etest Reading Guide for Moulds

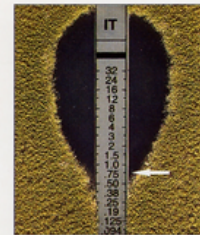


Figure 1. *A. flavus*, read at 72 hours. MIC 0.75 µg/ml.

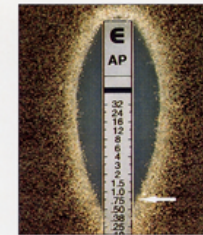


Figure 2. *A. niger*, read at 48 hours. MIC 0.75 µg/ml.

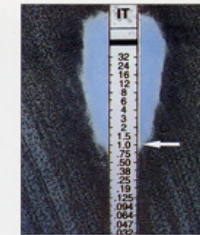


Figure 3. *A. fumigatus*, read at 24 hours. MIC 1 µg/ml.

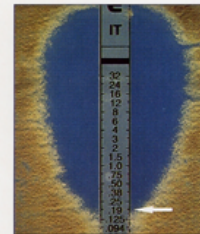


Figure 4. *P. variotii*, read at 48 hours. MIC 0.19 µg/ml.

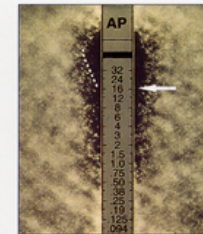


Figure 5. *Fusarium spp.*, read at 24 hours. MIC 16 µg/ml.

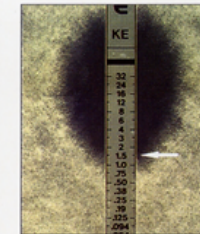


Figure 6. *Rhizopus spp.*, read at 18 hours. MIC 1.5 µg/ml.

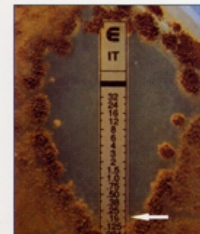


Figure 7. *A. flavus*, read at 24 hours. MIC 0.19 µg/ml.

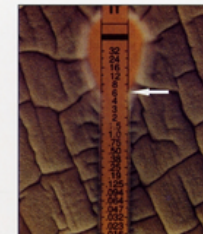


Figure 8. *A. flavus*, read at 24 hours. MIC 6 µg/ml.

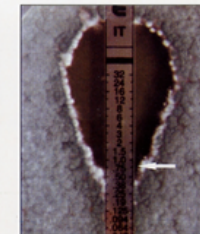


Figure 9. *Fusarium spp.*, read at 24 hours. MIC 0.75 µg/ml.

AB BIODISK

## Etest Reading Guide for Yeasts

*C. albicans* and certain other *Candida spp.* can give diffuse end points, especially with azoles and on certain media. The following guidelines could be used to select the appropriate MIC end point.



Figure 1. Flucytosine: Inner zone of microcolonies. MIC 1 µg/ml.



Figure 2. Flucytosine: Macrocolonies in inhibition ellipse. MIC >32 µg/ml.



Figure 3. Flucytosine: Resistant strain. MIC >32 µg/ml.

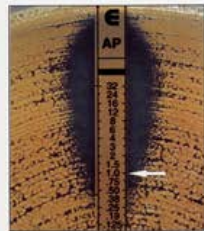


Figure 4. Amphotericin B: Microcolonies at the end point. MIC 1 µg/ml.



Figure 5. Amphotericin B: Macrocolonies in inhibition ellipse. MIC 3 µg/ml.



Figure 6. Amphotericin B: Very slim ellipse. MIC 4 µg/ml.

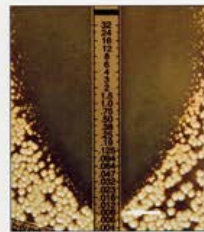


Figure 7. Ketoconazole: Sharp end point. MIC 0.008 µg/ml.



Figure 8. Ketoconazole: Macrocolonies within a discernable ellipse. MIC 0.012 µg/ml.



Figure 9. Ketoconazole: Macrocolonies in inhibition ellipse. MIC >32 µg/ml.

## Etest Reading Guide for Yeasts

*C. albicans* and certain other *Candida spp.* can give diffuse end points, especially with azoles and on certain media. The following guidelines could be used to select the appropriate MIC end point.



Figure 10. Itraconazole: Sharp end point. MIC 0.125 µg/ml.

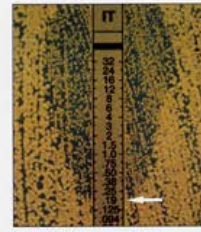


Figure 11. Itraconazole: Microcolonies within a discernable ellipse. MIC 0.19 µg/ml.



Figure 12. Itraconazole: Microcolonies within a slim ellipse. MIC 12 µg/ml.



Figure 13. Fluconazole: Less pigmented colonies within a discernable ellipse. MIC 0.25 µg/ml.



Figure 14. Fluconazole: Microcolonies and a double ellipse. MIC 2 µg/ml.

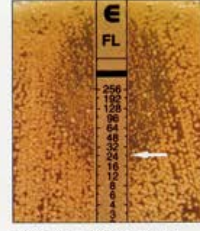


Figure 15. Fluconazole: Microcolonies within a discernable ellipse. MIC 24 µg/ml.



Figure 16. Fluconazole: Microcolonies within a discernable ellipse. MIC 0.5 µg/ml.



Figure 17. Fluconazole: Macrocolonies within inhibition ellipse. MIC >256 µg/ml.

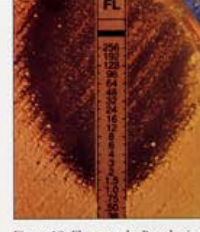
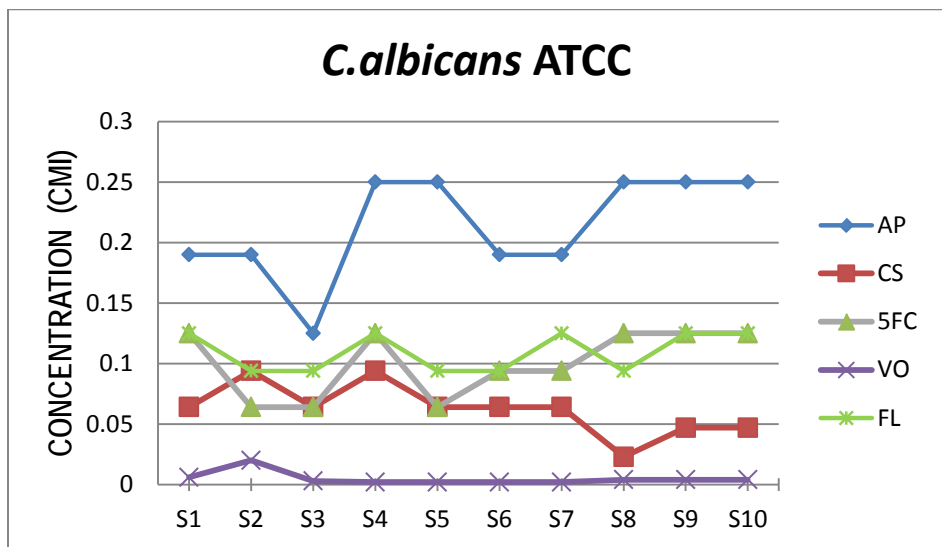


Figure 18. Fluconazole: Paradoxical effect. MIC >256 µg/ml.

ANNEXE VII :



Seuil EUCAST : **AP S d 1 < R**

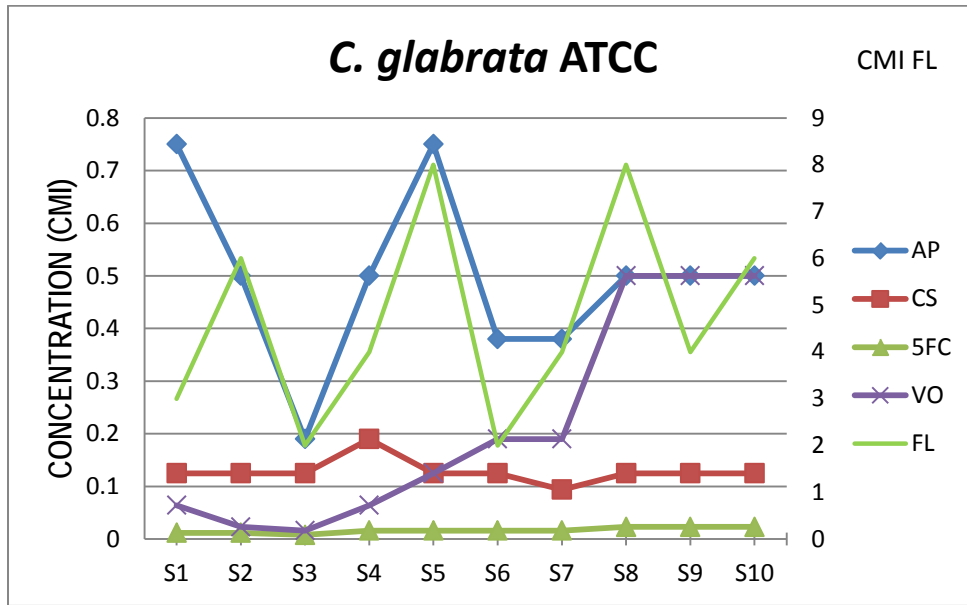
Seuil CMI 50/ CMI 90 : **5FC d 0,12/ 0,5**

**CS S d 0.016 < R**

**VO S d 0.064 R > 0.25**

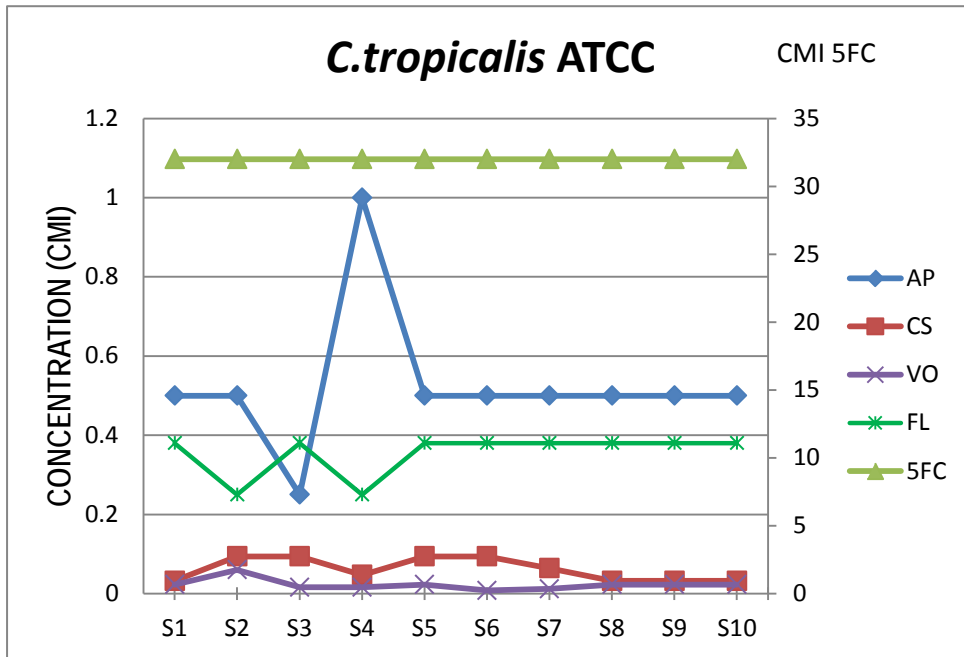
**FL S d 2 R > 4**

Levure	Vitek MS % identification	E-TEST		Amphotéricine S ≤ 1 < R	Caspofongine S ≤ 0,016 < R	fluorocytosine 5FC S ≤ 0,12/0,5	Voriconazole S ≤ 0,064 R > 0,25	Fluconazole S ≤ 2 R > 4
		N° lot		1006217460	1005969650	1005163320	1005825660	1005145560
<b>C. albicans ATCC</b>	22/06/2018 99,90%	1	CMI	0,19	0,064	0,125	0,006	0,125
	R/I/S		S	R	S	S	S	
	29/06/2018 99,90%	2	CMI	0,19	0,094	0,064	0,02	0,094
	R/I/S		S	R	S	S	S	
	11/07/2018 99,90%	3	CMI	0,125	0,064	0,064	0,003	0,094
	R/I/S		S	R	S	S	S	
	20/07/2018 99,90%	4	CMI	0,25	0,094	0,125	0,002	0,125
	R/I/S		S	R	S	S	S	
	27/07/2018 DIA 99,90%	5	CMI	0,25	0,064	0,064	0,002	0,094
	R/I/S		S	R	S	S	S	
	01/08/2018 JB 99,90%	6	CMI	0,19	0,064	0,094	0,002	0,29
	R/I/S		S	R	S	S	S	
	10/08/2018 EDS 99,90%	7	CMI	0,19	0,064	0,094	0,002	0,125
	R/I/S		S	R	S	S	S	
	20/08/2018 TC 99,90%	8	CMI	0,25	0,023	0,125	0,004	0,094
	R/I/S		S	R	S	S	S	
	31/08/2018 TC* 99,90%	9	CMI	0,25	0,047	0,125	0,004	0,125
	R/I/S		S	R	S	S	S	
	31/08/2018 TC* 99,90%	10	CMI	0,25	0,047	0,125	0,004	0,125
	R/I/S		S	R	S	S	S	



Levure	Vitek MS % identification	E-TEST		Amphotéricine S≤1 R>1	Caspofongine S≤ 0,032 <R	fluorocytosine 5FC ≤0,12/≤0,12	Voriconazole 0,25/1	Fluconazole S≤ 0,002 R>32
		N° lot		1006217460	1005969650	1005163320	1005825660	1005145560
<b>C. glabrata ATCC</b>	22/06/2018 99,90%	1	CMI	0,75	0,125	0,012	0,064	3
	R/I/S		S	R	S	S	I	
	29/06/2018 99,90%	2	CMI	0,5	0,125	0,012	0,023	6
	R/I/S		S	R	S	S	I	
	11/07/2018 99,90%	3	CMI	0,19	0,125	0,008	0,016	2
	R/I/S		S	R	S	S	I	
	20/07/2018 99,90%	4	CMI	0,5	0,19	0,016	0,064	4
	R/I/S		S	R	S	S	I	
	27/08/2018 DIA 99,90%	5	CMI	0,75	0,125	0,016	0,125	8
	R/I/S		S	R	S	S	I	
01/08/2018 JB 99,90%	6	CMI	0,38	0,125	0,016	0,19	2	
R/I/S		S	R	S	S	I		
10/08/2018 EDS 99,90%	7	CMI	0,38	0,094	0,016	0,19	4	
R/I/S		S	R	S	S	I		
20/08/2018 TC 99,90%	8	CMI	0,5	0,125	0,023	0,5	8	
R/I/S		S	R	S	S	I		
31/08/2018 TC* 99,90%	9	CMI	0,5	0,125	0,023	0,5	4	
R/I/S		S	R	S	S	I		
31/08/2018 TC* 99,90%	10	CMI	0,5	0,125	0,023	0,5	6	
R/I/S		S	R	S	S	I		

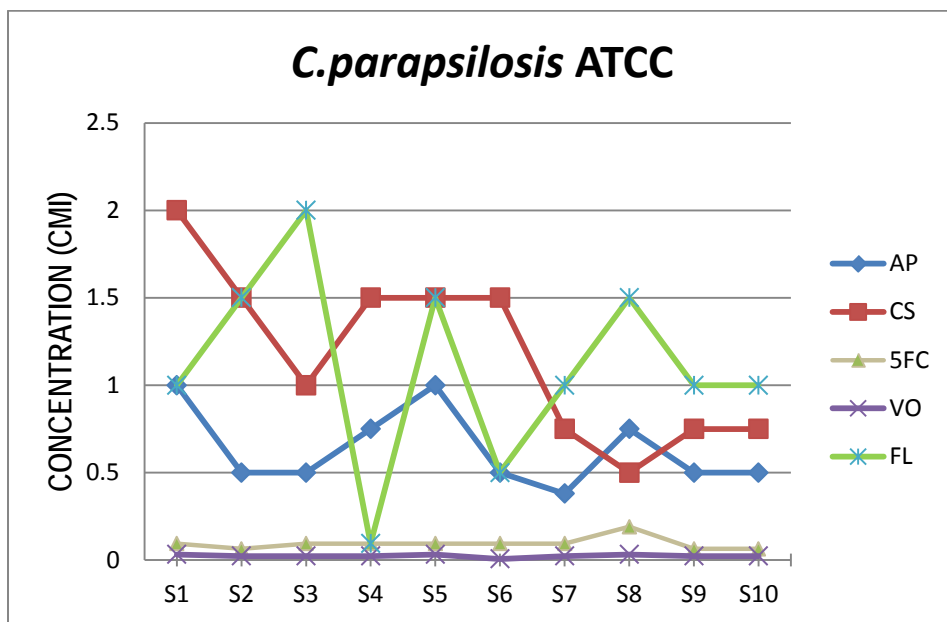
Seuil EUCAST : AP S d 1 R > 1      Seuil CMI 50/ CMI 90 : 5FC d 0,12/ d 0,12  
 CS S d 0.032 < R  
 VO 0.25/1  
 FL S ≤ 0.002 R > 32



Seuil EUCAST : **AP S ≤ 1 R > 1**  
**VO S ≤ 0.125 R > 0.25**  
**FL S ≤ 2 R > 4**

Seuil CMI 50/ CMI 90 : **5FC 0,12/ 32**  
**CS 0.03/ 0.06**

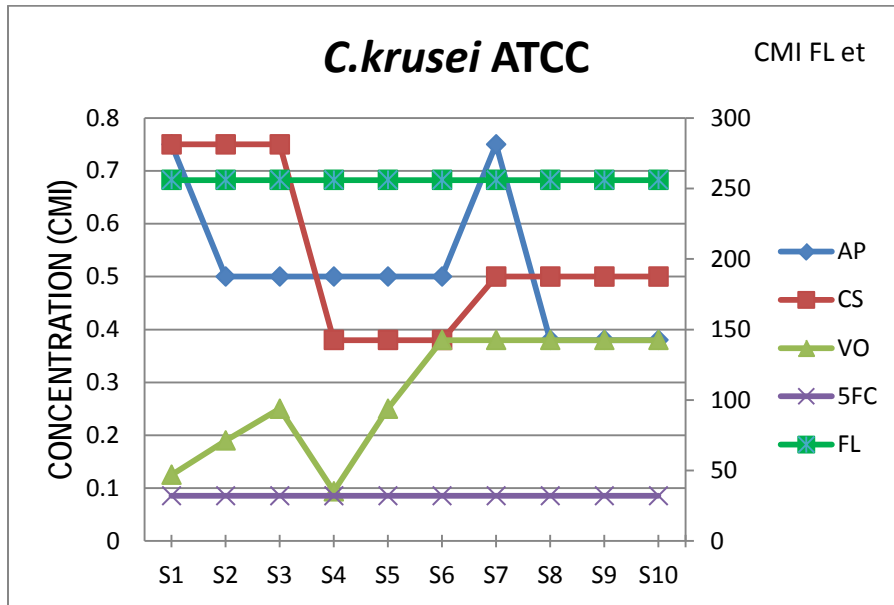
Levure	Vitek MS % identification	E-TEST		Amphotéricine S ≤ 1 R > 1	Caspofongine 0,03/0,06	fluorocytosine ≤ 0,12/32	Voriconazole S ≤ 0,125 R > 0,25	Fluconazole S ≤ 2 R > 4
		N° lot		1006217460	1005969650	1005163320	1005825660	1005145560
<b>C. tropicalis ATCC</b>	22/06/2018 99,90%	1	CMI	0,5	0,032	>32	0,023	0,38
	R/I/S		S	S	R	S	S	
	29/06/2018 99,90%	2	CMI	0,5	0,094	>32	0,06	0,25
	R/I/S		S	R	R	S	S	
	11/07/2018 99,90%	3	CMI	0,25	0,094	>32	0,016	0,38
	R/I/S		S	R	R	S	S	
	20/07/2018 99,90%	4	CMI	1	0,047	>32	0,016	0,25
	R/I/S		S	S	R	S	S	
	27/07/2018 DIA 99,90%	5	CMI	0,5	0,094	>32	0,023	0,38
	R/I/S		S	R	R	S	S	
	01/08/2018 JB 99,90%	6	CMI	0,5	0,094	>32	0,008	0,38
	R/I/S		S	R	R	S	S	
	10/08/2018 EDS 99,90%	7	CMI	0,5	0,064	>32	0,012	0,38
	R/I/S		S	R	R	S	S	
	20/08/2018 Tc 99,90%	8	CMI	0,5	0,032	>32	0,023	0,38
	R/I/S		S	S	R	S	S	
	20/08/2018 Tc* 99,90%	9	CMI	0,5	0,032	>32	0,023	0,38
	R/I/S		S	S	R	S	S	
	20/08/2018 Tc* 99,90%	10	CMI	0,5	0,032	>32	0,023	0,38
	R/I/S		S	S	R	S	S	



Levure	Vitek MS % identification	E-TEST		Amphotéricine	Casposfongine	fluorocytosine	Voriconazole	Fluconazole
		N° lot		S≤1 R>1	S≤0,002 R>2	5FC ≤0,12/0,25	S≤0,12 R>0,12	S≤2 R>4
<b>C. parapsilosis ATCC</b>	22/06/2018 99,90%	1	CMI	1	2	1,5	0,032	1
			R/I/S	S	I	R	S	S
	29/06/2018 99,90%	2	CMI	0,5	1,5	0,25	0,023	1,5
			R/I/S	S	I	R	S	S
	11/07/2018 99,90%	3	CMI	0,5	1	0,25	0,023	2
			R/I/S	S	I	R	S	S
	23/07/2018 99,90%	4	CMI	0,75	1,5	0,5	0,023	0,094
			R/I/S	S	I	R	S	S
	27/07/2018 DIA 99,90%	5	CMI	1	1,5	0,094	0,032	1,5
			R/I/S	S	I	S	S	S
01/08/2018 JB 99,90%	6	CMI	0,5	1,5	0,094	0,006	0,5	
		R/I/S	S	I	S	S	S	
10/08/2018 EDS 99,90%	7	CMI	0,38	0,75	0,094	0,023	1	
		R/I/S	S	I	S	S	S	
20/08/2018 TC 99,90%	8	CMI	0,75	0,5	0,19	0,032	1,5	
		R/I/S	S	I	S	S	S	
31/08/2018 TC* 99,90%	9	CMI	0,5	0,75	0,064	0,023	1	
		R/I/S	S	I	S	S	S	
31/08/2018 TC* 99,90%	10	CMI	0,5	0,75	0,064	0,023	1	
		R/I/S	S	I	S	S	S	

Seuil EUCAST : **AP S ≤ 1 R > 1**  
**CS S ≤ 0.002 R > 2**  
**VO S ≤ 0.12 < R**  
**FL S ≤ 2 R > 4**

Seuil CMI 50/ CMI 90 : **5FC 0,12/ 0.25**



Levure	Vitek MS % identification	E-TEST		Amphotéricine	Caspofongine	fluorocytosine	Voriconazole	Fluconazole	
		N° lot		S≤1 R>1	0,12/0,25	2/4	0,25/0,5	32/64	
<b><i>C. krusei</i> ATCC</b>	22/06/2018 99,90%	1	CMI		0,75	0,75	>32	0,125	>256
	R/I/S		S	R	R	S	R		
	29/06/2018 99,90%	2	CMI		0,5	0,75	>32	0,19	>256
	R/I/S		S	R	R	S	R		
	27/07/2018 JB 99,90%	3	CMI		0,5	0,75	>32	0,25	>256
	R/I/S		S	R	R	S	R		
	01/08/2018 JB 99,90%	4	CMI		0,5	0,38	>32	0,094	>256
	R/I/S		S	R	R	S	R		
	10/08/2018 EDS 99,90%	5	CMI		0,5	0,38	>32	0,25	>256
	R/I/S		S	R	R	S	R		
	20/08/2018 99,90%	6	CMI		0,75	0,38	>32	0,38	64
	R/I/S		S	R	R	S	R		
	31/08/2018* 99,90%	7	CMI		0,38	0,5	>32	0,38	>256
	R/I/S		S	R	R	S	R		
	31/08/2018* 99,90%	8	CMI		0,38	0,5	>32	0,38	>256
	R/I/S		S	R	R	S	R		
	07/09/2018 99,90%	9	CMI		0,38	0,5	>32	0,38	>256
	R/I/S		S	R	R	S	R		
	07/09/2018 99,90%	10	CMI		0,38	0,5	>32	0,38	>256
	R/I/S		S	R	R	S	R		

Seuil EUCAST : **AP S ≤ 1 R > 1**

Seuil CMI 50/ CMI 90 : **5FC 2 / 4**  
**CS 0.12/ 0.25**  
**VO 0.25/ 0.5**  
**FL 32/64**

ANNEXE VIII:

C. glabrata		E-TEST	Amphotericine Ss1 R>1	Caspofongine Ss 0,032 <R	Fluorocytosine SFC Ss 12/Ss 12 Fr	Vericonazole 0,25/L	Fluconazole 0,002 R>32 FL
rpmi lot 1520080	N° lot		1006291990	1006388140	1005847460	1005825660	1006157030
opérateur 70	1	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,016	0,094	4
	2	CMI R/V/S	X	0,125	0,016	0,094	4
	3	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,016	0,094	4
	4	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,016	0,094	4
	5	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,016	0,094	4
	6	CMI R/V/S	0,38	0,094	0,016	0,094	4
	7	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,016	0,094	4
	8	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,016	0,032	4
	9	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,016	0,032	4
	10	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,016	0,032	4
opérateur JB	1	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,012	0,094	6
	2	CMI R/V/S	X	0,125	0,012	0,094	6
	3	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,012	0,094	6
	4	CMI R/V/S	0,50	0,125	0,012	0,094	6
	5	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,012	0,094	6
	6	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,012	0,094	6
	7	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,012	0,064	4
	8	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,012	0,094	6
	9	CMI R/V/S	0,50	0,125	0,012	0,094	6
	10	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,012	0,094	6
opérateur UG	1	CMI R/V/S	0,38	0,094	0,012	0,094	4
	2	CMI R/V/S	Resistant	0,125	0,012	0,032	3
	3	CMI R/V/S	0,25	0,094	0,016	0,094	8
	4	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,012	0,125	6
	5	CMI R/V/S	0,75	0,125	0,016	0,38	8
	6	CMI R/V/S	0,50	0,094	0,016	0,125	6
	7	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,016	0,125	8
	8	CMI R/V/S	0,38	0,094	0,016	0,25	4
	9	CMI R/V/S	0,50	0,094	0,016	0,125	4
	10	CMI R/V/S	0,50	0,125	0,012	0,094	6
opérateur DIA	1	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,016	0,125	6
	2	CMI R/V/S	X	0,125	0,016	0,094	4
	3	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,016	0,094	6
	4	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,012	0,064	4
	5	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,016	0,125	6
	6	CMI R/V/S	0,25	0,125	0,012	0,094	4
	7	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,016	0,125	6
	8	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,012	0,094	4
	9	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,012	0,094	6
	10	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,012	0,032	6
opérateur JTB	1	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,012	0,125	4
	2	CMI R/V/S	R	0,125	0,012	0,094	6
	3	CMI R/V/S	0,25	0,125	0,016	0,064	6
	4	CMI R/V/S	0,50	0,125	0,012	0,064	6
	5	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,012	0,19	6
	6	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,012	0,094	6
	7	CMI R/V/S					
	8	CMI R/V/S					
	9	CMI R/V/S					
	10	CMI R/V/S	0,38	0,125	0,016	0,032	4

C. tropicalis		E-TEST	Amphotericine Ss 1 R>1	Caspofongine 0,03/0,06	Fluorocytosine Ss 12/Ss 32 FL	Vericonazole Ss 0,125 R>0,25	Fluconazole Ss 2 R>4 FL
rpmi lot 1520080	N° lot		1006291990	1006388140	1005847460	1005825660	1006157030
opérateur SMN	1	CMI R/V/S	0,75	0,125	32	0,016	0,25
	2	CMI R/V/S	0,75	0,125	32	0,016	0,25
	3	CMI R/V/S	0,38	0,125	32	0,016	0,19
	4	CMI R/V/S	0,38	0,094	32	0,016	0,25
	5	CMI R/V/S	0,75	0,094	32	0,016	0,19
	6	CMI R/V/S	0,75	0,064	32	0,016	0,25
	7	CMI R/V/S	0,75	0,094	32	0,016	0,25
	8	CMI R/V/S	0,94	0,094	32	0,016	0,25
	9	CMI R/V/S	0,38	0,094	32	0,012	0,38
	10	CMI R/V/S	0,75	0,064	32	0,016	0,25
opérateur JB	1	CMI R/V/S	0,38	0,125	>32	0,094	0,38
	2	CMI R/V/S	0,75	0,125	>32	0,023	0,25
	3	CMI R/V/S	0,50	0,064	>32	0,012	0,38
	4	CMI R/V/S	0,38	0,064	>32	0,016	0,19
	5	CMI R/V/S	0,75	0,064	>32	0,012	0,25
	6	CMI R/V/S	0,75	0,064	>32	0,012	0,25
	7	CMI R/V/S	0,75	0,064	>32	0,016	0,19
	8	CMI R/V/S	0,50	0,064	>32	0,012	0,25
	9	CMI R/V/S	0,50	0,125	>32	0,012	0,38
	10	CMI R/V/S	0,38	0,125	>32	0,012	0,25
opérateur UG	1	CMI R/V/S	0,50	0,094	>32	0,008	0,25
	2	CMI R/V/S	0,50	0,064	Resistant	0,023	0,25
	3	CMI R/V/S	0,50	0,094	Resistant	0,016	0,25
	4	CMI R/V/S	0,25	0,064	Resistant	0,008	0,25
	5	CMI R/V/S	0,94	0,094	Resistant	0,012	0,19
	6	CMI R/V/S	0,75	0,094	Resistant	0,012	0,25
	7	CMI R/V/S	0,75	0,094	Resistant	0,016	0,19
	8	CMI R/V/S	0,38	0,064	Resistant	0,012	0,19
	9	CMI R/V/S	0,38	0,064	Resistant	0,006	0,25
	10	CMI R/V/S	0,45	0,094	Resistant	0,016	0,25
opérateur DIA	1	CMI R/V/S	0,50	0,094	>32	0,012	0,25
	2	CMI R/V/S	0,75	0,094	>32	0,016	0,25
	3	CMI R/V/S	0,50	0,064	>32	0,012	0,25
	4	CMI R/V/S	0,25	0,064	>32	0,016	0,25
	5	CMI R/V/S	0,50	0,064	>32	0,016	0,25
	6	CMI R/V/S	0,50	0,064	>32	0,016	0,25
	7	CMI R/V/S	0,75	0,064	>32	0,016	0,25
	8	CMI R/V/S	0,50	0,094	>32	0,016	0,25
	9	CMI R/V/S	0,38	0,094	>32	0,016	0,25
	10	CMI R/V/S	0,50	0,094	>32	0,023	0,25
opérateur JTB	1	CMI R/V/S	0,50	0,125	>32	0,012	0,25
	2	CMI R/V/S	0,75	0,094	>32	0,023	0,25
	3	CMI R/V/S	0,50	0,064	>32	0,012	0,25
	4	CMI R/V/S					
	5	CMI R/V/S					
	6	CMI R/V/S					
	7	CMI R/V/S					
	8	CMI R/V/S					
	9	CMI R/V/S					
	10	CMI R/V/S	0,38	0,125	>32	0,012	0,25