



**COMITE QUALITE
(QUAMIC)
DE LA
SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE**

Recommandations 2014

Coordonnateur :

Patrice Laudat
Tours
Tél (33) (0)6 88 30 41 84
Email : plaudat@laboarnaud.fr
ou patrice.laudat@sfr.fr

Groupe de travail:

C. Auvray (Dijon), R. Baraduc (Clermont-Ferrand),
M. Baume (Lyon), A. Bouvet (Paris), F. Canis
(Valenciennes), C. Cattoen (Valenciennes),
S. Charachon (Nîmes), V. Cocquerelle (Strasbourg),
R. Courcol (Lille), C. de Champs (Reims),
M. de Montclos (Lyon), A. Doloy (Paris), C. Eloy (Troyes),
A. Ferroni (Paris), N. Fonsale (St-Etienne),
N. Hidri (Limoges), JL. Galinier (Toulouse),
F. Grobost (La Ferté Bernard), J. Izopet (Toulouse),
B. Jaulhac (Strasbourg), C. Kauffmann-Lacroix (Poitiers),
B. Lamy (Montpellier), P. Laudat (Tours),
C. Lawrence (Garches), C. Menard (Strasbourg),
C. Muller (Paris), P. Pischedda (Lille),
ME. Reverdy (Lyon), J. Ritter (Lyon),
CJ Soussy (Créteil), A. Tachet (Pau),
S. Tigaud (Lyon), F. Toubais (Paris)

PREFACE

Les exigences en matière de qualité pour la biologie médicale ont progressé depuis la mise en place du contrôle national de qualité en 1978 et la première version du Guide de bonne exécution des analyses en 1995.

L'ordonnance du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale et la Loi du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale impose au biologiste d'accréditer son activité selon la norme ISO 15189 dont l'échéance finale de mise en place est le 31 octobre 2020.

Dans ce contexte réglementaire, la Société Française de Microbiologie a voulu aider le biologiste dans sa démarche d'accréditation en lui proposant un référentiel spécifique à la microbiologie. Ce référentiel fixe le niveau d'exigences et de compétences requis pour son activité professionnelle dans les domaines pré-analytique, analytique et post-analytique. Les recommandations sont rédigées par un groupe de travail, QUAMIC, d'une trentaine de microbiologistes médicaux d'établissements publics ou privés, universitaires ou non. Le groupe de travail n'a pas souhaité que ces recommandations enferment le biologiste sans un rigorisme stérile et déshumanisant. La dérive vers la sur-qualité peut être vite atteinte.

La microbiologie médicale est fondamentalement différente des autres spécialités biologiques car elle s'intéresse au monde du vivant. Aussi elle ne peut être appréhendée en matière d'accréditation de la même manière que les autres disciplines, telles que la biochimie, pour les quelles les analyses visent à effectuer le dosage d'un substrat ou d'un constituant au sein d'un liquide biologique.

Il ressort que pour la microbiologie, à l'exception de la cytologie urinaire automatisée et de la détermination de la charge virale (en biologie moléculaire), nous ne disposons que de méthodes qualitatives car les notions de justesse, d'intervalle de mesure et d'incertitude sont difficiles, voire impossibles, à déterminer en fonction d'un facteur supplémentaire de variabilité qui n'existe pas dans les autres disciplines : un micro-organisme est vivant. En effet, ce dernier présente une variabilité multifactorielle imprévisible (espèce, souche, état métabolique, nature de l'échantillon, traitement antibiotique, par exemple). Il en résulte une incertitude sur le résultat dont l'estimation est en pratique impossible. Par ailleurs, les résultats de type « inférieur à » ou « supérieur à », très courants dans notre discipline et justifiés par l'absence d'intérêt clinique à étendre les domaines de mesure, sont des obstacles supplémentaires à la détermination de la justesse ou de l'incertitude.

L'analyse microbiologique ne peut être systématiquement encadrée par des contrôles internes de qualité fréquents et réguliers. La validation des méthodes en microbiologie se fait majoritairement sur un mode qualitatif, la maîtrise des risques repose essentiellement et avant tout sur l'habilitation, la gestion du contrôle de qualité se fait de manière adaptée.

Ces particularités et tous ces aspects ont été intégrés dans le document QUAMIC qui comporte un certain nombre de chapitre et de fiches ayant trait au pré-analytique, à l'analytique et au post-analytique. Ce document ne saurait être exhaustif. L'objectif est de fournir aux microbiologistes des éléments de référence et des exemples concernant la manière de gérer le contrôle de qualité ou d'élaborer un dossier de validation de méthode ou encore l'implication en matière de prestation de conseils afin que chacun puisse développer une démarche qualité efficiente, durable, adaptée, sans entrer dans le piège de l'excès et de la sur-qualité.

Ce document est appelé à vivre et à évoluer dans le temps, il sera donc régulièrement revu au fil des évolutions des exigences, de l'évolution des techniques et des besoins. Il sera également enrichi de chapitres concernant plus spécifiquement la virologie et la mycologie. Les auteurs espèrent ainsi contribuer à répondre aux attentes des microbiologistes mais également à celles des évaluateurs COFRAC.

Autant soumettre le travail médical à l'introspection est enrichissant, autant l'abandonner dans les mains des seuls évaluateurs et à l'aune de normes est dangereux pour l'avenir de la biologie médicale.

La médecine reste un art qui se fonde, de plus en plus, sur des données scientifiques. Son exercice requiert une part de créativité et d'initiatives pour des situations inédites mais nécessitant une prise de décisions qui échapperont toujours à une procédure écrite, fut-elle la plus complète.

© Copyright 2014 - **Société Française de Microbiologie**

Tous droits de traduction, d'adaptation et de reproduction par tous procédés réservés pour tous pays. Toute reproduction ou représentation intégrale ou partielle par quelque procédé que ce soit de ce document, faite sans autorisation expresse et écrite du Comité de qualité (QUAMIC) de la Société Française de Microbiologie (28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15) est illicite et constitue une contrefaçon. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage du copiste et non-destinées à une utilisation collective, et d'autre part, les courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées (art. L. 122-4, L. 122-5 et L. 335-2 du Code de la propriété intellectuelle).

SOMMAIRE

A. PRE-ANALYTIQUE	5
<i>A venir</i>	
B. ANALYTIQUE	8
1. CONTROLE INTERNE DE LA QUALITE DE L'ANTIBIOGRAMME	10
2. CONTRÔLE INTERNE DE QUALITÉ EN BACTÉRIOLOGIE (CIQ) (HORS ANTIBIOGRAMME, BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET SÉROLOGIE INFECTIEUSE).	18
3. CONTROLE EXTERNE DE LA QUALITE EN BACTERIOLOGIE MEDICALE (METHODES CONVENTIONNELLES)	22
4. HÉMOCULTURE ET ACCRÉDITATION	27
5. EXAMEN CYTOBACTÉRIOLOGIQUE DES URINES (ECBU) ET ACCRÉDITATION	39
6. ANTIBIOGRAMME : NORME NF EN ISO 15189, VALIDATION DE MÉTHODE ET TYPE DE MÉTHODE	55
7. ETUDE QUALITATIVE DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES: ANTIBIOGRAMME AUTOMATISE EN MILIEU LIQUIDE	62
8. VERIFICATION D'UNE METHODE QUALITATIVE DE PCR EN TEMPS REEL BACTERIENNE	69
9. IDENTIFICATION BACTERIENNE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	79
10. EXAMEN MICROBIOLOGIQUE DES SELLES	85
11. EXAMEN MICROBIOLOGIQUE DU LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN (LCR)	97
12. EXAMEN MICROSCOPIQUE DIRECT : (NUMÉRATION CELLULAIRE ET RECHERCHE DE MICROORGANISMES DANS UN LIQUIDE BIOLOGIQUE AVANT COLORATION)	104
13. ENSEMENCEMENT, CULTURE ET RECONNAISSANCE DES COLONIES	113
14. ANTIBIOGRAMME PAR LA METHODE DE DIFFUSION	122
15. DETECTION QUALITATIVE D 'ADN OU D 'ARN VIRAL PAR PCR TEMPS REEL	131
16. DETECTION QUANTITATIVE DE GENOMES VIRAUX PAR PCR EN TEMPS REEL (CHARGES VIRALES)	137
C. POST-ANALYTIQUE	148
1. LA PRESTATION DE CONSEILS EN MICROBIOLOGIE	150

A. PRE-ANALYTIQUE

Post-analytique

Analytique

Pré-analytique

A VENIR

Pré-analytique

Analytique

Post-analytique

A VENIR

B. ANALYTIQUE

Pré-analytique

Analytique

Post-analytique

1. CONTROLE INTERNE DE LA QUALITE DE L'ANTIBIOGRAMME

1.1. CONTEXTE GENERAL : LES METHODES DE DETERMINATION DE LA SENSIBILITE DES BACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES OU ANTIBIOGRAMME

La sensibilité des bactéries aux antibiotiques peut être mesurée par diverses méthodes. La méthode de référence est la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les méthodes d'antibiogramme utilisées en routine, qu'elles soient automatisées ou non doivent être corrélées avec cette méthode.

La détermination de la CMI peut être effectuée par microdilution en milieu liquide ou dilution en agar. Les deux techniques sont détaillées dans le document du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Cependant, il a été récemment établi que la méthode internationale de référence était la microdilution (Norme ISO 20776-1) pour les bactéries non exigeantes à croissance rapide. Cette méthode est la méthode de référence vis-à-vis de laquelle toutes les autres méthodes testant la sensibilité des bactéries non exigeantes doivent être comparées (Norme ISO 20776-2). Cette méthode est reprise dans les recommandations Nord-Américaines du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) et du CA-SFM qui est appliqué à la situation locale (critères de sensibilité adaptés aux molécules commercialisées et aux doses en usage).

Les bactéries exigeantes requièrent des conditions particulières qui sont précisées dans le communiqué du CA-SFM, de l'EUCAST et/ou du CLSI.

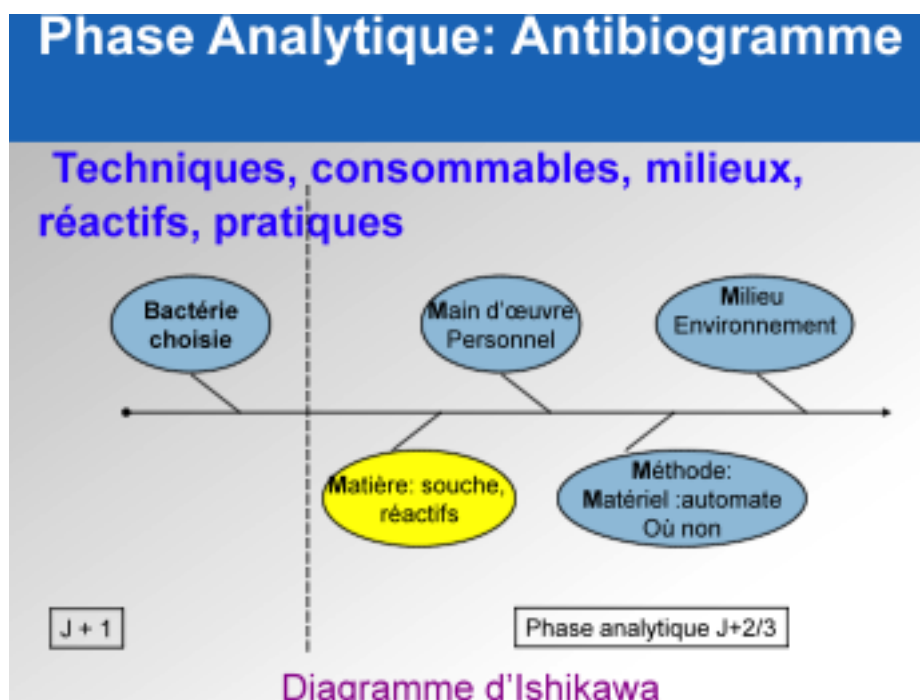
De plus, certains tests doivent parfois être réalisés en supplément, comme la détection de bêta-lactamase, par exemple.

1.2. PROCESSUS ANALYTIQUE DE L'ANTIBIOGRAMME - EXPLICATIONS

Les manipulations qui sont réalisées au laboratoire donnent des résultats qui peuvent ne pas être absolument identiques, puisqu'il existe une incertitude liée au caractère aléatoire des variations observées lorsque l'on répète une mesure, particulièrement en bactériologie où l'un des acteurs est un micro-organisme vivant.

Les diverses sources de variabilité peuvent être résumés sur le diagramme de causes et d'effets d'Ishikawa connu aussi sous le nom d'arbre des causes.

Les causes sont réparties dans les 5 catégories appelées **5M** :



- 1 - Matières : milieu de culture, réactifs, souches de contrôle, consommables par exemple.
- 2 - Matériel : équipement, température des étuves, automate, logiciel, technologie, réglage, maintenance par exemple.
- 3 - Méthode : mode opératoire, contrôle d'étalonnage, appareil ou méthode utilisés hors domaine de validité
- 4 - Main d'œuvre : le personnel, compétence, formation, erreurs de manipulation ou de saisie, de lecture, de mesure, nettoyage inadapté ou insuffisant par exemple.
- 5 - Milieu : l'environnement, la température ambiante, les vibrations, la propreté par exemple.

Toutes ces causes ont un effet sur le résultat. Il convient donc d'en assurer la maîtrise par la qualité.

-du matériel adapté : lecteur optique pour inoculum au standard McFarland vérifié, pH mesuré des milieux, automate validé et marquage CE IVD, par exemple

-un suivi métrologique du matériel : le matériel doit être contrôlé, ajusté, étalonné, avoir une liste des appareils concernés et créer une fiche de vie par exemple

-un environnement sous contrôle : séparation des zones de travail, pièces, PSM, système électrique régulé, climatisation, si nécessaire.

1. 3. LES METHODES D'ANTIBIOGRAMMES PRATIQUES EN LBM:

Il peut s'agir :

- **de méthodes manuelles** comme la diffusion en gélose : le CA-SFM publie chaque année des recommandations qui indiquent les conditions techniques de réalisation, les charges des disques à utiliser, les diamètres critiques, éventuellement les techniques complémentaires et les règles de lecture interprétatives. Les résultats sont rendus en catégorisation clinique et/ou en diamètre d'inhibition. La lecture peut être manuelle (mesure du diamètre avec outil approprié comme le pied à coulisse) ou optique (maintenance) avec possibilité de conserver les images (traçabilité assurée).
- **de méthodes semi-automatisées** : il existe 3 systèmes majeurs d'automates commercialisés utilisant des techniques en milieu liquide avec lecture spectrophotométrique ou turbidimétrique de micropuits contenant les concentrations des différents antibiotiques et un témoin de culture.

Les concentrations doivent être en concordances avec les recommandations du CA-SFM ou, à tout le moins, à celle de l'EUCAST. Les résultats produits sont des CMI (mg/L) et/ou des catégorisations cliniques.

- **le plus souvent dans un même laboratoire**, les deux méthodes se pratiquent avec, de plus, des tests complémentaires comme : la recherche de bêta-lactamase, la méthode de gradient en gélose, par exemple.

1. 4. TYPES DE METHODES ANALYTIQUES:

1.4.1. MÉTHODES QUANTITATIVES

Elles fournissent un résultat chiffré sur une échelle continue, dont les limites sont connues en relation directe avec l'activité recherchées. Il s'agit, par exemple, de la méthode internationale de référence : CMI en microdilution qui n'est pas utilisée ni adaptée à la pratique en LBM.

1.4.2. MÉTHODES QUALITATIVES

1.4.2.1. Antibiogramme standard

Il s'agit de méthodes assimilées à des méthodes qualitatives. Elles fournissent un résultat qualitatif (S,I,R) à partir d'une donnée quantifiable (lecture spectrophotométrique de micropuits ou métrique d'un diamètre d'inhibition).

1.4.2.2. Tests complémentaires

Ils fournissent une information de type présence/absence (recherche de bêta-lactamase, expression d'une PLP2a, par exemple), ou, éventuellement, sur une présence supérieure à un témoin.

1. 5. CONTROLE INTERNE DE QUALITE (CIQ)

Pour assurer la qualité des procédures analytiques et des résultats le laboratoire doit avoir recours au CIQ. Pour cela, il devra disposer des souches de référence appropriées et conservées de manière convenable ([voir Annexe 1: conservation des souches de référence](#)).

L'antibiogramme est un test quotidien dont les résultats peuvent conditionner la qualité du traitement du patient. Un contrôle de qualité est donc nécessaire pour chacune des techniques utilisées au laboratoire.

1.5.1. INOCULUM

Selon la méthode utilisée pour réaliser l'inoculum bactérien, il convient d'en maîtriser les points critiques.

Que la méthode soit automatisée ou manuelle, il convient de porter une attention particulière aux conditions de réalisation de l'inoculum et suivre les instructions des fournisseurs et du CA-SFM.

Il est conseillé de vérifier par méthode microbiologique quantitative d'éluion (dénombrement bactérien) la qualité de celui-ci.

1.5.2. MILIEUX ET CONSOMMABLES

Les recommandations générales à propos du contrôle des milieux sont traitées dans le document CIQ. Cependant, concernant la pratique de l'antibiogramme par diffusion le CA-SFM, en cours de validité, précise, en fonction des bactéries, les types de gélose et les

conditions techniques à respecter.

Le respect de ces conditions techniques conditionne la validité du CIQ.

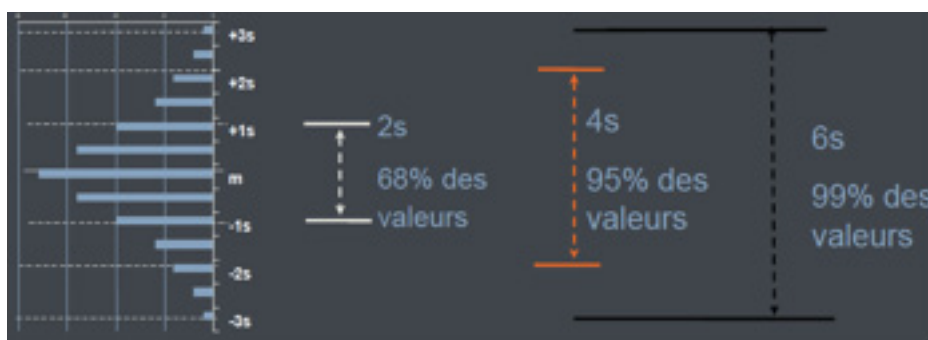
Pour les automates des plaques réactives correspondant aux principaux groupes bactériens à croissance rapide sont disponibles. Il convient de faire le bon choix et de respecter les consignes des fabricants.

Pour les autres techniques il convient de pratiquer aussi de respecter les consignes du fabricant.

1.5.3. CHOIX DES SOUCHES

1.5.3.1. Méthode par diffusion en gélose

Le CA-SFM recommande certaines souches de référence. Les limites acceptables des diamètres d'inhibition figurent dans le communiqué annuel (1).



Le document du CA-SFM précise que les domaines d'acceptabilité présentés dans le Tableau II A correspondent à la moyenne (m) \pm 1 écart-type (σ), établis à partir d'un échantillon de 400 mesures. Cette définition du domaine d'acceptabilité est, d'un point de vue statistique, étonnant. En effet, en supposant la population normale, ce qui est généralement le cas avec 400 observations, 68 % des valeurs observées sont comprises dans l'intervalle $m \pm 1\sigma$, 95 % dans l'intervalle $m \pm 2\sigma$ et 99 % dans l'intervalle $m \pm 3\sigma$.

Il est consensuel, en biologie médicale comme ailleurs, d'adopter comme domaine d'acceptabilité l'intervalle $m \pm 2\sigma$ (plus rarement $m \pm 3\sigma$) (biochimie, hématologie, par exemple.) puisque la démarche de CQI consiste à déterminer si la nième mesure appartient ou non à la population « normale » ou attendue. Dans cette optique, il n'y a pas lieu d'être trop restrictif, sous peine de rejeter 32 % des points qui appartiennent pourtant réellement à la population « normale ». De ce point de vue, les règles Westgard intègrent dans l'algorithme décisionnel un ou deux écart-types.

1.5.3.2. Pour les automates

Les fabricants proposent un choix de souches de contrôle ainsi que le mode opératoire correspondant avec les critères d'acceptabilité.

1.5.3.3. Pour les autres techniques

Il s'agit des tests unitaires, par exemple. Il convient de se référer aux recommandations des fabricants.

En plus des souches référencées pour le CIQ, très sensibles aux antibiotiques, il est souhaitable d'ajouter des souches possédant certains mécanismes de résistances

représentatifs de l'écologie ou ayant un impact important sur la prise en charge (SARM, EBLSE, EPC, ERV, par exemple) et convenablement conservées.

1.5.4. TRAÇABILITÉ DES MILIEUX ET RÉACTIFS

Ceci est particulièrement aigue avec la méthode de diffusion qui exige un suivi des lots des milieux de culture mais surtout des différentes cartouches d'antibiotiques avec des péremptions très courtes.

La solution est de limiter le nombre de choix de profils et de changer à date fixe (à déterminer en fonction de l'activité). Rappelons qu'un CIQ doit être réalisé à chaque changement de lot de réactif, ici donc le numéro de lot de cartouche.

Pour les méthodes automatisées, il suffit de suivre un nombre limité de lot de plaques réactives. Cela est beaucoup plus aisé, d'autant que l'intégration des données est ou sera prévue dans les automates.

1.5.5. PÉRIODICITÉ DU CIQ

Elle est à fixer par le biologiste selon son activité. Le CIQ doit être réalisé à chaque changement de lot de réactif et à chaque grosse opération de maintenance ou après résolution d'une panne machine. Un contrôle toutes les 2 semaines paraît souhaitable et, au minimum, une fois par mois.

Il peut être décidé en fonction du délai de conservation des souches d'origine clinique en vigueur au sein du LBM, permettant ainsi de réaliser les vérifications jugées nécessaires en cas d'écart constaté.

1.5.6. EXPLOITATION DES RÉSULTATS DU CIQ

Il est informatif d'effectuer des calculs de moyenne et d'écart-type sur les données successives (diagramme de Levey-Jenning) qui permettent d'analyser quantitativement la distribution des résultats.

Les résultats font l'objet d'une exploitation appropriée par le laboratoire en fonction des spécifications annoncées par le fournisseur, des performances réelles de la méthode, des recommandations des sociétés savantes.

En cas d'utilisation de plusieurs automates ou de plusieurs techniques les résultats doivent être cohérents, sinon les causes des discordances doivent être recherchées (5M) et le cas échéant des actions correctives conduites.

Des seuils d'alarme et d'action sont à définir, avec une conduite à tenir en cas d'écart sur un contrôle. Une analyse évalue les résultats rendus depuis le précédent CIQ conforme. Pour cela il est possible de hiérarchiser les discordances ([Annexe 2](#)) après catégorisation de la variable: dm, DM ou DTM et de mesurer l'impact en fonction des molécules sur la prise en charge du patient. Des actions correctives peuvent s'avérer indispensables : par exemple, en cas de défaut de détection d'un mécanisme de résistance (mécicilline, EBLSE).

Les résultats des CIQ validés par le biologiste sont conservés et tracés idéalement dans l'automate ou dans l'informatique centrale.

1. 6. CONCLUSION

La mise en place de la Norme NF EN ISO 15 189 est le lien indispensable pour réunir deux

disciplines :

- la qualité, qui n'est pas une science
- la microbiologie, science du monde vivant.

En pratique quotidienne, le biologiste suivra la qualité analytique des antibiogrammes réalisés sur les souches de patients en confrontant les résultats de l'identification bactérienne et la détection des résistances naturelles, ce qui peut constituer une première alerte et l'inciter à augmenter la fréquence du CIQ ou à modifier ses techniques, d'identification et/ou d'antibiogramme.

REFERENCES

1. Communiqué du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2013. www.sfm-microbiologie.org
2. International Organisation for Standardization (ISO). ISO 20776-1 et ISO 20776-2. Geneva.
3. The European disk diffusion test. 2009. www.eucast.org
4. Guides techniques d'accréditation et documents du COFRAC, section santé humaine (SH). SH REF 02 .SH GTA 04 Guide de validation des méthodes en biologie humaine. LAB GTA 06 Les contrôles de la qualité. Guide technique d'accréditation en biologie médicale SH GTA 01. www.cofrac.fr
5. Norme NF ISO 15189 : 2007. Laboratoires d'analyse de biologie médicale-exigences particulières concernant la qualité et la compétence. AFNOR. www.afnor.org
6. REMIC, Référentiel en microbiologie médicale, 4ème édition 2010, Société Française de Microbiologie. www.sfm-microbiologie.org
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters ; Approved Guideline –Third edition. CLSI document M23-A3. CLSI, 2008, Wayne, PA.

LITTERATURE

1. Courvalin P., Golstein F., Quentin C., Flandrois J-P., Philippon A., Sirot J. L'antibiogramme automatisé. 1988, Vigot, Paris.
2. Courvalin P., Golstein F., Philippon A., Sirot J. L'antibiogramme. 1985, MPC-Vidéom, Paris.
3. Sirot J, Courvalin P, Soussy C-J. Definition and determination of in vitro antibiotic susceptibility breakpoints for bacteria. Clin Microbiol. Infect., 1996; Suppl 1: S5-S25.

ANNEXE 1

Conservation des souches de référence en vue du CIQ Antibiogramme.

Choix des souches de référence

Les souches sont celles recommandées en fonction des techniques d'antibiogramme utilisées.

Pour la technique par diffusion, la liste est proposée par le CA-SFM et l'EUCAST (1,2).

Pour les autres techniques elles sont déterminées par les fabricants des automates.

Il s'agit de souches pour la plupart sensibles qui peuvent être complétées par des souches exprimant des phénotypes de résistances définis pour confirmer la capacité à détecter les mécanismes de résistance.

Origines des souches

Il s'agit de souches issues des collections bactériennes (ATCC, CIP, par exemple) que l'on doit se procurer auprès d'organismes ou de fabricants garantissant (certificat) l'origine des souches (3).

Les souches d'origine clinique ou conservées à l'occasion des CEQ, par exemple, offrent moins de garantie.

Gestion des souches

Les souches de collection doivent être repiquées sur milieu adapté afin de constituer la culture stock qui servira à réaliser les cultures de référence (3) qui seront conservées congelées en milieu protecteur, soit sous forme de tube individuel, soit sous forme de billes ou perles.

Il convient de prévoir un nombre adapté de tubes de référence en fonction de la périodicité retenue pour les contrôles et des contrôles supplémentaires souvent nécessaires. Un tube décongelé ne peut servir qu'une fois pour une série de contrôle.

Conservation des souches

Conserver les tubes de référence congelé, la température idéale est $<-70^{\circ}\text{C}$. Une température $\leq -20^{\circ}\text{C}$ est nécessaire.

Culture en vue du contrôle

Il est nécessaire de prévoir au minimum 2 subcultures avec plusieurs colonies (minimum 3) pour assurer la stabilité des cultures des souches de référence. Il convient de vérifier la pureté de la souche avant de réaliser les contrôles.

Contrôles

Les souches de référence sont techniquées comme des souches d'origine cliniques

REFERENCES

1. Communiqué du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2011. www.sfm-microbiologie.org
2. The European disk diffusion test. 2009. www.eucast.org
3. Norme Afnor NF T90-461. 2001, Microbiologie, contrôle de qualité des milieux de culture. www.afnor.org

ANNEXE 2
Définition des types de discordances et leur hiérarchisation

Type de discordance	libellé	définition	Terme anglo-saxon correspondant
DM	Discordance majeure	Résultat trouvé Résistant (R) alors que la souche est en réalité Sensible (S). Ce type de résultat correspond à une perte de chance pour le patient puisque le résultat conduit à ne pas proposer un traitement efficace dont il aurait pu bénéficier, mais il n'expose pas le patient à risque d'échec thérapeutique	Major error (ME)
DTM	Discordance Très Majeure	Résultat trouvé Sensible (S) alors que la souche est en réalité Résistante (R). Ce type d'erreur est dit très majeur car exposant le patient à un risque important d'échec thérapeutique	Very Major Error (VME)
dm	Discordance mineure	Souche résistante ou sensible répondue à tort intermédiaire OU souche intermédiaire répondue à tort Résistante ou Sensible. Cette catégorie regroupe des types de discordances hétérogènes et sont en partie liée à l'incertitude & variation de la méthode	Minor Error (mE)

1. Courvalin P., Golstein F., Quentin C., Flandrois J-P., Philippon A., Sirot J. L'antibiogramme automatisé. 1988, Vigot, Paris.

2. CONTRÔLE INTERNE DE QUALITÉ EN BACTÉRIOLOGIE (CIQ) (HORS ANTILOGRAMME, BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET SÉROLOGIE INFECTIEUSE).

2. 1. INTRODUCTION

Le contrôle interne de qualité (CIQ), comme d'ailleurs le contrôle externe, fait partie des outils de l'assurance qualité. Ils s'inscrivent dans une démarche d'amélioration des pratiques de laboratoire. Ils permettent de vérifier la fiabilité et la reproductibilité des résultats d'analyses du laboratoire.

Les contrôles relèvent de la responsabilité du biologiste qui peut s'appuyer sur les recommandations des sociétés savantes comme la Société Française de Microbiologie (SFM)(3), mais aussi des fournisseurs.

Les contrôles doivent être instaurés à chaque étape du processus analytique et le laboratoire de biologie médicale (LBM) doit disposer d'un programme de CIQ en fonction de ses besoins. D'un point de vue plus théorique on peut concevoir le contrôle de qualité sous deux aspects :

- le premier consiste à évaluer le résultat final d'une analyse en introduisant un échantillon à la phase pré-analytique et en analysant le résultat obtenu à la fin de l'analyse.
- le second est d'introduire des contrôles à certaines étapes critiques du mode opératoire susceptible d'influencer les résultats.

Ce deuxième aspect est nécessaire car il est parfois difficile en bactériologie, du fait de l'instabilité des échantillons, de les réanalyser pour vérifier la reproductibilité des résultats obtenus, contrairement à d'autres disciplines biologiques.

Selon le document SH GTA 01 « il appartient au laboratoire de définir ses propres tolérances-bornes-pour chaque contrôle mis en œuvre, en adéquation avec les performances analytiques du laboratoire »(1). Ces contrôles doivent faire l'objet d'une restitution régulière aux membres du personnel mais aussi lors de la revue de direction (2).

De plus, dans la mesure où le contrôle interne de qualité constitue également un contrôle de la pratique du laboratoire, ces contrôles internes permettront également de détecter d'éventuelles variations liées aux pratiques, technicien dépendantes.

2. 2. PÉRIMÈTRE DU DOCUMENT

Ce chapitre est consacré au CIQ hors antibiogramme, biologie moléculaire et sérologie infectieuse qui font l'objet de chapitres dédiés. La politique du CIQ dépendra du type de résultats cyto-bactériologiques, qui comporte schématiquement 4 types de réponse :

- 1). l'observation et parfois le dénombrement de certains types de cellules humaines (leucocytes, hématies par exemple)
- 2). la détection de la présence d'un micro-organisme à l'examen microscopique direct et/ou par culture ou par détection d'un antigène de structure
- 3). l'identification d'un micro organisme
- 4). l'estimation quantitative du micro-organisme.

Les points traités dans ce document concerneront la détection, l'identification et l'estimation quantitative des micro-organismes par des méthodes autres que la biologie moléculaire. De façon parallèle, les analyses sur d'autres paramètres peuvent être conduites comme le dénombrement d'éléments cellulaires ou non (leucocytes, hématies, cristaux ...) et la caractérisation de ces éléments (proportion des différents types cellulaires observés,

polynucléaires, monocytes, lymphocytes, cellules épithéliales ...).

- La détection, l'identification des microorganismes ainsi que les tests immunologiques sont des méthodes qualitatives.
- Le dénombrement bactérien est assimilé à une méthode qualitative, la notion de méthode semi quantitative n'étant plus admise. Dans le domaine de la bactériologie ne sont conservées comme « quantitatives » que les méthodes de numération de cellules humaines par des automates.

2. 3. CYTOLOGIE URINAIRE AUTOMATISÉE :

Seule technique en bactériologie retenue comme quantitative, elle fait appel à la cytométrie de flux ou à l'imagerie sur un appareillage spécifique. Pour en vérifier le bon fonctionnement, un CIQ permet d'encadrer les séries analytiques. Il convient de respecter les recommandations des fournisseurs.

Il est souhaitable de mettre en place une comparaison avec le comptage au microscope selon un plan d'échantillon prédéfini ce qui permet de disposer d'une méthode dégradée éprouvée et de maintenir la compétence et l'habilitation des techniciens.

2. 4. EXAMEN MICROSCOPIQUE, COLORANTS ET COLORATIONS :

Il s'agit souvent de la première étape de détection d'un microorganisme dans le produit pathologique (LCR, urine, pus, par exemple) ou la primo-culture (flacon d'hémoculture, bouillon de culture). Il porte en général sur l'analyse microbiologique et cytologique qualitative au moyen d'un état frais et/ou d'une coloration : coloration de Gram, de Ziehl-Neelsen par exemple pour les bactéries et de May-Grunwald-Giemsa pour la cytologie.

Le CIQ vise à vérifier les performances des colorants utilisés (produits industriels ou « fait maison ») et des méthodes de coloration (automate ou manuelle) en usage au laboratoire. Il convient pour cela de disposer de souches tests à analyser dans les conditions habituelles, d'apprécier la qualité du résultat et d'en conserver la trace en fonction des numéros de lots utilisés.

La démarche est complétée par la vérification quotidienne de cohérence entre examen microscopique direct des produits pathologiques comparé aux résultats des cultures (Gram sur hémoculture, Ziehl-Neelsen sur expectoration par exemple). Cette étape peut être réalisée lors de la validation du dossier.

2. 5. CULTURE ET MILIEUX DE CULTURE :

Le CIQ des cultures et milieux de culture comportent plusieurs approches selon l'origine du milieu et l'analyse réalisée : milieux préparés (coulés) sur place, milieux produits industriellement (prêts à l'emploi), milieux pour dénombrement bactérien, milieux de pré-identification chromogènes, milieux d'hémocultures et de cultures en milieu liquide introduits dans les automates.

Les recommandations concernant les milieux de culture seront traitées dans un document dédié.

2. 6. IDENTIFICATION : RÉACTIFS, PRODUITS, MÉTHODES

Une confrontation est effectuée en routine lors de la validation entre le résultat de l'identification et celui de l'antibiogramme. Dans le cadre de l'accréditation, il convient de renforcer la démarche et de mettre en place des contrôles internes réguliers concernant l'identification. Ils viennent en complément des CEQ disponibles dans ce domaine. L'analyse de risque

dans chaque laboratoire doit conduire à la mise en place de CIQ adapté.

La difficulté réside dans le choix des souches à identifier. Le biologiste pourra s'orienter vers des souches de référence des espèces bactériennes les plus fréquemment détectées au laboratoire. Le but est de s'assurer de la pérennité des techniques choisies. On choisira des souches de collection identifiées phénotypiquement ou génotypiquement parmi celles qui auront été sélectionnées lors de la validation de méthode.

- *Méthodes reposant sur les caractères métaboliques* : on gardera à l'esprit que l'erreur d'orientation au départ dans le choix des galeries constitue une cause d'erreur d'identification en méthode manuelle comme automatisée. Le CIQ ne devra pas se borner à être un simple CIQ de galerie bien choisie, mais comporter également l'étape du choix des tests. Il s'agit en fait du contrôle de l'ensemble du processus d'identification qui fait aussi intervenir la compétence des intervenants.
- *Agglutination, trousse réactives* : les réactifs du commerce comprennent en principe un témoin positif et un témoin négatif. Le contrôle de qualité interne avec souches tests peut être mis en place à l'initiative du biologiste.
- *MALDI-TOF* :) en routine, un contrôle interne et un contrôle à blanc par plaque d'identification est préconisé (Bacterial Test Standard). Ces contrôles sont assimilables à des contrôles internes à condition d'inclure une variété d'espèces en rapport avec la distribution des espèces isolées au laboratoire.

2. 7. TESTS IMMUNOLOGIQUES:

Les tests immunologiques (antigénurie pneumocoque, légionelle par exemple) comportent des témoins de réactivité (migration) fournis par le fabricant à défaut de CIQ disponible. Il est recommandé aux biologistes de se procurer des CIQ lorsqu'ils existent : contrôle négatif, contrôles positifs dont au moins un contrôle positif faible compte tenu de la subjectivité de la lecture.

2. 8. FRÉQUENCES DES CONTRÔLES INTERNES :

- En dehors de ceux imposés par les changements de lots et l'intervention sur automate, la fréquence sera déterminée en fonction de l'analyse de risque et l'impact d'une erreur sur des résultats qui auraient déjà été rendus. Si l'impact est important, la fréquence dépendra du nombre d'analyses traitées entre deux passages de CIQ, ce qui définit la série et dont le volume est propre à chaque LBM.
- Il est préconisé au minimum en parallèle du CIQ antibiogramme. Dans ce cadre, le choix des souches retenues pour le CIQ devra être pertinent (souche évaluant un test important mais fragile au sein d'une galerie par exemple).

Dans certaines recommandations (LAB GTA 06 en cours de révision)(1)., cette fréquence ne devrait pas être inférieure à deux contrôles mensuels même s'il n'y a pas de recommandations formelles

2. 9. PROGRAMME DE CONTRÔLE DE QUALITÉ, EXPLOITATION :

Le CIQ permet le suivi du processus analytique et donc la validation analytique. Il doit faire l'objet d'un programme détaillé (tableau I), d'un traitement sans délai des résultats de CIQ et d'une synthèse et exploitation régulière(6). Une synthèse mensuelle est recommandée. En cas de résultats non-conformes, la conduite à tenir doit être définie dans la procédure de gestion des CQ, en particulier pour ce qui concerne l'analyse d'impact sur les résultats antérieurs. Une analyse synthétique des résultats du CIQ peut permettre de construire un indicateur, cet indicateur de performance est susceptible d'apporter la preuve de la pleine

maitrise des techniques qu'il s'agisse des méthodes manuelles ou automatisées. Enfin, il est essentiel de restituer le bilan du CIQ auprès des équipes techniques.

REFERENCES

1. Guides techniques d'accréditation et documents du COFRAC, section santé humaine (SH). SH REF 02 .SH GTA 04 Guide de validation des méthodes en biologie humaine. LAB GTA 06 Les contrôles de la qualité. Guide technique d'accréditation en biologie médicale SH GTA 01. www.cofrac.fr
2. Norme NF ISO 15189 : 2007. Laboratoires d'analyse de biologie médicale-exigences particulières concernant la qualité et la compétence. AFNOR. www.afnor.org
3. REMIC, Référentiel en microbiologie médicale, 4ème édition 2010, Société Française de Microbiologie. www.sfm-microbiologie.org
4. Norme NF T90-461, AFNOR, Microbiologie, contrôle qualité des milieux de culture.
5. Gravet A., Camdessouens-Miehé G., Application de la spectrométrie de masse à la microbiologie. Rev. Fr. Labo., 2011, 435, 55-64.
6. Klein J-P. Utilisation et exploitation des contrôles de qualité en bactériologie. Rev. Fr. Labo., 2011, 190, 54-64.

Tableau I : Exemple de programme du contrôle interne de qualité en bactériologie (hors antibiogramme, biologie moléculaire et sérologie infectieuse).

Types de contrôles	Périodicité -exemple	Modalités pratiques
Cytologies urinaires manuelles	Mensuelle	Double lecture
Automate de cytologie urinaire	Quotidien	Automate
Comparaison cytologie manuelle et automate	Mensuelle	Tableau comparatif
Réactifs généraux	Mensuelle	Oxydase, catalase, souches tests
Colorations : Gram, Ziehl-Neelsen	Mensuelle + Nouveau lot	Souches tests
Trousses réactives	Nouveau lot	Souches tests
Milieux de culture	Si fabriqué sur place	Souches tests + stérilité
Identification trousses	Mensuelle + Nouveau lot	Souches tests
Identification automates	Mensuelle + Nouveau lot + Intervention sur automate	Souches tests

3. CONTROLE EXTERNE DE LA QUALITE EN BACTERIOLOGIE MEDICALE (METHODES CONVENTIONNELLES)

3. 1. DEFINITIONS, CONTEXTE, SITUATION DU PROBLEME

L'évaluation externe de la qualité (EEQ) ou comparaison inter-laboratoire a pour objectif d'évaluer la validité des résultats produits dans un laboratoire de biologie médicale. Elle repose sur l'analyse de matériaux de contrôles externes de qualité (CEQ) proposés par des organismes organisateurs de comparaison inter-laboratoire (OCIL). Le laboratoire évalué, préalablement anonymisé, traite le matériau sans qu'il en connaisse le résultat *a priori* (traitement « en aveugle »). Afin d'être efficace, l'EEQ doit (i) être régulière, (ii) porter sur des points critiques de la méthode évaluée et (iii) être associée à une exploitation régulière et non différée des résultats.

Comparé aux autres disciplines de la Biologie médicale, la bactériologie médicale comporte un niveau de complexité supplémentaire liée au fait que les bactéries sont des populations d'êtres vivants. C'est pourquoi l'EEQ a été pendant longtemps très réduite en Bactériologie médicale. Bien que dorénavant techniquement possible¹, l'offre porte rarement sur tous les points critiques d'une méthode de Bactériologie médicale. L'offre est à ce jour insuffisante car de nombreux matériaux de CEQ restent indisponibles sur le marché et ne permet donc pas de contrôler l'ensemble des points critiques d'une méthode.

En 2011, les programmes français proposés par les OCIL ont porté principalement sur les identifications et les antibiogrammes de souches pures dans un contexte clinique spécifié. Le point critique « cytologie » ne bénéficie d'EEQ en France qu'à compter de 2012 avec une offre limitée. L'analyse du point critique « examen microscopique » sous forme de lame reste restreinte. Le contrôle de l'étape post-analytique et de l'interprétation (hors antibiogramme) existe parfois sous forme de QCM mais ils ne peuvent pas toujours être reliés à l'objet de l'essai de l'EEQ. Au niveau international, certains OCIL proposent des échantillons simulant un échantillon clinique.

La norme 15189 recommande que les EEQ « *fournissent dans la mesure du possible des échantillons qui imitent les échantillons biologiques du patient et aient pour effet de contrôler l'ensemble du processus d'analyse...* » (5.6.4).

La norme 17043 qui s'applique aux OCIL (LAB CIL Réf 02 pour les organismes accrédités COFRAC) reprend cette notion Chapitre 4.4.2 Préparation des entités soumises à l'essai d'aptitude - Exigence 4.4.2.3 : « *Il convient que les entités soumises à l'essai d'aptitude correspondent, autant que faire se peut, en termes de matrices, de mesurandes et de concentrations aux types d'entités ou de matériaux rencontrés en routine dans les essais ou l'étalonnage.* »

Afin de répondre aux exigences de la norme 15189, il convient d'évoluer vers une approche « métier », d'abord en étendant l'offre d'EEQ à l'ensemble des points critiques, ensuite en proposant une approche matricielle avec des matériaux imitant les échantillons biologiques, enfin en proposant des contrôles dont le contenu est adapté à l'activité des laboratoires.

3. 2. POINTS CRITIQUES D'UN EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE NECESSITANT UNE EEQ

Est considérée comme point ou analyse critique une analyse ou partie d'analyse d'un examen cyto-bactériologique produisant un résultat susceptible d'influencer la prise de

décision médicale (diagnostic et/ou traitement) et in fine sur la prise en charge d'un patient. Les «analyses critiques» d'un examen cyto-bactériologique comprennent :

- a). l'examen microscopique de l'échantillon, avec une composante cytologique, quantitative (cytologie automatisée), qualitative ± une estimation de quantification et une composante microbiologique,
- b). la culture bactérienne, avec ou sans estimation de quantification
- c). l'identification bactérienne,
- d). les tests de sensibilité aux antibiotiques.

Les points critiques de méthodes sont souvent communs à plusieurs types d'examens cyto-bactériologiques, et sont regroupés par famille ([Annexe 1, Tableau 1](#)).

3. 3. POLITIQUE D'EEQ EN BACTERIOLOGIE - RECOMMANDATIONS

3.3.1. TYPE DE MATÉRIAU ET PÉRIMÈTRE

Dans la mesure du possible, les matériaux pour CEQ imiteront les échantillons biologiques (approche matricielle). Les domaines de mesure proposés par les OCILs devront être cohérents avec les valeurs couramment et classiquement observées en pratique clinique (Normes 15189, 17043).

Du fait de la très grande variété des types d'échantillons traités en bactériologie médicale, une offre d'EEQ couvrant tous les types d'examens reste difficilement envisageable. Cependant, parce que les points critiques sont souvent communs à plusieurs examens, une approche transversale par famille de points critiques est conseillée. Ainsi, un matériau de CEQ pourra contrôler plusieurs méthodes partageant le même point critique. Par exemple, un matériau de CEQ portant sur la numération bactérienne pourra s'étendre aux méthodes avec culture avec estimation de quantification (ECBU, ECBC, LBA, cathéter) à la condition que les domaines de mesure contrôlés couvrent les valeurs rencontrées en pratique clinique pour les méthodes concernées.

Les souches proposées par les EEQ devront être le reflet de la pratique quotidienne que les CEQ ont pour but d'évaluer. Il est recommandé qu'en cas de besoin, les OCILs proposent plusieurs niveaux pour un même programme adaptés au recrutement des laboratoires.

Chaque fois que possible, il est également recommandé aux laboratoires de participer à des enquêtes épidémiologiques ou à des réseaux de type ONERBA, ColBVH, observatoires régionaux, nationaux ou internationaux, par exemple. Cette activité constitue un moyen supplémentaire pour mettre en évidence des erreurs systématiques (Cofrac SH GTA06). Les organisateurs de ces enquêtes proposent d'ailleurs parfois lors des enquêtes des souches de contrôle qualité qui peuvent être assimilées à un CEQ.

3.3.2. MODALITÉS ET FRÉQUENCE

Ces contrôles seront conduits au moyen d'un programme pluri-annuel d'EEQ ou, en cas d'absence d'EEQ disponible sur le marché, au moyen d'échanges inter-laboratoires à la condition que leur qualité puisse être maîtrisée (SH GTA 01). La fréquence d'EEQ est à discuter d'après le volume d'activité en bactériologie du laboratoire, le niveau de criticité dans la décision médicale (analyse bénéfique/risque des besoins) et la réglementation en vigueur (SH GTA 01). Un contrôle trimestriel est recommandé.

3.3.3. TRAITEMENT ET RESTITUTION DES DONNÉES

La méthode pratiquée au laboratoire sera prise en compte dans le traitement statistique des données lorsque celle-ci a un impact sur le résultat produit. Afin que le CEQ soit efficace, il est nécessaire que les organismes responsables d'EEQ transmettent ou mettent à disposition les résultats de l'évaluation avec une analyse statistique permettant au laboratoire participant de situer ces résultats par rapport à un groupe de comparaison qui prennent en compte le mesurande et l'interprétation par le clinicien (Cofrac SH Ref-02). L'analyse des résultats comprendra au moins 2 niveaux : un niveau « toutes techniques confondues » et un niveau « méthode » (analyse par groupe de pairs). Il est donc recommandé que le compte rendu de CEQ diffusé par les OCILs intègre, dans la mesure du possible, une présentation individualisant les divers niveaux d'analyse. Pour le cas de l'antibiogramme, 3 niveaux peuvent être considérés : un niveau « méthode – résultats bruts », un niveau « résultats interprétés par système expert », un niveau « résultats transmis au clinicien ».

Si plusieurs méthodes sont pratiquées pour une même analyse dans un laboratoire, chacune d'entre elles devra être contrôlée par une EEQ (exemple : antibiogramme par méthode des disques et par automate en milieu liquide) (SH GTA 01).

L'EEQ comporte une dimension pédagogique et la restitution des résultats à toute l'équipe représente une source non négligeable de maintien de la qualité au sein du laboratoire. Tout résultat invalide de CEQ doit conduire à une analyse rétrospective des process avec action corrective appropriée du process défectueux (Cofrac- SH GTA06).

3. 4. L'EEQ EN PRATIQUE AU LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE

La liste des OCILs, bien que non exhaustive, est consultable dans le document LAB INF 19. Les OCILs doivent être accrédités Cofrac [REF].

Au sein du laboratoire de Bactériologie, il convient de définir :

- la politique de l'EEQ, en exposant les priorités de sa politique et en s'assurant de la pertinence de ses choix (points critiques à contrôler, fréquence des contrôles).
- la politique des critères de choix des EEQ
- On distinguera le cas où une EEQ est disponible sur le marché du cas où elle ne l'est pas et pour lesquelles on veillera à mettre en place, dans la mesure du possible, des échanges inter-laboratoires (EIL). Dans ce cas, On prendra soin d'éviter les « pièges » liés:
 - à la méthode d'EIL : les solutions « club utilisateurs » ou les échanges mono techniques apportent en pratique peu d'information supplémentaire et correspondent à un CIQ « externalisé »,
 - aux effectifs : un minimum de 6 participants est conseillé
 - aux participants : il est conseillé de choisir des laboratoires accrédités sur des analyses appartenant au même sous domaine, ou reconnu pour leur compétence ou leur expérience (publications, Centres Nationaux de Référence).

Enfin, il est toujours possible d'effectuer des comparaisons inter-laboratoires avec des labos utilisant la même méthode (même automate de cytologie dans l'exemple).

Les matériaux de référence (souche ATCC, inoculum standardisé, sérum ou acide nucléique

¹ L'EEQ de la numération bactérienne est actuellement inexistante en France en Bactériologie médicale bien qu'une EEQ de la numération des légionnelles dans les eaux soit disponible sur le marché. Au niveau Européen l'UKNECQAS propose des échantillons de ce type sous forme de solution congelée simulant un échantillon clinique. Aux Etats Unis le *College of American Pathologists* propose également des écouvillons ou des solutions lyophilisées.

de contrôle) utilisés pour les EIL doivent différer de ceux utilisés pour le contrôle interne de qualité.

- ses procédures d'EEQ : organisation, exécution, enregistrement, analyse des résultats. En particulier, il convient de mettre en place une politique de restitution à l'ensemble de l'équipe et une politique d'exploitation globale et régulière des résultats d'EEQ. Si nécessaire, on tiendra compte du type de méthode dans l'analyse des résultats, à travers une analyse de type toute technique / groupes de pairs.
- la conduite à tenir en cas de résultat d'EEQ non conforme. Celle-ci comprend notamment :
 - l'ouverture d'une fiche de non-conformité
 - l'étude d'impact du résultat erroné
 - la pertinence et le suivi des actions correctives ou curatives

REFERENCES

Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de Biologie médicale (GBEA). JO numéro 287 du 11 décembre 1999, p18441.

Norme NF ISO 15189 : 2007. Laboratoires d'analyse de biologie médicale-exigences particulières concernant la qualité et la compétence. AFNOR. www.afnor.org

Norme NF ISO 17043 : 2010. Évaluation de la conformité - Exigences générales concernant les essais d'aptitude. AFNOR. www.afnor.org

Guides techniques d'accréditation et documents du COFRAC, section santé humaine(SH). SH REF 02. Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale. LAB GTA 06 Les contrôles de la qualité. Guide technique d'accréditation en biologie médicale SH GTA 01. LAB INF 19. Liste des organisateurs de comparaison inter-laboratoires www.cofrac.fr

Guides techniques d'accréditation et documents du COFRAC, section Comparaison inter-laboratoire (CIL). CIL REF 02. Exigences pour l'accréditation des organisateurs de comparaison inter-laboratoires selon la norme NF EN ISO / CEI 17043.

ANNEXE 1 - FAMILLES DE POINTS CRITIQUES

Familles d'analyses au cours d'un examen bactériologique susceptibles d'avoir un impact sur la décision médicale

Type d'analyses critiques	Savoir faire	Exemples
	1 & 2 Examen microscopique direct	
1a. Cytologie quantitative	Rechercher la présence de leucocytes et les quantifier	ECBU par automate
1b. cytologie qualitative	Rechercher la présence ou l'absence des cellules nommément désignées (leucocytes, clue-cells) qualitativement (présence, absence)	Secrétions uro-génitales
1c. qualitatif avec estimation de quantification	Rechercher la présence et estimer leur fréquence (leucocytes, cellules salivaires, etc.)	ECBU en cellule, ECBC, LCR
2. Examen bactériologique	Mettre en évidence les bactéries présentes dans l'échantillon	ECBU, ECBC Examen cyto-bactériologique de suppurations, etc.
3a. Culture avec estimation de quantification	Estimer la quantité de bactéries présentes dans un échantillon	ECBU, ECBC, LBA, cathéters, etc.
3b. Culture qualitative	Mettre en évidence la présence (ou l'absence) dans l'échantillon de bactéries ou d'une bactérie nommément désignée	Coproculture standard ECBC (BK, Legionella)
4. Isolement bactérien	Mettre en évidence tous les types bactériens présents dans un échantillon polymicrobien ^b	Suppurations, liquides
5. Identification	Identification à un niveau compatible avec une prise en charge médicale adéquate	Tout type d'examen
6. Antibiogramme	Déterminer la sensibilité d'une bactérie à divers antibiotiques appropriés au contexte médical	Tout type d'examen

^a la distinction entre les analyses 1a & 1b et 3a & 3b repose sur la catégorisation ou non du résultat d'après un seuil décisionnel

^b famille concernant surtout les échantillons polymicrobiens car évaluation déjà prise en compte par les points 3a et 3b.

4. HÉMOCULTURE ET ACCRÉDITATION

L'examen est à valider en méthode qualitative selon le document SH FORM 44 [1]. Ce document constitue un argumentaire de la démarche proposée.

4.1.1 LA PROCÉDURE « HÉMOCULTURE » : ARGUMENTAIRE ET RECOMMANDATIONS

Il est proposé d'associer à la description de la méthode une courte présentation de l'examen, incluant une présentation synthétique :

- du positionnement du test dans la démarche diagnostique
 - le contexte clinique dans lequel l'examen est prescrit
 - le contexte bactériologique (bactéries cultivables non intracellulaire obligatoires)
 - le volume d'activité correspondant à cet examen au laboratoire
 - les services prescrivant et prélevant cet examen
- de l'organisation et du fonctionnement du laboratoire pour la gestion de cet examen.

On inclura la description de l'examen en exposant les phases pré-analytique, analytique et post-analytique, avec par exemple pour :

- le pré-analytique :
 - présentation de : l'organisation du prélèvement (référence au protocole de prélèvement), des contrôles des bonnes pratiques du prélèvement mises en place et de l'organisation de son acheminement (référence au catalogue du laboratoire)
 - amplitude horaire de réception des échantillons, de traitement des flacons positifs
 - organisation interne mise en place au laboratoire pour prendre en charge ces échantillons (à réception des échantillons et gestion des flacons positifs)
- l'analytique
 - listedesappareillagesutilisés(référenceauxinstructionsd'utilisationcorrespondantes). On présentera brièvement les caractéristiques de l'automate hémoculture. Son contenu reposera essentiellement sur une bibliographie des données du constructeur. On intégrera par exemple les informations suivantes: principe de fonctionnement, principe de détection, caractéristiques de l'automate, caractéristiques du logiciel associé à l'automate
 - description des réactifs et consommables (ex : type de flacons)
 - présentation succincte du traitement d'un échantillon positif (référence aux instructions décrivant le traitement de l'échantillon)

Remarque : Le rappel succinct des principes et caractéristiques de l'automate a pour but d'expliciter le choix de l'utilisateur concernant les paramètres à vérifier ou à connaître, son étude de maîtrise des risques (par exemple gestion des dates de validation des lots par l'automate, capacité de mesure électronique des sources lumineuses), sa capacité à répondre aux référentiels (par exemple la possibilité de modifier le temps d'incubation par cellule de lecture).

- Le post-analytique :
 - descriptif succinct de cette phase (référence aux instructions correspondantes)
 - éventuelles prestations conseil en place, interactions clinico-biologiques, etc.

On mentionnera le ou les référentiels suivi(s) pour la méthode (ex : REMIC, *european manual of clinical microbiology*, Cumitech, etc.). Les sources bibliographiques doivent être citées mais il est inutile de les y annexer.

4. 2. QUALIFICATION DE L'AUTOMATE : ARGUMENTAIRE ET RECOMMANDATIONS

4.2.1. QUALIFICATION INITIALE

4.2.1.1. Installation

On s'assurera que le système est correctement installé, c'est-à-dire par exemple que:

- la livraison est conforme aux attentes (appareil, matériel complémentaire, documentation)
- l'environnement est conforme. En particulier, les automates pour hémoculture étant associés à un poids particulièrement lourd, et requérant une puissance électrique remarquablement élevée comparée aux autres types d'automates, on veillera à ce que l'environnement garantisse un bon fonctionnement de l'automate (résistance du sol, température de la pièce, puissance électrique disponible),
- les calibrations et contrôles sont conformes aux recommandations du fournisseur
- la maintenance de l'appareil est décrite, mise en place, connue et appliquée (ou prête à être appliquée)
- une procédure de maîtrise des modifications est en place (ex : changements de versions de logiciel, etc.)
- un plan de formation de tous les personnels amenés à utiliser l'automate est en place, approprié aux besoins, appliqué et rapidement déployé. Une trace des formations sera archivée.

Pour cette partie, on se référera en particulier aux données et documentation fournies par le constructeur.

4.2.1.2. Qualification opérationnelle

On s'assurera, en lien avec l'installateur que le système est opérationnel. On vérifiera en particulier, selon les possibilités de l'automate, le bon fonctionnement de :

- la température de chaque incubateur (conformité et liste des alarmes correspondant à une non-conformité), relevant d'une validation par le fournisseur.
- l'agitation des flacons
- l'ensemble des alarmes (visuelles & sonores), messages & fonctionnalités de l'automate. Par exemple, cette qualification pourra être réalisée au moyen de flacons-tests. On s'assurera en particulier de la conformité de fonctionnement lors (i) de l'introduction des flacons, (ii) de leur déchargement (flacons négatifs & positifs), (iii) de la détection d'un flacon positif, (iv) des erreurs de chargement/déchargement.
- la ou les sauvegardes
- la connexion automate-SIL
- la traçabilité électronique des manipulateurs

Pour cette partie, on se référera en particulier aux données et documentation fournies par le constructeur.

4.2.1.3. Culture et délais de positivité

Lors de la qualification initiale, l'évaluation sur site de la capacité du système à cultiver les germes les plus fréquents et/ou les plus fastidieux n'est pas requise (cf argumentaire chapitre 3.1). On s'appuiera sur les données de la littérature. Cependant, on vérifiera le bon fonctionnement de l'automate au moyen de quelques souches de CIQ en privilégiant des bactéries à croissance fastidieuse qui constituent le point critique de la méthode (exemple : *Abiotrophia defectiva*). On portera également une attention particulière au suivi de l'écologie des bactéries isolées avant et après changement de l'automate. On s'inspirera et adaptera si besoin le protocole du fabricant pour définir les souches à tester.

Les chances de détecter une bactériémie sont directement proportionnelles au volume de sang mis en culture et inversement proportionnelles au délai d'acheminement. Il importe de préciser les conditions de prise en charge préanalytique des hémocultures et des délais

d'acheminement les plus courts possibles doivent être recherchés. Bien que l'impact de délais allongés sur les performances de l'hémoculture ait été peu étudié, l'état des connaissances en bactériologie médicale permet de considérer qu'à volume de sang égal, le risque de ne pas détecter la présence d'une bactérie est négligeable lorsque le délai d'acheminement est inférieur à 2 heures. Au-delà de 2 heures, ce risque doit être considéré, le bouillon d'hémoculture devenant un milieu de transport dont les qualités dépendent du germe considéré.

4.2.2. QUALIFICATION CONTINUE

En vérification continue, la question se pose de passer régulièrement une souche de CIQ afin de vérifier la bonne croissance de la souche et la bonne détection du flacon positif. Bien que recommandé par certains fabricants, ce point est très discutable compte tenu:

- de la validation des milieux de culture par le fabricant (certificat)
- de la fréquence exceptionnellement faible de dysfonctionnements (avis d'expert)
- du fait que seule une ou quelques cellules d'incubation/détection sont contrôlées et qu'il est en pratique impossible de vérifier suffisamment souvent toutes les cellules d'incubation/détection.

Le passage de CIQ sur automate d'hémoculture n'est pas recommandé par le groupe QUAMIC. Le bon fonctionnement des cellules d'incubation/détection est un point critique, mais on préférera le surveiller, si l'automate le permet, au moyen d'un suivi régulier des proportions de flacons positifs par compartiment d'automate (fréquence trimestrielle par exemple). Ce suivi a pour objectif de déceler rapidement un compartiment d'automate qui deviendrait défectueux. On complètera cette analyse avec un suivi régulier de la diversité des espèces bactériennes détectées (fréquence minimale annuelle).

Le contrôle des températures doit être conduit conformément aux recommandations du fournisseur (maintenances). Elle ne nécessite pas de sonde extérieure (risque majoré de perturbation des températures de l'automate) ni de raccordement.

4. 3. ANALYSE DE RISQUE : ARGUMENTAIRE

4.3.1. DÉTECTION DES BACTÉRIÉMIES : SENSIBILITÉ DE LA MÉTHODE

4.3.1.1. Contexte général

La sensibilité de la méthode de culture résulte (i) du volume de sang mis en culture (ci-après qualité de l'échantillon), (ii) du délai d'acheminement, (iii) de la fertilité du milieu et (iv) de l'algorithme de détection. Les deux derniers points déterminent les performances du couple flacon-automate.

4.3.1.2. Sensibilité diagnostique (qualité de l'échantillon)

La limite de détection théorique est 1 UFC viable de l'agent infectieux par échantillon cultivé. La sensibilité diagnostique est donc en relation directe avec le volume de sang mis en culture, que ce soit chez l'adulte et, à une autre échelle, chez l'enfant [2]. Chez l'adulte, l'optimum à rechercher en terme de volume de sang à mettre en culture se situe entre 20 et 40 ml par épisode [2], l'épisode étant habituellement défini dans la littérature comme une période de 24 heures. Ce volume de sang est réparti dans un certain nombre de flacons conformément aux recommandations de fournisseur. Chez l'enfant, il est fonction du poids [2]. Des volumes inférieurs sont associés à une sensibilité moindre de l'examen. La littérature est abondante sur ce sujet.

En pratique, l'évaluation de la sensibilité diagnostique sur site est impossible en raison de l'absence de *gold standard* (statut des patients bactériémiques / non bactériémiques inconnu). Elle peut néanmoins être indirectement appréciée au moyen du volume de sang mis

en culture, qui constitue une approche très pertinente. Ainsi, il est recommandé d'apprécier le volume de sang réellement ensemencé. Deux approches sont possibles : estimation du volume de sang par flacon ou par épisode (somme des volumes de sang de tous les flacons prélevés durant une période de 24h). Le contrôle des volumes peut se faire par (i) pesée, (ii) contrôle visuel au moyen d'abaque ou, dans un avenir proche, (iii) automate. Selon les possibilités techniques disponibles au laboratoire, on procèdera soit par méthode de sondage (audit ponctuel), soit par mesure systématique (intégrée dans la gestion de l'analyse). Dans ce dernier cas, il est important de faire apparaître un commentaire sur le résultat sur les risques encourus en cas de volume est très insuffisant ou excessif.

NB : compte tenu des données de la littérature, une appréciation grossière du volume mis en culture est proposée.

4.3.1.3. Sensibilité analytique (fertilité du milieu et méthode de détection)

Indépendamment du volume de sang mis en culture, il existe des difficultés majeures à évaluer la sensibilité du couple flacon-automate, en raison de la multitude de paramètres souvent difficiles à maîtriser : très faible fréquence de bactériémie, absence de *gold standard*, très large panel de germes impliqués dans les bactériémies, variété des comportements « métaboliques » au sein d'une même espèce (variété des vitesses de croissance). Ceci rend en pratique illusoire les possibilités d'une évaluation pertinente sur site des performances de la méthode ou de la fertilité du milieu de culture.

La capacité des couples flacons-automates à cultiver les germes responsables de bactériémies a généralement été évaluée dans de larges études publiées, sur lesquelles on s'appuiera. On prendra soin de s'assurer que les milieux de culture utilisés au laboratoire correspondent bien aux milieux de culture évalués dans les études publiées, ce qui n'est pas toujours facile (décalage entre commercialisation des milieux et publication d'études). Le laboratoire s'appuiera donc sur une étude bibliographique et/ou données fournisseur.

Si des flacons d'hémocultures sont utilisés pour l'ensemencement de liquides de ponction, une validation de méthode ciblée sur cette utilisation sera mise en œuvre en particulier pour vérifier la nécessité d'ajout de facteurs de croissance en absence d'apport sanguin. L'utilisation de flacons d'hémoculture pour la culture de liquides biologiques implique une validation de méthode en portée B si elle n'a pas été validée par le fournisseur et en l'absence de données publiées.

Concernant les algorithmes de détection, il n'existe actuellement pas d'informations publiées permettant d'apprécier la pertinence des algorithmes de positivité d'automate. Celle-ci est indirectement appréciée au moyen de la sensibilité et de la spécificité diagnostique. En pratique, pour la sensibilité, on considèrera les proportions de vrai-positifs et faux-négatifs « automate ». Ces faux-négatifs correspondent à une croissance bactérienne dans le flacon non détectée par l'automate. A ce jour, la fréquence de faux-négatifs est généralement estimée inférieure à 0,4% des flacons traités par l'automate [3-5]. La très faible fréquence de ce paramètre, éprouvée, rend illusoire son évaluation lors de la qualification initiale de l'automate ou comme indicateur de suivi. On s'appuiera sur les données de la littérature pour le documenter. En l'absence de données publiées, on appréciera ce paramètre.

4.3.1.4. Robustesse de la détection

La robustesse de la détection de la bactériémie est tributaire de celle de la qualité de l'échantillon (volume de sang mis en culture). Il faut ici souligner les difficultés majeures à apprécier au moment du prélèvement le volume de sang injecté dans chaque flacon compte tenu de la multitude de facteurs d'influence : flacon le plus souvent maintenu penché lors du prélèvement, avec un bouillon pouvant mousser sous l'effet du jet sanguin et/ou chez un patient souvent profondément hypovolémique sous l'effet du sepsis. Ce point sera

maîtrisé au moyen i) du suivi du volume de sang réellementensemencé, ii) la formation des préleveurs et iii) l'application de la procédure de prélèvement.

4.3.2. DÉTECTION DE BACTÉRIÉMIE : SPÉCIFICITÉ DE LA MÉTHODE

4.3.2.1. Spécificité diagnostique: faux positifs

La spécificité diagnostique est directement liée à la contamination de l'échantillon lors du prélèvement. La fréquence de contamination est le reflet du respect des conditions d'asepsie lors du prélèvement. Il existe une littérature importante à ce sujet (causes, fréquence, moyens de maîtrise). La spécificité diagnostique sera suivie au moyen d'un indicateur de suivi défini par la fréquence de contamination probable. Par exemple, la contamination sera définie soit :

- par un échantillon positif à germe habituellement contaminant sur n échantillons prélevés ($n > 1$) en cas de prélèvement multiple,
- par un flacon positif sur n flacons prélevés en cas de prélèvement unique¹ ($n > 1$) [6],
- et d'après une documentation bactérioclinique.

4.3.2.2. Spécificité analytique : faux positifs

La fréquence de faux-positifs correspond à la fréquence de flacons déclarés à tort par l'automate comme contenant des micro-organismes. Cette fréquence est généralement inférieure à 1% [5,7]. Les causes en sont généralement un remplissage excessif des flacons, une hyperleucocytose par exemple. Sa maîtrise passe par la formation des personnels préleveurs. La fréquence de faux-positifs constitue un intéressant indicateur de suivi à cette fin.

4.3.3. STABILITÉ

On procédera à une analyse bibliographique (de type références du fournisseur) afin de préciser la stabilité des milieux de cultures. La maîtrise de la stabilité reposera essentiellement sur le respect des conditions de conservation et des délais de péremption.

4. 4. COMPARAISON DE MÉTHODES

4.4.1. COMPARAISON AUX AUTRES MÉTHODES DIAGNOSTIQUES

En terme de diagnostic bactériologique, les autres méthodes disponibles permettant d'établir la présence d'une bactériémie ne présentent ni la même amplitude de diagnostic, ni le même domaine de mesure (exemple : biologie moléculaire détectant bactéries viables et mortes) et ne sont donc pas comparables.

4.4.2. COMPARAISON D'AUTOMATES POUR HÉMOCULTURE

La comparaison d'automates sur site au moment d'un renouvellement d'automate (comparaison ancien vs nouvel automate) n'est pas justifiée par les besoins cliniques, puisqu'il n'y a pas, contrairement à la sérologie par exemple, de ré-analyse d'échantillon qui nécessiterait une comparabilité maîtrisée des automates.

Il existe dans la littérature des comparaisons de performances d'automates d'hémoculture, montrant à ce jour l'équivalence des systèmes commercialisés dans l'aptitude et le délai à diagnostiquer une bactériémie [4, 7, 8]. Il existe néanmoins plusieurs limites à cette évaluation bibliographique. D'abord, les études sont souvent limitées à l'évaluation d'un seul type de flacon (exemple flacon aérobique) ce qui reflète mal l'activité pratique qui utilise généralement deux types de flacons chez le patient adulte. Ensuite, les couples automates-flacons n'ont pas tous été évalués. Enfin, il peut exister un décalage entre les publications et l'état du marché : certaines études publiées sont caduques et ne correspondent plus au

couple automate-flacon distribué par les sociétés de diagnostic.

4. 5. SYNTHÈSE DES INDICATEURS PROPOSÉS

Le Tableau 1 synthétise l'ensemble des indicateurs proposés, selon les possibilités de l'automate. Les indicateurs de suivi pourront être élaborés et transmis aux unités de soins dans un souci d'amélioration des performances.

Tableau 1 : synthèse des indicateurs proposés

Etape de traitement	Indicateur	Fréquence d'évaluation
Phase pré-analytique	Volume de sang par flacon ou par épisode	Périodique
	Délais d'introduction des flacons dans l'automate	Périodique
	Proportion de contamination (faux positifs diagnostiques)	Périodique
Phase analytique (Qualification continue)	Proportion de flacons positifs par étuve (si l'automate le permet)	Trimestrielle
	Proportion des espèces retrouvées (épidémiologie)	Annuelle
	Proportion de faux positifs analytiques	Périodique
Phase post-analytique	Vérification d'une communication appropriée des résultats aux prescripteurs (à chaque étape du diagnostic, délais, traçabilité)	Périodique

4. 6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Tableau 2 : description de la méthode conformément au SH FORM 44.

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande :	Hémoculture : recherche de bactéries non intracellulaires obligatoires et cultivables ou de levures dans le sang NB : familles différentes (microbiologie et parasitologie/mycologie) pour la détection des bactéries et des levures
Principe de la Mesure :	Culture microbiologique du sang avec incubation prolongée en bouillon agité, Détection par mise en évidence d'une activité métabolique, Subcultures sur milieux appropriés avec identification bactérienne et évaluation de la sensibilité aux antibiotiques
Méthode de mesure :	Décrire le principe de détection de l'automate « X ».
Marquage CE	Oui

Tableau 3 : mise en œuvre de la vérification de méthode (à remplir sur site)

MISE EN ŒUVRE	
Opérateurs (Habilitation) :	
Procédure de validation :	
Procédure de gestion de la portée flexible :	
Période d'évaluation :	
Date de mise en service :	
Autorisation par :	

4. 7. MAÎTRISE DES RISQUES : DÉTERMINATION DES EXIGENCES TECHNIQUES CRITIQUES

Il s'agit de conduire une analyse de risque d'après la méthode des 5M. On procèdera à un inventaire des points critiques ou paramètres d'influence et des moyens mis en œuvre en vue de les maîtriser. La vérification de la méthode est déduite de l'analyse de risques.

MAÎTRISE DES RISQUES – HEMOCULTURE

Pour une meilleure lisibilité, toutes les phases (du pré-analytique au post-analytique) de l'analyse hémoculture ont été envisagées dans ce document. La mise en forme de la documentation qualité devra en tenir compte et sera à adapter pour chaque laboratoire.

Phase pré-analytique

¹ Protocole consistant à prélever l'ensemble des flacons recommandés pour détecter une bactériémie (habituellement 4 à 6 pour un adulte) en une seule ponction et non plusieurs [2]

MAITRISE DES RISQUES		
Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise et documentation
Matériel	Qualité des flacons avant utilisation	-traçabilité des lots à la réception du fournisseur -certificat d'analyse pour chaque lot fourni par le fabricant -réactovigilance fournisseur / laboratoire
	Quantité des flacons avant utilisation	-disponibilité des divers types de flacons (aérobie, anaérobie, pédiatrique, fongique,...) décrits dans le catalogue de prélèvement -gestion du stock
	Corps de pompe pour le prélèvement	-référencement -disponibilité -gestion du stock
Matière	Quantité d'échantillon	-procédure diffusée connue et appliquée (manuel des prélèvements) -estimation du remplissage des flacons à la réception -commentaire d'alerte en cas de remplissage insuffisant pour le service + commentaire biologique sur le résultat -indicateur de suivi avec action dans les unités de soins
	Qualité d'échantillon : contamination lors du prélèvement	-procédure diffusée connue et appliquée (manuel des prélèvements) -commentaire biologique sur le résultat -indicateur de suivi avec action dans les unités de soins
	Conformité de la demande +identité du patient +information clinique +péremption des flacons	-contrôle à la réception avec critères d'acceptabilité définis -traçabilité du préleveur -fiche de non-conformité -indicateur de suivi avec action dans les unités de soins
Méthode	Choix approprié des flacons	-procédure diffusée, connue et appliquée (manuel de prélèvements)
	Désinfection du site de prélèvement	
	Méthode de prélèvement	
	Délai entre prélèvement et incubation	
	Enregistrement de l'échantillon	-procédure diffusée et appliquée

MAITRISE DES RISQUES		
Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise et documentation
Main d'œuvre	Compétence du préleveur	-personnel formé et habilité (préleveurs, responsables de la réception, de l'enregistrement et de l'introduction des flacons dans l'automate)
	Compétence pour la phase pré-analytique et introduction dans l'automate	
Milieu	Conditions de stockage des flacons avant utilisation	-zone de stockage adaptée et gestion des dates de péremption. -sensibilisation des unités de soins et/ou des services responsables du stockage (« plateformes »)

Phase analytique (1) : incubation dans l'automate

MAITRISE DES RISQUES		
Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise et documentation
Matière	Facteurs de croissance (en cas de culture de liquides biologiques autre que le sang)	-traçabilité des lots à la réception du fournisseur -réactovigilance fournisseur / laboratoire -gestion de stock
Matériel	Automate d'hémoculture	-capacité suffisante -qualification de l'installation (documents d'installation) -contrat de maintenance -fiche automate -maintenance internes réalisées et tracées -contrôle des cellules de lecture -surveillance métrologique -cahier de vie -gestion des alarmes
	Connexion automate	-vérification des connexions
Main d'œuvre	Compétence pour le chargement/déchargement des flacons dans l'automate	-formation initiale à l'installation – documents -procédure diffusée, connue et appliquée -personnel formé et habilité

MAITRISE DES RISQUES		
Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise et documentation
Méthode	Chargement/déchargement des flacons	-instruction écrite de chargement/déchargement
	Incubation appropriée à la recherche	-protocoles définis : incubation prolongée si endocardite/brucellose
	Détection de croissance	-qualification initiale des performances de l'automate -qualification continue des performances de l'automate (après maintenance ou intervention ou mise à jour du logiciel)
	Conditions de culture particulières adaptées au prélèvement	-procédure pour les liquides de ponction (sans sang) : supplémentation en facteur de croissance avant incubation dans l'automate
	Prise en charge des flacons positifs	-procédure de réalisation -procédure de garde (nuit/WE)
Milieu	Environnement de l'automate	-suivi métrologique de la température du local -environnement conforme aux recommandations du constructeur

Phase analytique (2) : Examens direct & mise en culture des flacons positifs

Seuls les risques spécifiques aux hémocultures positives sont détaillés dans cette partie. Concernant les autres risques, on renvoie aux documents correspondant à l'analyse de risque d'un examen direct et à sa mise en culture

MAITRISE DES RISQUES		
Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise et documentation
Matériel	dispositif de subculture ou dispositif de sécurité pour flacons positifs	-stérilité du matériel -utilisation systématique
Main d'œuvre	Technicien	-personnel formé et habilité à la manipulation de flacons d'hémoculture positifs
Méthode	Choix des milieux	-utilisation de milieux appropriés aux microorganismes recherchés
Milieu	Sécurité	-NSB2

Phase analytique (3) : identification et antibiogramme

En l'absence de risque particulier lié à l'identification et évaluation de la sensibilité de bactéries isolées d'hémoculture, l'analyse de risque de cette phase correspond au cas général de l'analyse de risque d'une identification bactérienne et d'un antibiogramme en vigueur au laboratoire.

NB : l'identification ou l'antibiogramme réalisé directement à partir du bouillon d'un flacon positif requiert une analyse de risque spécifique.

Phase post-analytique

MAITRISE DES RISQUES		
Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise et documentation
Matière	Conservation des souches	-procédure écrite de conservation des souches
	Données informatiques, comptes rendus	-procédure écrite
Matériel	Moyens de transmission des comptes rendus (SIL)	-vérification des connexions
Main d'œuvre	Techniciens, biologistes, secrétaires	- personnels formés et habilités (techniciens, biologistes, secrétaires) - formation continue
Méthode	Saisie des résultats dans l'informatique	-procédure écrite
	Validation biologique	-procédure d'interprétation des résultats
	Transmission des résultats	-procédure écrite de transmission (téléphonique-informatique) des différentes étapes de résultats (Hémoculture négative ; hémoculture positive : ED, identification, antibiogramme) -procédure de garde
	Prestation conseil	-biologistes formés et habilités
Milieu	Condition de conservation des souches	-zone de stockage des souches
	Condition de conservation des archives	-support de sauvegarde et lieux de stockage appropriés

Pré-analytique

Analytique

Post-analytique

REFERENCES

1. Guides techniques d'accréditation et documents du COFRAC, section santé humaine (SH). SH FORM 44. Fiche qualitative - Vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale.
2. Hémoculture, in : REMIC, Référentiel en Microbiologie médicale, 4^{ème} édition. SFM, 2010.
3. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. *ClinMicrobiol Rev* 1997; 10 : 444-465.
4. Ziegler R, Johnscher I, Martus P, Lenhardt D, Just HM. Controlled clinical laboratory comparison of two supplemented aerobic and anaerobic media used in automated blood culture systems to detect bloodstream infections. *J ClinMicrobiol* 1998; 36 : 657-661.
5. Mirrett S, Everts RJ, Reller LB. Controlled comparison of original vented aerobic FAN medium with the new nonvented BacT/ALERT FA medium for culturing blood. *J ClinMicrobiol* 2001; 39 : 2098-2101.
6. Leysse D, Gardes S, Vilquin P, Flandrois JP, Carret G, Lamy B. Species-driven interpretation guidelines in case of a single-sampling strategy for blood culture. *Eur J ClinMicrobiol Infect Dis* 2011; 30: 1537-41.
7. Pohlman J.K., Kirkley B.A., Easley K.A., Basille B.A., Washington J.A. Controlled clinical evaluation of BACTEC Plus aerobic/F and BacT/ALERT Aerobic FAN for detection of bloodstream infections. *J. Clin. microbiol.* 1995; 33 : 2856-2858.
8. Jorgensen JH, Mirrett S, McDonald LC, Murray P, Weinstein MP, Fune J, Trippy CW, Masterson M, Reller LB. Controlled clinical laboratory comparison of BACTEC Plus aerobic/F Resin Medium with BacT/ALERT Aerobic FAN Medium for detection of bacteremia and fungemia. *J ClinMicrobiol* 1997; 35 : 53-58.

5. EXAMEN CYTOBACTÉRIOLOGIQUE DES URINES (ECBU) ET ACCRÉDITATION

L'examen cyto bactériologique des urines comprend deux analyses, l'analyse cytologique et l'analyse bactériologique. L'analyse cytologique peut être réalisée par une méthode automatisée ou manuelle. Elle comprend une méthode quantitative pour le dénombrement des hématies (GR) et des leucocytes (GB) par automate selon le SH FORM 43 et une méthode qualitative pour déterminer la présence de cristaux, cellules épithéliales, cylindres, bactéries, levures, parasites selon le SH FORM 44.

L'analyse bactériologique est une méthode qualitative permettant d'identifier les bactéries et de réaliser l'antibiogramme correspondant.

En fonction de l'examen réalisé, de la technique utilisée, du microorganisme observé lors de l'examen direct microscopique (avec ou sans coloration), il conviendra de se référer au SH-INF50 pour définir les différentes portées du sous domaine Microbiologie, famille Bactériologie-Mycologie-Parasitologie.

Le processus « ECBU » : argumentaire et recommandations

Il est proposé d'associer à la description de la méthode une courte présentation de l'examen, incluant une présentation synthétique :

- de son positionnement dans la démarche diagnostique
 - le contexte clinique dans lequel l'examen est prescrit.
 - réalisation ou non de bandelettes urinaires en amont.
 - le volume d'activité correspondant à cet examen au laboratoire
 - l'origine des échantillons (services prescripteurs, consultations, externes)
 - de l'organisation et du fonctionnement du laboratoire pour la gestion de cet examen.

On inclura la description de l'examen en exposant les phases pré-analytique, analytique et post-analytique, avec par exemple pour :

- **Le pré-analytique** :
 - se référer au manuel de prélèvement (où l'ensemble des conditions de prélèvements, d'acheminements, délais et modalité de conservation seront développés)
 - description de l'organisation interne mise en place au laboratoire pour prendre en charge ces échantillons (organisation en jour et en période de garde)
 - prise en considération des renseignements cliniques indiqués sur la prescription (signes cliniques, patient sondé, traitement..).
- **L'analytique** :
 - liste des appareillages utilisés (référence aux instructions d'utilisation correspondantes). On présentera brièvement les caractéristiques de l'automate utilisé pour réaliser la cytologie. Son contenu reposera essentiellement sur une bibliographie des données du constructeur. On intégrera par exemple les informations suivantes : principe de fonctionnement, principe de détection, caractéristiques de l'automate, caractéristiques du logiciel associé à l'automate
 - description des réactifs et consommables
 - » présentation succincte du fonctionnement et de l'organisation interne
 - » expliquer l'organisation interne (Ensemencement puis réalisation de la cytologie...)
 - » décrire succinctement le ou les milieux de culture utilisés, les durées d'incubation.
- **Le post-analytique** (ou se référer à une instruction ou procédure comprenant les items ci dessous) :

- décrire les valeurs de références et les bornes de catégorisation clinique utilisée (rare, quelques, assez nombreux etc..).
- décrire la prestation conseil réalisée : prendre en considération les renseignements cliniques, le mode de prélèvement, le traitement éventuel pour l'interprétation du résultat. Définir des bases d'interprétation communes sous forme de tableau ou de logigramme.

On mentionnera le ou les référentiels suivi(s) pour la méthode (ex : REMIC, European Manual of Clinical Microbiology). Les sources bibliographiques doivent être citées.

5. 1. CYTOLOGIE URINAIRE PAR TECHNIQUE AUTOMATISÉE : QUALIFICATION DE L'AUTOMATE DE CYTOLOGIE

5.1.1. QUALIFICATION INITIALE

5.1.1.1. Installation (ou renvoyer à la procédure « mise en place d'un équipement »)

On s'assurera que le système est correctement installé, c'est-à-dire par exemple que :

- la livraison est conforme aux attentes (appareil, matériel complémentaire, documentation en français)
- l'environnement est conforme.
- les calibrations et contrôles sont conformes aux recommandations du fournisseur
- la maintenance de l'appareil est décrite, mise en place, connue et appliquée (ou prête à être appliquée)
- une procédure de maîtrise des modifications est en place (ex : changements de versions de logiciel, etc.)
- un plan de formation de tous les personnels amenés à utiliser l'automate est en place, approprié aux besoins, appliqué et rapidement déployé. Une trace des formations sera archivée.

Pour cette partie, on se référera en particulier aux données et documentation fournies par le constructeur.

5.1.1.2. Qualification opérationnelle

On s'assurera, en lien avec l'installateur que le système est opérationnel. On vérifiera en particulier, selon les possibilités de l'automate, du bon fonctionnement dont :

- la calibration
- le passage des contrôles de qualité interne (ou se référer à une instruction ou procédure de gestion des CQI sur l'automate de cytologie urinaire)
- l'homogénéisation des échantillons
- les procédures de rinçage entre 2 échantillons
- la gestion des risques de contamination
- la vérification des valeurs usuelles et règles d'interprétation de chaque paramètre détecté ou mesuré par l'automate
- la vérification des règles de dilution si besoin
- la définition des règles de repasse de l'échantillon, avec ou non une technique différente
- la définition des règles de validation (document spécifique ou rattaché à une procédure générale)
- la définition des limites de l'automate et les échantillons dont la cytologie par méthode automatisée ne pourra pas être réalisée.
- la procédure et CAT en cas de panne de l'automate
- la ou les sauvegardes
- la connexion automate-SIL
- la traçabilité électronique des manipulateurs

Pour cette partie, on se référera en particulier aux données et documentation fournies par le constructeur.

- habilitation du personnel et fiche de poste : il convient de veiller à l'habilitation des opérateurs à se servir du nouvel équipement et de modifier les documents d'enregistrement s'y rapportant.

5.1.2. EVALUATION DES BESOINS DE LA CYTOLOGIE AUTOMATISÉE

Définir les objectifs de la validation de la méthode

Objectifs donnés à titre d'exemple : les objectifs peuvent être de :

- démontrer que les performances de l'automate correspondent aux données du constructeur et de valider cette technique en vue d'une utilisation quotidienne en remplacement d'une technique manuelle microscopique plus conventionnelle et à priori moins reproductible.
- standardiser la cytologie avec des résultats plus reproductible qu'en technique manuelle.
- identifier des éléments difficilement détectables au microscope.
- obtenir une meilleure différenciation des éléments urinaires par l'analyseur d'images que la méthode manuelle microscopique
- documenter corrélation entre la cytologie méthode manuelle microscopique et celle réalisée par l'automate – en particulier l'absence de différence d'interprétation de l'ECBU entre une méthode manuelle et une méthode automatisée autour de la valeur seuil décisionnel fixé à 10 éléments/ μ l
- dans le cas ou les techniques ne présenteraient pas les mêmes seuils, les compte rendus devront préciser la valeur seuil correspondant à la technique utilisée. La validation de méthode s'attachera à démontrer la concordance en catégorisation clinique
- en cas de détection de bactéries ou levures par l'automate, vérifier le résultat avec la culture et/ou l'examen microscopique après coloration.

5.2. MÉTHODE QUANTITATIVE LEUCOCYTES ET HÉMATIES PAR AUTOMATE (COMPLÉTER LE DOCUMENT SH FORM 43)

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande	Hématies
Principe de la Mesure	A décrire en fonction de l'automate
Méthode de mesure	Cytométrie et/ ou analyse d'image
Type d'échantillon primaire (urine, sang, ...)	urine
Type de récipient, Additifs (tubes, ...)	Tube boraté- flacon stérile sans additif
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...)	Homogénéisation
Unités	Nombre d'hématies / μ l
Intervalles de référence ¹	<1/ μ l ; seuil pathologique : 10/ μ l
Marquage CE (Oui/Non)	oui
Codage C.N.Q. (s'il existe)	
Instrument (analyseur automatique, etc.)	Nom et Société
Référence du réactif (référence fournisseur, version notice)	Indiquer référence fournisseur et numéro de la dernière version
Matériau d'étalonnage (références)/ Raccordement métrologique	Indiquer les références Calibrant,
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs	Indiquer le nombre de niveaux de contrôle utilisé en méthode automatisée et leur valeur

DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte/Mesurande	Leucocytes
Principe de la Mesure	A décrire en fonction de l'automate
Méthode de mesure	Cytométrie et/ ou analyse d'image
Type d'échantillon primaire (urine, sang, ...)	Urine
Type de récipient, Additifs (tubes, ...)	Tube boraté- flacon stérile
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...)	Homogénéisation
Unités :	Nombre de Leucocytes / μ l
Intervalles de référence ²	<1/ μ l ; seuil pathologique : 10/ μ l
Marquage CE (Oui/Non)	oui
Codage C.N.Q. (s'il existe)	
Instrument (analyseur automatique, etc.)	Nom et Société
Référence du réactif (référence fournisseur, version notice)	Indiquer référence fournisseur et numéro de la dernière version
Matériau d'étalonnage (références)/ Raccordement métrologique	Indiquer les références Calibrant,
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	indiquer le nombre de niveaux de contrôle utilisé en méthode automatisée et leur valeur

MISE EN ŒUVRE

Opérateur(s) habilité(s) ayant réalisé la vérification de méthode	Techniciens de Microbiologie habilités au poste
Procédure de validation	Inscrire le Numero de la procédure
Procédure de gestion de la portée flexible	Inscrire le Numero de la procédure
Période d'évaluation	
Date de mise en service	
Autorisation de mise en service par	NOM BIOLOGISTE

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Se référer aux modalités techniques et de calcul définis dans le SHGTA 04. A la fin de chaque essai, faire une conclusion et définir si l'essai est conforme ou non-conforme. Ci-dessous quelques exemples.

Répétabilité Hématies et Leucocytes:

La répétabilité doit être évaluée sur les hématies et les leucocytes dans des conditions standardisées (même opérateur, même lot de réactifs), en passant consécutivement si possible 20 fois un échantillon dans une même série. Elle peut être déterminée en utilisant trois niveaux d'échantillons patients (valeurs basses, moyennes et hautes) pour les leucocytes, les érythrocytes et les particules (pour automate).

« Si dessous un exemple de résultat avec les leucocytes avec l'automate »

¹ Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...

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

GB (nb/ μ L)	Nombre (N)	Moyenne ³	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite (hors fournisseurs ⁴)	Conclusion ⁵
Echantillon niveau 1 bas niveau	15	11,1	2	17,9			conforme
Echantillon niveau 2 intermédiaire	15	121,8	7,8	6,41			conforme
Echantillon niveau 3 haut	15	824	83,8	10,16			conforme

Conclusion : Comparer les résultats obtenus à ceux du fournisseur et de la littérature disponible.

Exemple « En effectuant les essais avec des échantillons patients à différentes concentrations de GB, la répétabilité reste satisfaisante car les CV sont inférieurs à 10 % sur les niveaux intermédiaire et haut. La répétabilité sur le niveau bas est acceptable. Les valeurs obtenues des CV n'interfèrent pas sur l'interprétation de l'ECBU

REPETABILITE LEUCOCYTES : CONFORME »

Evaluation de la Reproductibilité

Pour chaque analyte (Hématies et leucocytes), la reproductibilité peut être réalisée en utilisant les résultats des niveaux de contrôle de qualité interne (Contrôle positif) passés quotidiennement sur l'automate pendant par exemple 30 jours.

Calculer le CV et le comparer à celui donné par le fournisseur ou la littérature pour conclure sur les résultats obtenus.

« Si dessous un exemple de résultat avec les leucocytes avec l'automate »

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne ³	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite (hors fournisseurs ⁴)	Conclusion ⁵
Ex Contrôle interne	30	969,4 particules/ μ l	54,2	5,57			conforme

Conclusion : Comparer le résultat obtenu avec ceux de la littérature et faire une conclusion

Remarques : Afin de vérifier la stabilité du process au cours de la journée, il est conseillé de passer le contrôle positif interne pendant un certain temps (au minimum 15 jours) 2 fois par jour (avant et à la fin de la série). En déduire le rythme de passage des CQI à réaliser dans la journée.

Evaluation de la contamination

Méthode analytique

L'évaluation de la contamination inter échantillon peut être calculée selon les indications du SHGTA04 sur les érythrocytes, les leucocytes à partir d'échantillons patients. L'un comportant une concentration élevée en GB et l'autre une concentration élevée en GR.

Une étude des contaminations inter-échantillons peut être effectuée de la façon suivante :

² Nombre de chiffres significatifs

³ Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

⁴ Conforme/non conforme

Après rinçage de l'appareil, un échantillon à valeur élevée (ou positif fort) est analysé 3 fois consécutivement (H1, H2, H3, de moyenne hm) suivi d'un échantillon à valeur basse également analysé 3 fois (B1, B2, B3). Les séquences (H1, H2, H3, B1, B2, B3) peuvent être répétées plusieurs fois (5 fois) afin d'établir la moyenne des B1 (mB1) et la moyenne des B3 (mB3).

Contamination en % = $(mB1 - mB3) \times 100 / (mH - mB3)$.

Le pourcentage obtenu est à comparer à celui donné par le fabricant.

N.B. Il peut servir à anticiper le risque de contamination sur l'automate en paramétrant une alarme liée à ce risque.

Evaluation de la contamination microbienne

Le risque de contamination inter échantillon peut être évalué en passant un tube d'eau stérile entre chaque échantillon trouble et d'ensemencer sur un milieu de culture le tube contenant l'eau stérile. Compter les colonies après 24h d'incubation et comparer avec les échantillons urinaires préalablement ensemencés. Ce test peut être réalisé sur une vingtaine d'échantillons.

Etude de la stabilité des éléments urinaires.

Il peut être intéressant d'étudier la stabilité des échantillons urinaires prélevés sur tubes boratés ou tubes stériles sans conservateur afin de déterminer l'amplitude maximale pour laquelle le dénombrement cytologique reste stable.

Un passage sur l'automate des échantillons peut être réalisé sur 3 jours et sur 2 niveaux (valeur seuil et valeur haute) par un même opérateur. Les échantillons sont conservés à température ambiante ou les recommandations du fournisseur. La cytologie est réalisée sur l'automate à J0, 24 et 48h et 72h.

Concordance autour de la valeur seuil de mesure

Il peut être intéressant d'évaluer l'incertitude de mesure autour de la valeur seuil fixée à 10 éléments/ μ l pour les leucocytes (GB) et les érythrocytes (GR).

Un minimum de 40 échantillons urinaires peut être sélectionné en fonction de valeurs des GR et des GB situés entre 8 et 15 éléments/ μ l par l'automate. Ces échantillons sont relus en technique manuelle par le même opérateur. Les discordances sont interprétées.

		Technique manuelle		Total
		GB < 10/ μ l	GB \geq 10/ μ l	
Méthode automatisée	GB < 10/ μ l	20	7	27
	GB \geq 10/ μ l	5	12	17
Total		25	19	44

Evaluation de l'incertitude entre l'automate et la méthode manuelle pour la détection des GB autour de la valeur seuil 10 GR/ μ l.

La corrélation est de 72,7 % (32/44) entre les deux méthodes, soit une discordance pour 26,3 % des échantillons (11/45). Les échantillons discordants n'ont eu aucun impact clinique car la culture de ces échantillons s'est avérée négative après 24h d'incubation à 37°C.

Conclusion : Il y a une bonne corrélation entre la méthode microscopique et automatisée autour de la valeur seuil critique située à 10 GB/ μ l. Les discordances observées n'ont aucun retentissement clinique. INCERTITUDE DE MESURE : VALIDE

COMPARAISON DES METHODES

La comparaison des méthodes doit être réalisée avec l'ancienne méthode utilisée au laboratoire et l'automate ou méthode utilisée en miroir. Pour comparer les résultats d'une méthode Y avec ceux d'une méthode X (utilisée au laboratoire) on analyse au moins 30 échantillons de patients couvrant de façon homogène l'étendue du domaine physiopathologique rencontré (SHGTA04).

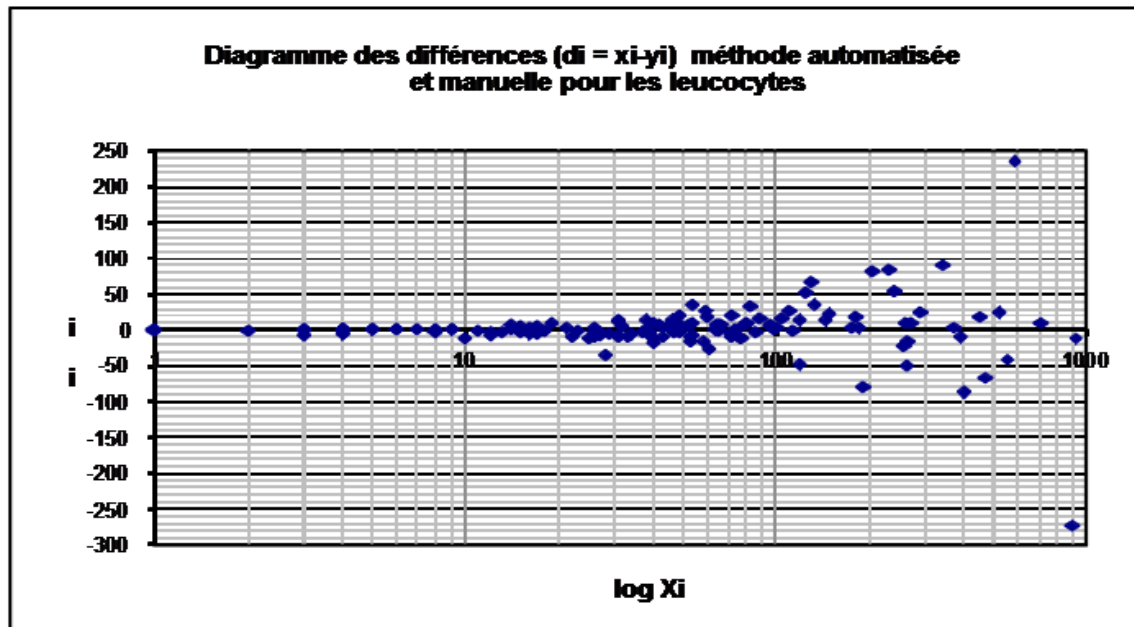
Exemple : comparer les résultats des hématies et des leucocytes réalisés par passage sur un automate et la méthode manuelle microscopique sur cellule comptage.

La comparaison des méthodes peut être réalisée sur un minimum de 50 échantillons comprenant différentes valeurs de leucocytes et d'hématies répartis sur 2 à 3 niveaux en favorisant un niveau proche du seuil décisionnel.

Pour chaque élément urinaire un diagramme des différences peut être réalisé mais l'analyse des discordances est plus facile à exploiter en microbiologie à partir d'un tableau de concordance.

COMPARAISON DE METHODES Leucocytes	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...)	
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou EBMD	Cytologie urinaire réalisée par la Méthode Automatisée (MA) et comparée à la méthode manuelle microscopique sur cellule de comptage
Nombre de mesures	150
Intervalle de comparaison adaptée à l'activité du laboratoire	0 à 890 leucocytes/ μ l (0 à 890 000 Leucocytes /ml)
Méthode d'exploitation des résultats	Diagramme des différences et tableau de concordance
Equation de la droite de régression	
Diagramme des différences et/ou des rapports	4 déviants: aucun impact clinique
Conclusions et dispositions⁶	Bonne concordance MA/ MM : CONFORME

⁶ Le laboratoire précise les dispositions mises en œuvre (par exemple : utilisation transitoire et documentée d'un facteur de correction).



Les résultats sont à interpréter : Il y a très peu de déviants pour les échantillons dont le taux de leucocytes est inférieur à de la valeur seuil (10 GB/ μ L) montrant ainsi une bonne corrélation entre la méthode automatisée et la technique manuelle. Plus les valeurs augmentent, plus elles montrent de grandes différences entre les deux techniques. Entre 10 et 100 GB/ μ L la différence augmente légèrement, elle augmente encore plus pour des valeurs supérieures à 100 GB/ μ L. Cette différence n'est pas très importante puisque le seuil pathologique est indépendant du taux de leucocytes fixé à 10 GB/ μ L

Tableau de concordance de la numération des leucocytes par l'automate et le microscope (seuil décisionnel à 10 GB/ μ L)

		Automate		
		négatif GB < 10 μ /L	positif GB \geq 10 μ /L	
microscope	négatif GB < 10 μ /L	26	1	
	positif GB \geq 10 μ /L	3	120	
				total : 150

Il y a très peu de discordance entre les deux méthodes (2,7%), et une très bonne concordance 97,3%.

Chaque discordance est étudiée individuellement en tenant compte des valeurs obtenues pour chacune des deux méthodes. Une explication peut être apportée.

La comparaison révèle quatre discordances.

Afin de connaître l'impact clinique de ces discordances, il est intéressant de regarder les valeurs des leucocytes avec les deux méthodes et d'interpréter les résultats en fonction de la clinique et de la culture.

Etude des discordances sur les leucocytes- Impact clinique

n° échantillon	automate (GB/ μ L)	méthode manuelle (GB/ μ L)	culture
2	9	19	stérile
21	5	14	10^3 UFC/ML <i>Enterococcus faecalis</i>
25	9	15	stérile
23	10	8	10^5 UFC/ml <i>Klebsiella pneumoniae</i>

Pour deux échantillons (échantillons n° 2 et n° 25) la culture est stérile alors que la technique méthode manuelle détecte respectivement 19 et 15 leucocytes/ μ L.

A l'inverse pour les deux autres échantillons (échantillon n° 21 et n° 23), les valeurs de leucocytes sont autour du seuil décisionnel. Pour l'échantillon 21, il n'y a pas de signes cliniques, c'est une colonisation, avec présence d'*Enterococcus faecalis*. Pour l'échantillon 23, il y a des signes cliniques, c'est une infection urinaire à *Klebsiella pneumoniae*.

Conclusion : comparaison satisfaisante pour 97,3% des échantillons. Les discordances se situent dans les valeurs autour du seuil. L'interprétation de l'ECBU prend en considération tous les paramètres de l'analyse (cytologie et culture) et reste clinique. Les discordances n'ont pas eu d'impact sur le résultat final. La comparaison de méthode montre une concordance : CONFORME

5.3. MÉTHODE QUALITATIVE : CRISTAUX-CYLINDRES-BACTÉRIES-LEVURES SELON LE SH FORM 44

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE : Cytologie urinaire

Cristaux- Cellules-Cylindres - Bactéries-Levures

DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte/Mesurande	Cristaux-cellules- cylindres- Bactéries-Levures
Principe de la Mesure	A décrire en fonction de l'automate
Méthode de mesure	Cytométrie et/ ou analyse d'image
Marquage CE (Oui/Non)	oui
Codage C.N.Q. (s'il existe)	

MISE EN ŒUVRE

Opérateurs (Habilitation)	Techniciens de Microbiologie habilités au poste TRA_333
Procédure de validation	Techniciens de Microbiologie habilités au poste
Procédure de gestion de la portée flexible	Inscrire le Numero de la procédure
Période d'évaluation	Inscrire le Numero de la procédure
Date de mise en service	
Autorisation par : nom biologiste Ou référent du secteur	signatures

Objectif de la vérification des méthodes (Evaluation des besoins)

» Exemple : Obtenir une bonne corrélation entre la cytologie méthode manuelle microscopique et celle réalisée par l'automate.

COMPARAISON DE METHODES

Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire	Cytologie urinaire réalisée par une méthode automatisée sur X (nom de l'automate) et comparée à la Méthode Manuelle sur <i>Cellule</i>
Nombre de mesures	n
Descriptif de l'échantillon étudié	L'étude a été réalisée sur n échantillons. En cas de discordance entre la méthode manuelle Kova et automatisé X une relecture par la MM a été refaite. Les éléments urinaires comme les cellules, cristaux, cylindres, sont appréciés qualitativement : Présence/ Absence
Méthode d'exploitation des résultats (études des concordances)	N échantillons ont été analysés. L'analyse des cristaux, cylindres, cellules épithéliales, est représentée sous forme de tableau de concordance (un tableau par élément).
Résultats et interprétations des discordances	Pour tous les éléments, la corrélation est calculée. Toutes les discordances sont analysées et interprétées.
Conclusions et dispositions ⁷	Conclusion sur cette comparaison de méthode et décrire les dispositions entreprises en cas de non concordance. Exemple « <i>Excellente concordance de l'automate avec la méthode manuelle pour les cristaux, cylindres et cellules épithéliales</i> ».

Comparaison entre la méthode automatisée et manuelle

Automate		Méthode manuelle	
		absence	présence
	absence	Vrai négatif VN	discordance
	présence	discordance	Vrai positif VP

$$\text{Concordance} = (\text{VN} + \text{VP}) / \text{total}$$

⁷ Le laboratoire précise les dispositions mises en œuvre (par exemple : utilisation transitoire et documentée d'un facteur de correction).

5. 4. MÉTHODE QUALITATIVE : CULTURE BACTÉRIENNE

5.4.1. EVALUATION DES BESOINS (OBJECTIFS DONNÉS À TITRE D'EXEMPLE)

- *Obtenir des colonies bactériennes bien différenciées sur le milieu de culture approprié à la culture des urines permettant une identification de la bactérie par le système utilisé au laboratoire.*
- *Prévoir un milieu de culture supplémentaire en cas de présence de levures et/ou de bactéries observées à l'examen direct microscopique et/ou en fonction de la cytologie et des renseignements cliniques.*

Les performances du (des) milieu (x) de culture utilisé(s) sont évalués par une étude bibliographique.

5. 5. CONFIRMATION DES PERFORMANCES EN ROUTINE

5.5.1. CONTRÔLE DE QUALITÉ INTERNE

Se référer au chapitre Contrôle de qualité Interne du guide QUAMIC

5.5.2. CONTRÔLE DE QUALITÉ EXTERNE

Se référer au chapitre Contrôle de qualité Interne du guide QUAMIC

MAÎTRISE DES RISQUES – ECBU

Phase pré-analytique

MAITRISE DES RISQUES		
Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise et documentation : références document/SMQ
Matière	Urines, quantité et qualité d'échantillon, état du patient	procédure diffusée connue et appliquée (manuel de prélèvement) contrôle à la réception avec critères d'acceptabilité définis obtenir les renseignements cliniques
Matériel	Pot stérile, tubes avec conservateur	Procédure diffusée connue et appliquée (manuel de prélèvements), Traçabilité des lots à la réception du fournisseur, gestion des dates de péremption (tubes avec conservateur)
	contamination de l'échantillon	-Procédure diffusée connue et appliquée décrivant les modalités de transport et de conservation (manuel de prélèvement). - Heure de prélèvement mentionnée (pot stérile)
	Quantité d'échantillon	-procédure diffusée connue et appliquée (manuel de prélèvement)
	Qualité d'échantillon : contamination lors du prélèvement	-procédure diffusée connue et appliquée (manuel des prélèvements) -commentaire biologique sur le résultat
	Conformité de la demande +identité du patient +information clinique +délai d'arrivée au laboratoire	-contrôle à la réception avec critères d'acceptabilité définis -traçabilité du préleveur -fiche de non-conformité
Méthode	Désinfection du site de prélèvement	-procédure diffusée, connue et appliquée (manuel et méthodes de prélèvements en fonction de l'âge (enfants, Nouveau Né, adultes, patients sondés) et du terrain et du pathogène recherché (1er jet, milieu jet etc..))
	Méthode de prélèvement	
	Délai entre prélèvement et ensemencement	
	Enregistrement de l'échantillon	-procédure diffusée et appliquée
Main d'œuvre	Compétence du préleveur et du patient	- Patient informé par une fiche d'instruction donnée au patient (LBM privés et consultation externe). - Obtenir les renseignements cliniques - Personnel formé et habilité (préleveurs, responsables de la réception, de l'enregistrement)
Milieu	Conditions de stockage des récipients avant utilisation	-zone de stockage adaptée et gestion des dates de péremption. -sensibilisation des unités de soins et/ou des services responsables du stockage (« plateformes »)

Phase analytique (1) : Ensemencement- cytologie automatisée

MAITRISE DES RISQUES		
Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise et documentation : références document/SMQ
Matériel	Réactifs Milieux de culture	-traçabilité des lots utilisés, Gestion du stock, péremption -certificat d'analyse pour chaque lot fourni par le fabricant -réactovigilance fournisseur / laboratoire CQI, EEQ - contrôle de coloration/jour/Gram
	contamination de l'échantillon	- ensemencement : conditions en fonction de l'analyse de risque - maîtrise du risque à évaluer sur l'automate (validation de méthodes) et actions entreprises (programmation des rinçages) - utilisation de matériel à usage unique, oeses calibrées à usage unique
	Enceintes thermostatées	-cartographie des enceintes, surveillance métrologique des températures (étuves, réfrigérateurs)
	Automate	- capacité suffisante -qualification de l'installation (documents d'installation) -contrat de maintenance (préventive et curative), interventions tracées, datées, signées -fiche automate -maintenance internes réalisées et tracées -passage des CQI -cahier de vie -gestion des alarmes
	Informatique	- vérification des connexions (SIL- Automate- SIL- Serveur) - gestion des versions - procédure de contrôle de la justesse des données

MAITRISE DES RISQUES		
Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise et documentation : références document/SMQ
Main d'œuvre Méthode	-Compétence pour l'utilisation de l'automate Reconnaissance des éléments urinaires Lecture des colorations de Gram Vérification analytique Validation biologique	-formation initiale à l'installation -procédure diffusée, connue et appliquée -personnels formés et habilités à chaque étape de l'analyse -évaluation des compétences
	Détermination de la bactériurie	Utilisation d'oeses calibrées à usage unique Formation / Habilitation du personnel Respect des durées et température d'incubation
	Cytologie urinaire automatisée	Formation- Habilitation, maîtrise des compétences. Règles de repasse et/ou utilisation d'une autre méthode clairement définie.
	Lecture des milieux de culture	Connaissance des aspects des colonies sur milieux de culture, affichette en couleur, procédures et fiches analyses à connaître Formation/Habilitation. CQI- EEQ
	Identification	Voir document spécifique nécessaire : validation de méthode/identification
	Antibiogramme	Voir document spécifique nécessaire : validation de méthode/antibiogramme
Milieu	Environnement de l'automate	-suivi métrologique de la température du local -environnement conforme aux recommandations du constructeur
	Sécurité	NSB2
	Contamination	Nettoyage et désinfection des surfaces Hygiène et sécurité Instruction d'utilisation et nettoyage des PSM

Phase post-analytique :

MAITRISE DES RISQUES		
Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise et documentation : références document/SMQ
Matière	Conservation des prélèvements après analyse	-procédure écrite de conservation des prélèvements après analyses (température et durée)
	Données informatiques, comptes rendus	-procédure écrite
Matériel	Moyens de transmission des comptes rendus (SIL)	-vérification des connexions
Main d'œuvre	Techniciens, biologistes, secrétaires	- personnels formés et habilités (techniciens, biologistes, secrétaires) - formation continue
Méthode	Saisie des résultats dans l'informatique	-procédure écrite
	Validation biologique	-procédure d'interprétation des résultats en fonction des renseignements cliniques et du REMIC, prestation conseil par des biologistes habilités
	Transmission des résultats	-procédure écrite de transmission (téléphonique-papier-informatique)
Milieu	Condition de conservation des souches	-zone de stockage des souches
	Condition de conservation des archives	-support de sauvegarde et lieux de stockage appropriés

5. 6. RÉFÉRENCES

1. Janvier F, Mbongo-Kama E, Cavallo JD. Les difficultés d'interprétation de l'examen cytobactériologique des urines. Rev. Fr. Labo., 2008, N°406, 51-59
2. Van den Broek D, Keularts IM, Wielders JP and Kraaijenhagen RJ. Benefits of the iQ200 automated urine microscopy analyser in routine urinalysis. Clin Chem Lab Med ,2008, 46(11): 1635-1640.
3. Groupe REMIC de la Société Française de Microbiologie (SFM). Référentiel en microbiologie médicale, 4ème édition. SFM, 2010.
4. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé. Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires du nourrisson et de l'enfant, argumentaire et recommandations, Février 2007. www.ansm.sante.fr.
5. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé. Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires de l'adulte, argumentaire et recommandations, Juin 2008. www.ansm.sante.fr.
6. Guides techniques d'accréditation et documents du COFRAC, section santé humaine (SH GTA 04). SH FORM 44/43 - Vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale.
7. Cerroni F, Mancinelli F, Cipriani P, Barbanti R, De Prosperis D, Cardelli P. Statistical Model That Supports Instruments in Assessment of Urinary Infection. Abstract 21 Congresso Nazionale SIMeL Riva del Garda, 25 – 27 October 2007
8. Aspevall O, Hallander H, Gant V, Kouri T. European guidelines for urinalysis: a collaborative document produced by European clinical microbiologists and clinical chemists under ECLM (European Confederation for Clinical Microbiology and Infectious Diseases) in collaboration with ESCMID. Clin Microbiol Infect, 2001; 7: 173-8.
9. Gueudet T, Rieder-Monsch C, Saez M, Pujol A. Que faut-il attendre de l'automatisation du sédiment urinaire ? A propos de Sysmex UF 1000 bioMérieux®. Abstract 28ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse, 2008 Déc. 4-5 ; Paris, 184-185.
10. Meley R, Orenge S, Roger-Dalbert C. Evaluation of a new chromogenic culture medium CPSID3 for urinary tract infections. Abstract 14ième ECCMID 2004.
11. Ciragil P, Gul M, Aral M, Ekerbicer H. Evaluation of a new chromogenic medium for isolation and identification of common urinary tract pathogens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis ,2006,25:108-111
12. G. Dewulf, D. Harrois, E. Mazars, C. Cattoen, F. Canis. Evaluation des performances de l'automate de cytologie urinaire Iris iQ 200 ELITE et comparaison avec la méthode manuelle microscopique. Path. Biol. ,2011, 59 , 264-268
13. INRS Laboratoires d'analyses médicales. Evaluation et prévention des risques infectieux,2009.

6. ANTIBIOGRAMME : NORME NF EN ISO 15189, VALIDATION DE MÉTHODE ET TYPE DE MÉTHODE

6.1. DÉFINITION :

Un antibiogramme vise à évaluer la sensibilité d'une souche à un panel d'antibiotiques en vue d'aider le clinicien à mettre en œuvre chez un patient le traitement antibiotique le mieux adapté au regard des caractéristiques du patient, du site infecté et de la ou des souches bactériennes responsables de l'infection. L'évaluation de la sensibilité consiste à confronter une souche bactérienne isolée d'un produit pathologique à un antibiotique, dans des conditions techniques standardisées. L'objectif premier consiste à distinguer les souches présentant un profil « sauvage », classique, pour lequel les choix thérapeutiques posent peu ou pas de problèmes (abstraction faite de la localisation de l'infection) des souches présentant un profil particulier, inhabituel, le plus souvent de résistance majorée, et pour lesquelles une attention et une gestion particulière seront nécessaires. En d'autres termes, il s'agit de détecter la présence de mécanismes de résistance, autrement dit, de la présence d'un ensemble de phénomènes.

L'antibiogramme est un examen complexe, dépendant d'un paramètre supplémentaire original : la souche bactérienne, il s'agit d'un organisme vivant, dont la variabilité est impossible à maîtriser, ou même à connaître ou à prédire. Cet examen peut être réalisé selon différentes méthodes, manuelles ou automatisées, en milieu solide ou en milieu liquide.

Bien que le résultat soit rendu sur un mode qualitatif (sensible, intermédiaire, résistant), ce résultat est extrapolé à partir de données mesurables (diamètres d'inhibition, CMI), de ce fait la question de l'estimation de l'incertitude de la mesure est régulièrement évoquée. Même si la proximité d'un résultat à un seuil est importante à communiquer et doit être prise en compte, l'approche reposant sur l'estimation de l'incertitude pose plusieurs problèmes à la fois en termes de pertinence clinique et de pertinence méthodologique.

Un résultat d'antibiogramme est issu d'un processus complexe incluant à la fois des étapes i) en amont de la mesure (consensus d'experts révisés annuellement, choix de la méthode par le biologiste du laboratoire) et ii) en aval de la mesure, précédant l'étape post analytique.

6.2. ETAPES EN AMONT :

6.2.1. RECOMMANDATIONS D'EXPERTS ANNUELLEMENT RÉVISÉES

La définition des seuils de catégorisation résulte de la confrontation de données pharmacologiques, microbiologiques, de résultats d'études de populations bactériennes (distribution des CMI et des diamètres d'inhibition d'un grand nombre de souches cliniques), de résultats d'essais cliniques (succès ou échec thérapeutique *in vivo*), de la connaissance des concentrations humorales et tissulaires qui sont obtenues avec les posologies recommandées dans le résumé des caractéristiques du produit et de la prise en compte de l'incertitude de mesure. Il s'agit d'un travail collégial, multidisciplinaire aboutissant à des recommandations européennes (EUCAST) diffusées par les comités nationaux de chaque pays (CA-SFM). Ces recommandations sont annuellement révisées afin de tenir compte, par exemple, de l'évolution de la résistance, donc de la pertinence des seuils de catégorisation clinique d'après la distribution des CMI et diamètres.

Les souches catégorisées Sensibles (S) correspondent à une probabilité élevée de succès thérapeutique dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée (CA-SFM, 2012) et les souches catégorisées Résistantes (R) à une probabilité élevée d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique

utilisée. Les souches catégorisées Intermédiaires (I) sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. Cette dernière catégorie (I), correspond par ailleurs à une catégorie « tampon » dont un des objectifs consiste à prendre en compte des incertitudes techniques et biologiques. Les souches catégorisées I forment en outre un groupe hétérogène avec à la fois des souches pour lesquelles le traitement sera inefficace et d'autres pour lesquelles il pourra être efficace dans certaines conditions (CA-SFM, 2012).

La plupart des couples bactéries-antibiotiques sont associés à une catégorisation de type S, I, R, mais certains sont réduits à une catégorisation S et R. Ces cas ne correspondent pas nécessairement à un risque accru d'erreur de catégorisation; au contraire, ils sont le reflet d'une excellente séparation des populations des souches S et des souches R (absence d'ambiguïté et de chevauchement des distributions des 2 populations), de ce fait la zone intermédiaire n'est pas nécessaire ou simplement non définissable.

6.2.2. PERFORMANCES DES MÉTHODES, CHOIX DES MÉTHODES

L'objectif de l'antibiogramme ne consiste pas uniquement à rendre un résultat molécule par molécule mais aussi à mettre en évidence des mécanismes de résistance. Or, l'aptitude à correctement détecter un mécanisme de résistance peut dépendre, selon le germe considéré, de l'antibiotique utilisé pour la réalisation du test, les molécules présentant des performances variables selon les groupes bactériens ou les mécanismes de résistances.

Exemple: la détection de la résistance de Staphylococcus aureus à l'oxacilline est associée à de meilleures performances lorsqu'on utilise le moxalactam plutôt que la céfoxitine ou l'oxacilline. Lorsqu'on utilise l'oxacilline, les performances varient selon le milieu utilisé et la température d'incubation, requérant un milieu de culture et une température d'incubation particuliers.

Par ailleurs, et cela est lié au fait que nous sommes dans le « monde du vivant », les méthodes en milieu liquide et celles en milieu solide (y compris pour les méthodes dites « de référence ») ne sont pas exactement corrélées entre-elles.

En conséquence, la qualité des résultats de l'antibiogramme, dépendra avant tout de l'aptitude du biologiste à maîtriser ses techniques, c'est-à-dire, entre autres, de son aptitude à correctement choisir un antibiotique ou un panel d'antibiotiques pertinent, la méthode et les conditions techniques de sa réalisation et de connaître les limites de chaque technique.

6. 3. ETAPES EN AVAL :

6.3.1. LECTURE INTERPRÉTATIVE DE L'ANTIBIOGRAMME

Le résultat rendu au clinicien n'est pas un résultat brut issu d'une lecture individuelle molécule par molécule. En effet, malgré un choix pertinent de la méthode d'antibiogramme, certains mécanismes de résistance sont mal détectés. Il s'agit d'une limite technique. Afin que les résultats définitifs prédisent au mieux le succès ou l'échec thérapeutique et surtout le bon dépistage des profils inhabituels, une lecture interprétative du profil de résultats est nécessaire, elle suit un ensemble de règles édictées par les comités nationaux, et établies d'après la littérature. Cette lecture intègre entre autres un contrôle de cohérence du profil de résistance à l'identification de la souche et peut conduire à la décision de mise en œuvre de tests complémentaires. Ces règles sont appliquées soit « mentalement », soit à l'aide d'un système expert, soit les deux. Ainsi, un résultat S (y compris pour un résultat distant du seuil de catégorisation) peut devenir I à l'issue de la lecture interprétative et I ou R après mise en œuvre de tests complémentaires. Les règles de lecture et de mise en œuvre de tests

complémentaires sont annuellement révisées.

La pertinence de la lecture résulte donc de l'aptitude du biologiste à connaître et à maîtriser les règles d'interprétation et leurs limites et à les appliquer de manière appropriée dans les situations le requérant. Cette lecture est réalisée avant et après mise en œuvre des tests complémentaires. L'originalité de cette démarche est caractérisée par le fait qu'elle comprend une part de subjectivité dont la maîtrise est obtenue au moyen de l'expérience et de l'expertise de l'opérateur (NATA, 2012).

6.3.2. CHOIX DE MÉTHODES COMPLÉMENTAIRES

Les méthodes disponibles dans les laboratoires présentent des performances variables selon les couples bactéries-antibiotiques ou les mécanismes de résistances. Il existe de nombreux exemples.

Exemple 1 : la détection de la résistance à l'amoxicilline + acide clavulanique ne pose pas de problème par une méthode dite de première intention pour les entérobactéries, mais est insuffisamment fiable pour Staphylococcus aureus, nécessitant alors la mise en œuvre de tests complémentaires en vue de rendre un résultat sur l'antibiogramme.

Exemple 2 : la détection d'une résistance d'une souche de S. aureus aux glycopeptides nécessite la mise en œuvre de tests complémentaires, parfois multiples, et dont le choix est guidé par les résultats à certains antibiotiques obtenus avec la méthode initialement mise en œuvre (méthode de première intention). Cette approche nécessite une connaissance maîtrisée des résultats ou profils de résultats. S. aureus intermédiaire aux glycopeptides doit être suspecté d'après i) le niveau des diamètres de vancomycine et teicoplanine, ii) la présence de colonies à l'intérieur des diamètres d'inhibition de la vancomycine ou teicoplanine, iii) la présence de résistances associées peu fréquentes (ex : souches résistantes à l'oxacilline et gentamicine). La présence de cette résistance est confirmée par la mise en œuvre de tests complémentaires appropriés (CASFM 2012, page 33).

Exemple 3 : La détection d'une sensibilité diminuée aux pénicillines chez Streptococcus pneumoniae ne peut se faire en testant la pénicilline G sur l'antibiogramme, elle nécessite l'utilisation d'une molécule indicatrice, l'oxacilline (non rendue sur le résultat) mais qui conduira, si sa sensibilité est anormale, à réaliser des CMI pour l'ensemble des bêta-lactamines dont le résultat autorisera leur interprétation.

Ainsi, la pertinence d'un résultat d'antibiogramme réside avant tout et surtout dans les méthodes mises en œuvre, qu'elles soient de première ou deuxième intention. La maîtrise de l'antibiogramme réside dans la maîtrise des connaissances du biologiste et de son aptitude à correctement choisir la méthode aux performances appropriées pour une situation donnée.

6. 4. VARIABLES MESURÉES :

La mesure et sa variabilité résulte de plusieurs facteurs, dont la maîtrise technique de l'opérateur (méthode, main d'œuvre), le choix des réactifs (milieux de culture, disques, cartes, etc. (matière, matériel), et, surtout, la souche évaluée.

La variable mesurée, concernant le cas des méthodes à CMI en milieu liquide, est une variable censurée, discrétisée (méthode semi-quantitative), de type logarithmique (base 2) associée à un domaine très étendu de valeurs possibles (par exemple, <0,0015 à >256). Pour autant, les méthodes de routine présentent un domaine de mesure entourant les seuils de catégorisation, d'étendue relativement faible, un domaine de mesure très étendu n'étant pas nécessaire. En pratique, une très forte proportion de résultats sont de type <x mg/L ou > X mg/L car la CMI de la souche se situe en dehors du domaine de mesure. Concernant la méthode en diffusion, la variable mesurée est une variable continue, un diamètre d'inhibition en millimètres.

6. 5.SYNTHÈSE : L'ANTIBIOGRAMME ET LA PLACE DE L'INCERTITUDE DE MESURE DANS LA MAÎTRISE DE LA MÉTHODE

6.5.1. PERTINENCE CLINIQUE

En raison de la dimension supplémentaire représentée par la souche bactérienne provenant d'un patient donné, l'estimation de l'incertitude de la mesure n'est pertinente qu'au niveau du couple bactérie-antibiotique évalué, et l'incertitude de mesure est en pratique impossible à évaluer à ce niveau.

L'estimation de l'incertitude d'un diamètre d'inhibition ne correspond pas ou très mal aux besoins cliniques. Les besoins cliniques comportent avant tout la nécessité de savoir détecter la présence ou l'absence d'une résistance (ou sensibilité diminuée) afin d'adapter au mieux la prise en charge thérapeutique. Ces détectations se font essentiellement à travers un profil de plusieurs résultats (présence de résistances croisées ou associées, profils inhabituels, niveau inhabituel d'une mesure brute, etc.) et la détection des profils dépend totalement de l'aptitude à i) choisir correctement les méthodes appropriées à une situation donnée, ii) maîtriser la mise en œuvre de la méthode, iii) conduire de manière appropriée l'interprétation du profil et la détection de tout profil ou partie de profil inhabituel, iv) choisir et mettre en œuvre les tests complémentaires adaptés dans les situations appropriées, v) relire correctement l'ensemble du résultat à la lumière des résultats complémentaires. La maîtrise de l'ensemble de ces étapes dépend complètement de l'habilitation des personnels et de la maîtrise des connaissances, dans un contexte d'évolution permanente et souvent rapide de l'épidémiologie de la résistance. Comme il a été exposé aux chapitres précédents, la pertinence d'un résultat relève d'une trilogie, la souche (et le groupe bactérien auquel il appartient), l'antibiotique et la méthode utilisée et c'est bien dans cette trilogie que réside la compétence du microbiologiste.

Dans ce contexte, l'influence de l'incertitude de mesure des résultats au millimètre près est globalement très faible, car l'impact de l'incertitude du résultat d'une molécule de l'antibiogramme n'aura qu'une influence très limitée, si ce n'est nulle, sur la lecture de l'ensemble du profil de résultats. A contrario, il est possible de disposer d'une variabilité de mesure bien maîtrisée sans pour autant maîtriser le choix des méthodes, des tests complémentaires et de l'interprétation, aboutissant à un risque bien plus élevé et sans commune mesure avec celui associé à la non estimation de l'incertitude de mesure lui-même. Ainsi, l'apparente sécurité que constitueraient le calcul et la communication de l'incertitude de mesure ne permettrait en fait pas d'améliorer la maîtrise de la méthode et exposerait au contraire au risque de sur-qualité et de fausse sécurité.

Enfin, la maîtrise technique et la variabilité des mesures sont obtenues au moyen de l'habilitation des personnels techniques.

6.5.2. PERTINENCE MÉTHODOLOGIQUE

Certaines approches proposées consistent à estimer l'incertitude de mesure à partir des mesures obtenues de souches de CIQ. Elles ne permettent pas d'estimer l'incertitude de mesure à l'échelle du couple souche-antibiotique, sont inappropriées ou exposent à un risque de fausse sécurité. En effet, elles sont limitées à un nombre très limité de souches, ne représentant pas toutes les espèces rencontrées en clinique, ni l'ensemble des mécanismes de résistance délicats à détecter et ne se comportant pas toujours comme les souches isolées de produits pathologiques complexes (exemple : *S. aureus* ATCC 25989 (culture congelée) et staphylocoque non aureus isolé de fragment osseux dans un contexte d'infection chronique sur prothèse).

Concernant les résultats en dehors du domaine de mesure (de type $<x$ mg/L ou $>X$ mg/L), très fréquents, la détermination d'une incertitude de mesure – en particulier aux limites du domaine de mesure, x et X mg/L – est difficile voire impossible et n'est pas pertinente. Enfin, aucune des méthodes recommandées pour approcher l'incertitude de mesure, n'est actuellement applicable (fréquence trop faible de souches EEQ sur une même espèce donnée, panel très limité d'espèces proposées aux EEQ, pas de programme contrôle interne externalisé disponible, etc.).

En terme de pertinence, il convient de citer R.Leclercq (L'antibiogramme) : «**Dans le cas de l'antibiogramme, l'estimation de l'incertitude de mesure peut être atteinte par un calcul rigoureux et statistiquement valable, le laboratoire doit recenser toutes les étapes de l'analyse afin d'identifier les composantes de l'incertitude et les points critiques**».

6.5.3. CONCLUSION

Un résultat d'antibiogramme reflète le processus complexe mis en œuvre ; il est la résultante composite de plusieurs résultats issus de plusieurs méthodes choisies en fonction de chaque couple bactérie-antibiotique et d'une « lecture interprétative » comportant une part de subjectivité. L'apport de l'estimation de l'incertitude de mesure et les aspects mathématiques associés à l'estimation de l'incertitude de mesure, outre la faisabilité, apparaissent inappropriés aux besoins cliniques réels. La maîtrise de l'antibiogramme passe avant tout par l'amélioration de i) l'identification des besoins cliniques et bactériologiques, ii) la maîtrise des méthodes et du choix des méthodes, iii) la maîtrise technique, iv) la maîtrise de la lecture des profils et des dépistages de profils ou partie de profils inhabituels, dans un contexte d'évolution permanente et souvent rapide de l'épidémiologie de la résistance induisant une évolution régulière des méthodes et de leurs performances. La pertinence bactério-clinique de l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques requiert que la maîtrise technique se limite à une évaluation de la répétabilité et de la reproductibilité (CIQ). La vérification des méthodes comportant une part de subjectivité requiert une approche particulière, privilégiant l'analyse des risques, les exercices collaboratifs (intra- et inter-laboratoire), un programme de contrôle de qualité, l'évaluation des compétences des personnels concernés (NATA, 2012).

Pour autant, il est utile d'informer le clinicien qu'un résultat est proche ou non d'un seuil de catégorisation, afin qu'il soit à même d'apprécier la pertinence de ses choix thérapeutiques en fonction des résultats et du contexte clinique (localisation anatomique du foyer infectieux, état général du patient, comorbidités et thérapeutiques associées). En ce sens, il convient de ne pas limiter la présentation des résultats au seul résultat S, I, R mais de leur associer le résultat brut et les seuils de catégorisation utilisés et, si nécessaire, un commentaire alertant qu'un résultat est proche du seuil.

6. 6. RÉFÉRENCES

CA-SFM (2012). Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2012. Société Française de Microbiologie, SFM, Paris. Téléchargeable à l'adresse : www.sfm-microbiologie.org

EUCAST (2012). European Committee on Susceptibility Testing. Téléchargeable à l'adresse: <http://www.eucast.org>

Guides techniques d'accréditation et documents du COFRAC, section santé humaine (SH). SH GTA 04 Guide de validation des méthodes en biologie humaine. SH GTA 01 Guide technique d'accréditation en biologie médicale. SH GTA 14 Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale. www.cofrac.fr

R Leclerc. Chapitre 8 « Contrôle de qualité » in: Antibiogramme, 3ème édition, ESKA, Paris. (2012) pages 81-82.

NATA – Technical note 17. National Association of Technical Authorities, June 2012, Australia.

Annexe : définitions

CMI : concentration minimum inhibitrice

Seuils de catégorisation : seuils permettant de catégoriser la souche en sensible, intermédiaire, résistant

S : catégorie sensible ; souches pour lesquelles il existe une forte probabilité de succès thérapeutique dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée dans le résumé des caractéristiques du produit, rédigé par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS).

R : catégorie résistante ; les souches pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée.

I : intermédiaire ; les souches catégorisées I sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique. En effet, ces souches :

- peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression *in vitro* est faible, avec pour conséquence leur classement dans la catégorie S. Cependant, *in vivo*, une partie de ces souches apparaît résistante au traitement ;
- peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression n'est pas suffisante pour justifier un classement dans la catégorie R, mais suffisamment faible pour espérer un effet thérapeutique dans certaines conditions (fortes concentrations locales ou posologies accrues); La catégorie intermédiaire est aussi une zone tampon qui tient compte des incertitudes techniques et biologiques.

EEQ : évaluation externe de la qualité

CIQ : contrôle interne de la qualité

Méthode de première intention : méthode d'antibiogramme de première ligne, habituellement méthode en diffusion ou méthode automatisée de CMI (estimées ou non) en milieu liquide.

Méthode de deuxième intention : méthode évaluant la sensibilité à un antibiotique, habituellement mise en œuvre après l'obtention d'un premier antibiogramme par une méthode de première intention (exemple : E test, techniques chromogéniques, tests de synergie, disques combinés, etc.).

7. ETUDE QUALITATIVE DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES: ANTIBIOGRAMME AUTOMATISE EN MILIEU LIQUIDE

Cofrac LBM : XXXX	FICHE TYPE QUALITATIF Portée de type A	Référence SH FORM 44 Version : Date d'application :
------------------------------------	---	--

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE : ETUDE QUALITATIVE DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES: ANTIBIOGRAMME AUTOMATISE EN MILIEU LIQUIDE

DESCRIPTION DE LA METHODE

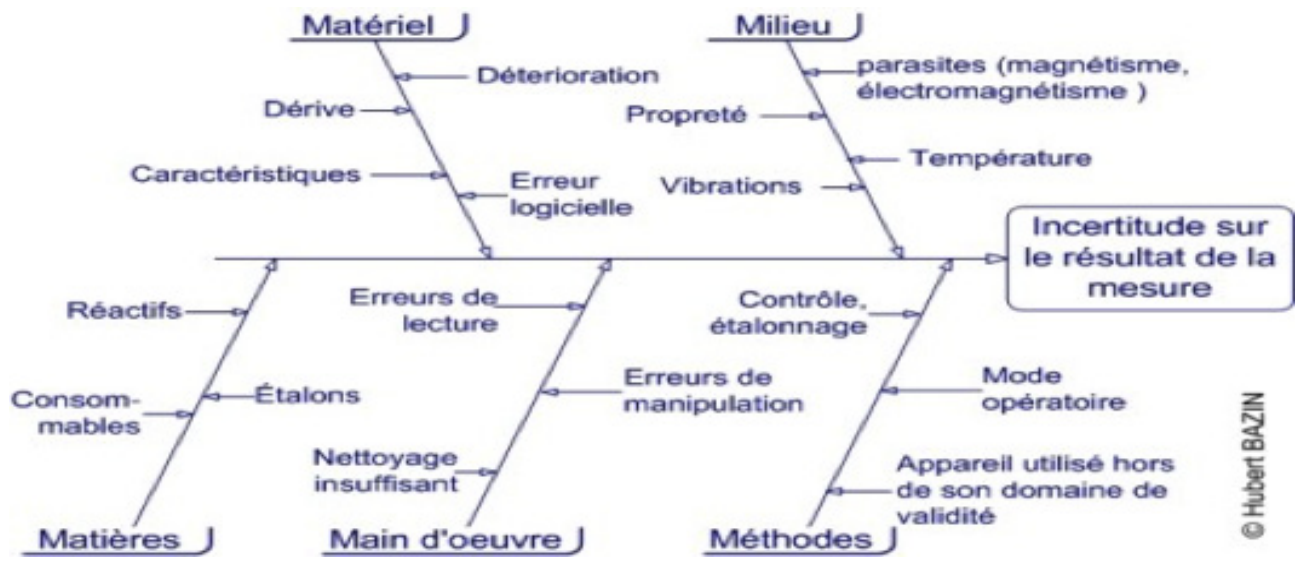
Analyte / Mesurande : Souche bactérienne : détermination de la sensibilité aux antibiotiques
Principe de la mesure : Méthode automatisée de type qualitatif
Méthode de la mesure : Inhibition de la croissance bactérienne en milieu liquide en présence de différentes concentrations d'antibiotique après incubation
Marquage CE : oui
Codage CNQ

MISE EN ŒUVRE

A remplir par le laboratoire

MAITRISE DES RISQUES :

L'analyse de risque et les mesures prises pour maîtriser les risques identifiés doivent être réalisées de manière exhaustive et détaillées par le laboratoire qui dépose le dossier d'accréditation, cette analyse est réalisée selon le diagramme d'Ishikawa :



Les cinq domaines de « causes de risques et de variabilité » sont :

1. **Les Matières** : par exemple, milieux de culture, réactifs, souches de contrôle, consommables.
2. **Le Matériel** : par exemple, équipement, étuves (métrologie), automates (logiciel, technologie, réglage, maintenance).
3. **La Méthode** : par exemple, mode opératoire, contrôle d'étalonnage, appareil ou méthode utilisés hors domaine de validité.
4. **La Main d'œuvre** : le personnel (compétence, formation, habilitation), les erreurs potentielles, par exemple, erreurs de manipulation ou de saisie, de lecture, de mesure, nettoyage insuffisant.
5. **Le Milieu** : environnement, température ambiante, vibrations, propreté.

Toutes ces causes vont influencer sur l'incertitude du résultat et doivent en conséquence être maîtrisées.

Analyse des causes de risques selon la méthode des 5 M pour l'antibiogramme automatisé en milieu liquide :

Type de risque	Etapas comportant un risque identifié	Mesures prises pour maîtriser le risque
Matière	Réactifs : - Cartes, galeries... - Solution saline - Tubes Culture bactérienne (colonies) Souches de référence	Stockage des réactifs adapté, date de péremption Utilisation de cartes ou galeries adaptées au type de bactérie et selon recommandations du fournisseur Remise à température avant utilisation Contrôle de stérilité Tubes à usage unique Milieu non inhibiteur, milieux validés Culture pure Conservation
Main d'œuvre	Qualification du technicien et maintien des compétences Erreur de manipulation ou erreur technique Traçabilité	Formation Habilitation au poste Fiches de non-conformités analytiques Identification des techniciens sur les automates

Type de risque	Etapes comportant un risque identifié	Mesures prises pour maîtriser le risque
Matériel	Automate	Dimensionnement suffisant / activité et sécurisé si panne ou maintenance Contrat de maintenance Maintenances internes Cahier de vie Versions actualisées
	Logiciel	
	Densitomètres (contrôle d'inoculum)	Calibration régulière Contrôle
Matériel	Distributeur de solution saline	Maintenance et nettoyage Contrôle de stérilité Sauvegardes réalisées Validation de sa mise en place (conformité aux recommandations du CA-SFM, vérification de cohérence sur des dossiers tests et/ou des dossiers patients) Suivi et vérification de l'actualisation des versions. Validation des mises à jour du logiciel
	Informatique Logiciel d'expertise de l'automate Concentrateur de données et SIL	Sauvegardes réalisées Vérification périodique de la transmission des données (contrôles de justesse)
Méthode	Validation de méthode Etapes pré-analytique et analytique : Respect des préconisations du fournisseur Respect du mode opératoire et des conditions de l'analyse : - Milieu sur lesquels les colonies sont prélevées - Culture pure	Qualification initiale des automates selon les préconisations du constructeur et les exigences du laboratoire. Fiche analyse décrivant les impératifs à respecter (base documentaire) Mode opératoire connu et appliqué Fiche analyse précisant par exemple les recommandations du fournisseur et les milieux proscrits. Colonies bien isolées uniquement, réisolement si nécessaire, contrôle de pureté de l'inoculum (réisolement systématique).

Type de risque	Etapas comportant un risque identifié	Mesures prises pour maîtriser le risque
Méthode	<ul style="list-style-type: none"> - Age des cultures - Respect et maîtrise de l'inoculum standardisé (selon données fabricant) - Respect de l'adéquation carte, galerie / type de germe - Respect des délais Validation technique Contrôle du processus analytique Etape post-analytique : Validation biologique Conservation des souches pour contrôle éventuel Elimination des déchets 	<p>Respecter les recommandations du fournisseur. Le cas échéant, en particulier pour les méthodes rapides pour lesquelles l'âge des colonies est important, en vérifier l'impact s'il y a utilisation de colonies de plus de 24h (le lundi par exemple) : valider par des essais et un CQI passé sur colonies de 24 et 48h.</p> <p>Contrôle systématique de tous les inoculums au densitomètre.</p> <p>Pré-tests si utile (Gram, pré-tests d'identification) Procédures d'antibiogramme écrites</p> <p>Délai préparation – chargement sur automate respecté</p> <p>Consultation de l'avis du biologiste pour tout résultat incohérent Conditions pour lesquelles un contrôle est requis (antibiogramme de seconde intention) définies par une instruction</p> <p>CQI identification et antibiogramme sur chaque automate et sur différentes espèces représentatives.</p> <p>Validation au regard du dossier bactériologique complet en ayant à disposition les résultats de l'automate</p> <p>Conservation des souches définie par une instruction.</p> <p>Procédure écrite</p>
Milieu	<ul style="list-style-type: none"> Conditions de fonctionnement de l'automate Absence de contamination lors des manipulations 	<p>Environnement conforme aux recommandations du constructeur Sonde d'ambiance pour la surveillance de température en continu du local. PSM, bionettoyage Contrôles de pureté et/ou stérilité</p>

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE :

S'agissant d'une technique qualitative et de Portée de type A, les paramètres à vérifier et/ou connaître sont (SH GTA 04) :

Paramètres à vérifier et/ou connaître	Bibliographie	Vérification sur site
Spécificité	OUI	NON
Sensibilité	OUI	NON
Contamination entre échantillons	OUI	OUI
Stabilité des réactifs	OUI	NON
Robustesse	OUI	NON
Comparaison avec méthode de référence	OUI	NON
Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire	OUI	OUI (si possible)
Conclusion sur l'aptitude de la méthode notifiée sur le dossier		

1^{ère} étape :

Réunir la bibliographie pertinente :

- Recommandations du CA-SFM de l'année
- Rémic (dernière édition)
- Documentation fournisseur
- Bibliographie fournisseur
- Bibliographie antibiogramme automatisé (articles, congrès ...)
- Ouvrages (Courvalin.P, Leclercq.R. Antibiogramme. 2012, Editions ESKA)...

2^{ème} étape : vérification sur site : validation de méthode :

Qualification de l'automate : selon recommandation constructeur, sinon argumenter les choix effectués.

Maîtrise de l'inoculum : Validation / vérification du/des systèmes utilisés (densitomètres)

Contamination entre échantillons : Validation / vérification de la méthode utilisée sur site : exemple tests de pureté (réisolement systématique de l'inoculum)

Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire (exemple : diffusion) :

- Souches de CQI testées avec les deux types de méthodes
- Souches cliniques testées avec les deux types de méthodes
- Effectuer une analyse des discordances
- Evaluer les limites de la méthode automatisée (exemple limites de l'automate dans la détection de certains mécanismes de résistance : détection BLSE / céphalosporinase déréprimée). Formaliser la conduite à tenir : par exemple, vérification de certains phénotypes pour certaines espèces, tests de seconde intention, réalisation de CMI.

Remarque : valoriser l'existence d'une autre technique disponible au laboratoire (vérifications, seconde intention) (Cf Rémic 2010 P:280)

Le biologiste doit conclure sur les dispositions prises.

3^{ème} étape : vérification des performances en continu :

Le Contrôle Interne de Qualité : CIQ :

CIQ du densitomètre :
Contrôle proposé par le fournisseur

CIQ de l'antibiogramme :

Cf document QUAMIC SFM correspondant.

Suivre les recommandations du fabricant (choix des souches)

Fixer la périodicité (minimum mensuel, bi-mensuel souhaitable)

Couvrir tous les lots de réactifs

Réaliser un CQI après chaque opération de maintenance ou après chaque panne automate résolue.

Utiliser des souches sensibles aux antibiotiques et des souches présentant des mécanismes de résistance (exemple : SARM, entérobactérie productrice de BLSE, entérocoque présentant un haut niveau de résistance aux aminosides...)

Utiliser des souches référencées et stabilisées

Respecter les recommandations pour la conservation des souches (Rémic 2010)

Mettre en place une traçabilité du CQI (en général géré par l'automate) et des mesures prises en cas de résultat discordant.

Le Contrôle Externe de Qualité : CEQ :

Cf document QUAMIC SFM correspondant.

Choisir un programme pour lequel l'automate utilisé est représenté (pairs utilisateurs)

Respecter une périodicité au minimum trimestrielle

Formaliser et tracer les mesures prises en cas de résultat discordant

Il peut être pertinent d'utiliser le CEQ pour formaliser un indicateur.

ELEMENTS INDISPENSABLES POUR LA BASE DOCUMENTAIRE **(à annexer éventuellement au dossier)**

Instruction automate « automate pour antibiogramme »

Instruction analyse « antibiogramme automatisé »

Habilitation du personnel

Instruction « Gestion du CQI »

Instruction « Gestion du CQE »

REFERENCES

1. Communiqué du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2013. www.sfm-microbiologie.org
2. Guides techniques d'accréditation et documents du COFRAC, section santé humaine (SH). SH REF 02 .SH GTA 04 Guide de validation des méthodes en biologie humaine. SH GTA 06 Les contrôles de la qualité. Guide technique d'accréditation en biologie médicale SH GTA 01. www.cofrac.fr
3. REMIC, Référentiel en microbiologie médicale, 4ème édition 2010, Société Française de Microbiologie. www.sfm-microbiologie.org
4. Courvalin P., Golstein F., Quentin C., Flandrois J-P., Philippon A., Sirot J. L'antibiogramme automatisé. 1988, Vigot, Paris.
5. Courvalin.P, Leclercq.R. Antibiogramme. 2012, 3ième édition, Editions ESKA

8. VERIFICATION D'UNE METHODE QUALITATIVE DE PCR EN TEMPS REEL BACTERIENNE

Laboratoire de biologie médicale xxx	PROCEDURE GENERALE DE VALIDATION/ VERIFICATION D'UNE METHODE QUALITATIVE DE PCR EN TEMPS REEL BACTERIENNE PORTEE A OU B	Procédure xxx Version : Date d'application : Page :
--------------------------------------	--	--

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE : METHODE QUALITATIVE : PCR en temps réel portée A/B

DESCRIPTION DE LA METHODE		
Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire	<ul style="list-style-type: none"> Décrire les types d'échantillons concernés par la PCR. Echantillons prélevés dans des tubes adéquats, de façon stérile Quantité suffisante pour obtenir un résultat interprétable. Conservation des échantillons : <ul style="list-style-type: none"> - congélation <20°C avant analyse - réfrigération après analyse 	<ul style="list-style-type: none"> Procédure de prélèvement diffusée connue et appliquée, selon le manuel de prélèvement Alerter le service clinique en cas de quantité insuffisante : procédure de gestion des non-conformités : xxx Vérification de la bonne conservation des échantillons pour le délai de conservation choisi (faire des PCR sur des échantillons positifs pour détecter une baisse de sensibilité (exemple : annexe I)) Suivi métrologique des congélateurs
Prétraitement de l'échantillon	Spécifier les échantillons pouvant subir un prétraitement (exemple : broyage des biopsies osseuses)	<ul style="list-style-type: none"> pour les biopsies osseuses : comparer les performances de la PCR avec et sans broyage sur des biopsies séparées en 2 échantillons : analyse de la présence d'inhibiteurs et du maintien de la positivité de la PCR.

Laboratoire de biologie médicale xxx	PROCEDURE GENERALE DE VALIDATION/ VERIFICATION D'UNE METHODE QUALITATIVE DE PCR EN TEMPS REEL BACTERIENNE PORTEE A OU B	Procédure xxx Version : Date d'application : Page :
---	--	--

DESCRIPTION DE LA METHODE		
Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : préciser les références des procédures et enregistrements	Technicien de laboratoire habilité pour le poste de travail et personnel médical pour la validation	Cf fiches d'habilitation du personnel (fiche de poste, maîtrise des compétences) : xxx
Conditions ambiantes requises	<ul style="list-style-type: none"> • Ambiances contrôlées de température des pièces • Séparation des pièces de BM 	<ul style="list-style-type: none"> • Pièces (extraction, PCR) à température maîtrisée: suivi des températures par une sonde ou un thermomètre indiquant les températures maximales et minimales • Procédure d'organisation des pièces de BM : xxx
Référence du réactif (référence du fournisseur)	Cf liste des réactifs de PCR, indiquée dans chaque procédure	Réactifs marqués CE (pour les portées A)
Matériau de référence (témoins)	<ul style="list-style-type: none"> • Contrôle de qualité interne (CIQ) indépendant du kit pour chaque PCR (si disponible) • Evaluation externe de qualité (EEQ) si disponible 	<ul style="list-style-type: none"> • Suivi régulier du CIQ et des EEQ. CIQ passé tous les mois et à chaque changement de lot. • Cf procédure de gestion des contrôles xxx
Equipements : exigences métrologiques (définir les paramètres critiques)	<ul style="list-style-type: none"> • Centrifugeuses à microtubes et à plaques • Réfrigérateur à 4°±3°C • Congélateur <-70°C° • Micropipettes calibrées et contrôlées • Thermocycleurs, extracteurs, bains-marie secs 	<ul style="list-style-type: none"> • Qualification des installations • Cahier de vie automates • Contrats de maintenance annuelle des thermocycleurs • Suivi métrologique des thermocycleurs et des pipettes critiques • Suivi métrologique des congélateurs, des réfrigérateurs et des bains marie secs.

Laboratoire de biologie médicale xxx	PROCEDURE GENERALE DE VALIDATION/ VERIFICATION D'UNE METHODE QUALITATIVE DE PCR EN TEMPS REEL BACTERIENNE PORTEE A OU B	Procédure xxx Version : Date d'application : Page :
--	--	--

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

CONTAMINATION entre échantillons (portées A et B)

Inter échantillon :	Procédure valable pour toutes les PCR : Vérification de la non contamination dès l'extraction (par automate ou colonne), en utilisant la PCR la plus susceptible d'être à l'origine de contamination (ex : coqueluche). Extraire au minimum 6 échantillons, positifs et négatifs (eau), et réaliser la PCR choisie. (ex : annexe II).
Résultat	Donné sous la forme d'un tableau récapitulatif
Exigence	pas de contamination inter échantillons avec la méthode de PCR en objet

SPECIFICITE ANALYTIQUE (portée B) (spécificité diagnostique non applicable)

EXIGENCE	BIBLIOGRAPHIE	VERIFICATION SUR SITE
<ul style="list-style-type: none"> Résultats attendus pour la PCR temps réel 16S : les échantillons négatifs doivent être compris dans l'intervalle défini pour les témoins négatifs (moyenne témoins négatifs \pm 2 écarts types) Résultats attendus PCR spécifiques : spécificité >95% 	Si disponible	Méthode : PCR 16S : analyse d'une vingtaine d'échantillons connus exempts d'ADN bactérien dans une même série de validation (ex : dilutions d'ADN humain) PCR spécifiques : analyse d'une vingtaine d'échantillons d'ADN : <ul style="list-style-type: none"> ne contenant pas la cible recherchée appartenant si possible à des espèces phylogénétiquement proches de la bactérie recherchée
CONCLUSION		xxx

Laboratoire de biologie médicale xxx	PROCEDURE GENERALE DE VALIDATION/ VERIFICATION D'UNE METHODE QUALITATIVE DE PCR EN TEMPS REEL BACTERIENNE PORTEE A OU B	Procédure xxx Version : Date d'application : Page :
---	--	--

COMPARAISON AVEC LA CULTURE pour les bactéries cultivables (portée B)

EXIGENCE	BIBLIOGRAPHIE	VERIFICATION SUR SITE
Les échantillons positifs en examen direct et en culture (gold standard) doivent être positifs en PCR universelle ou pour l'espèce recherchée en PCR spécifique	Si disponible	<p>Méthode : Analyse d'une dizaine d'ADN extraits correspondant à 10 échantillons positifs en culture et à l'examen direct.</p> <p>Résultats en annexe de la procédure de validation de chaque méthode.</p>
CONCLUSION		xxx

LIMITE DE DETECTION (portée B, facultatif en PCR qualitative)

EXIGENCE	BIBLIOGRAPHIE	VERIFICATION SUR SITE
Savoir apprécier la limite de concentration des bactéries concernées (PCR spécifiques) ou des bactéries les plus fréquemment rencontrées (PCR 16S), liée aux performances de la technique	Si disponible	<p>Méthode : Analyse des limites de détection sur les souches de référence des bactéries les plus fréquemment retrouvées (PCR 16S) ou de la bactérie recherchée (PCR spécifique).</p> <p>La limite de détection est établie en nombre de bactéries/ml ou en nombre de copies/μl pour les bactéries non cultivables.</p> <p>Résultats en annexe de la procédure de validation de chaque méthode</p>

Laboratoire de biologie médicale xxx	PROCEDURE GENERALE DE VALIDATION/ VERIFICATION D'UNE METHODE QUALITATIVE DE PCR EN TEMPS REEL BACTERIENNE PORTEE A OU B	Procédure xxx Version : Date d'application : Page :
--	--	--

COMPARAISON AVEC METHODE DÉJÀ UTILISEE

Méthode précédente, autres méthode utilisées dans le laboratoire	Nom de la méthode précédente
Nombre de mesures	Environ 20
Descriptif de l'échantillon étudié	ADN connus positifs et négatifs avec l'ancienne méthode
Méthode d'exploitation des résultats (étude des concordances)	Les résultats sont comparés avec ceux de la nouvelle méthode. Etude de discordance éventuelle et justification.
Résultats	Donnés sous la forme d'un tableau récapitulatif, en annexe de la procédure de validation de chaque méthode
Exigence	Sensibilités au moins égales. Praticabilité supérieure (si un kit est utilisé)

ROBUSTESSE (portée B)

Données bibliographiques	Si disponible
Vérification sur site	La robustesse est évaluée dans le cadre du suivi à long terme de la méthode (CQI et EEQ)
Conclusions et dispositions	Robustesse satisfaisante attendue

STABILITE DES REACTIFS APRES OUVERTURE

Les Master mix utilisés sont décongelés extemporanément puis conservés selon les recommandations des fournisseurs.

Les sondes et amorces diluées sont conservées au congélateur (préciser le délai de conservation).

Le mélange reconstitué est validé par le passage du CIQ.

Date

Biologiste

Méthode validée le
Utilisation sous accréditation à partir du

Laboratoire de biologie médicale xxx	PROCEDURE GENERALE DE VALIDATION/ VERIFICATION D'UNE METHODE QUALITATIVE DE PCR EN TEMPS REEL BACTERIENNE PORTEE A OU B	Procédure xxx Version : Date d'application : Page :
--	--	--

Annexe 1

VERIFICATION DE LA BONNE CONSERVATION DES ECHANTILLONS A +4°C

SOMMAIRE

1. BUT
2. MISE EN OEUVRE
3. RESULTATS
4. CONCLUSION

1. BUT

Les prélèvements sont conservés au réfrigérateur pendant 1 mois, pendant lequel il est possible de les ré-extraire en cas de besoin technique. Le but de la démarche est de vérifier que la conservation au réfrigérateur des prélèvements n'est pas préjudiciable pour la conservation de l'ADN bactérien qu'ils contiennent.

2. MISE EN OEUVRE

Différents prélèvements positifs sont conservés 1 mois au réfrigérateur, dans les conditions habituelles, puis ré-extraits. Des PCR spécifiques sont ensuite réalisées sur les extraits et les résultats obtenus sont comparés entre la première et la seconde extraction.

3. RESULTATS

Le chiffre entre parenthèses correspond au Ct.

		Résultats 1ère extraction	Résultats 2ème extraction	Date de la PCR
270429	biopsie	Bk + (33.9)	Bk + (33.5)	02/05/12
090181	Selles	Micro + (16.3)	Micro + (15.9)	11/04/12
090133	Abcès	Bk + (29.6)	Bk + (31.7)	11/04/12
060088	Expectoration	Mp + (27.7)	Mp + (25.2)	11/04/12
090095	Sécr. nasales	Bp + (7.3)	Bp + (13.8)	11/04/12
230197	Aspi. bronchique	Bp + (14.6)	Bp + (15.9)	24/04/12
200218	Sécr. rhino-pharyngées	Bp + (19.3)	Bp + (22.4)	24/04/12
210309	selles	Micro + (19.9)	Micro + (20.7)	24/04/12
200220	LBA	Pj + (36.3)	Pj + (33.8)	24/04/12

(Bp=*Bordetella pertussis*, Mp=*Mycoplasma pneumoniae*, Ct=*Chlamydiae trachomatis*,
Micro=*Microsporidie*, Pj=*Pneumocystis jiroveci*)

Les résultats bruts sont archivés dans le classeur « Validation de Méthode », pièce BM.

4. CONCLUSION

100% de concordance. Nos conditions de conservation des prélèvements sont donc validées.

Laboratoire de biologie médicale xxx	PROCEDURE GENERALE DE VALIDATION/ VERIFICATION D'UNE METHODE QUALITATIVE DE PCR EN TEMPS REEL BACTERIENNE PORTEE A OU B	Procédure xxx Version : Date d'application : Page :
--	--	--

Annexe II

VERIFICATION DE LA NON CONTAMINATION ENTRE ECHANTILLONS AU COURS DE LEUR EXTRACTION

SOMMAIRE

1. BUT
2. MISE EN OEUVRE
3. RESULTATS
4. CONCLUSION

1. BUT

Le MagNA Pure permet d'extraire 32 échantillons simultanément.

Le but de la manipulation est de valider l'étape d'extraction par l'automate d'extraction MagNA Pure, en faisant alterner une extraction d'échantillons fortement positifs pour une cible donnée et une extraction d'eau, afin de vérifier la non-contamination inter-échantillons lors de la procédure d'extraction puis de PCR. La cible choisie est *Bordetella pertussis* (Bp), car la plus susceptible de donner lieu à des contaminations (inoculum souvent élevé)

Le résultat attendu est une absence de contamination.

2. MISE EN OEUVRE

Un pool de prélèvements très fortement positifs à Bp est réalisé.

Un run d'extraction est lancé en alternant des échantillons positifs et de l'eau, en damier.

Plan du run d'extraction MagNa Pure :

+	-	+	-
-	+	-	-
+	-	+	-
-	+	-	-
+	-	+	-
-	+	-	-
+	-	+	-
-	+	-	-

Une PCR Bp est ensuite réalisée avec chaque extrait (cf procédure Bp)

Laboratoire de biologie médicale xxx	PROCEDURE GENERALE DE VALIDATION/ VERIFICATION D'UNE METHODE QUALITATIVE DE PCR EN TEMPS REEL BACTERIENNE PORTEE A OU B	Procédure xxx Version : Date d'application : Page :
--	--	--

3. RESULTATS

Plan de plaque de la PCR réalisée

Manp du : 27.04.12

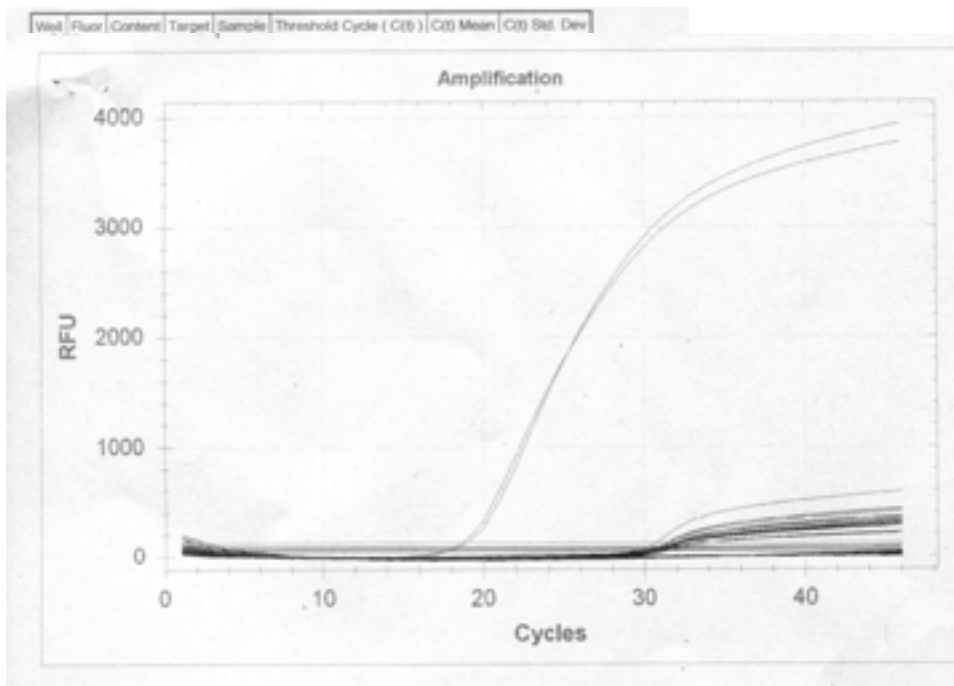
PCR Bacterio/Mycro Ep Test Conto

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A1	*	A2	A3	A4	A5	A6 1 ⊖	A7 17 ⊖	A8 23 ⊖	A9	A10	A11	A12
B1		B2	B3	B4	B5	B6 3 ⊖	B7 19 ⊖	B8 30 ⊖	B9	B10	B11	B12
C1		C2	C3	C4	C5	C6 5 ⊖	C7 21 ⊖	C8 31 ⊖	C9	C10	C11	C12
D1		D2	D3	D4	D5	D6 7 ⊖	D7 23 ⊖	D8 32 ⊖	D9	D10	D11	D12
E1		E2	E3	E4	E5	E6 10 ⊖	E7 25 ⊖	E8 13 ⊖	E9	E10	E11	E12
F1		F2	F3	F4	F5	F6 12 ⊖	F7 26 ⊖	F8 2 ⊖	F9	F10	F11	F12
G1		G2	G3	G4	G5	G6 14 ⊖	G7 24 ⊖	G8	G9	G10	G11	G12
H1		H2	H3	H4	H5	H6 16 ⊖	H7 28 ⊖	H8	H9	H10	H11	H12

Feuille Primers et Sondes :

Lot Kit Magna :
Lot Mix Eurogentec : 40/14 C
Lot Mix Qiagen :

Résultats :



Laboratoire de
biologie médicale
xxx

**PROCEDURE GENERALE DE VALIDATION/
VERIFICATION D'UNE METHODE
QUALITATIVE DE PCR EN TEMPS REEL
BACTERIENNE PORTEE A OU B**

Procédure xxx
Version :
Date d'application :
Page :

Pré-analytique

Analytique

Post-analytique

Well	Fluor	Content	Target	Sample	Threshold Cycle (C(t))	C(t) Mean	C(t) Std. Dev
A06	Cy5	NTC		Bp/Bpp	31.09	31.09	0.000
A07	Cy5	NTC		Bp/Bpp	30.23	30.23	0.000
A08	Cy5	NTC		Bp/Bpp	31.39	31.39	0.000
B06	Cy5	NTC		Bp/Bpp	31.74	31.74	0.000
B07	Cy5	NTC		Bp/Bpp	31.25	31.25	0.000
B08	Cy5	NTC		Bp/Bpp	29.80	29.80	0.000
C06	Cy5	NTC		Bp/Bpp	30.87	30.87	0.000
C07	Cy5	NTC		Bp/Bpp	30.64	30.64	0.000
C08	Cy5	NTC		Bp/Bpp	31.11	31.11	0.000
D06	Cy5	NTC		Bp/Bpp	30.97	30.97	0.000
D07	Cy5	NTC		Bp/Bpp	31.66	31.66	0.000
D08	Cy5	NTC		Bp/Bpp	31.15	31.15	0.000
E06	Cy5	NTC		Bp/Bpp	31.13	31.13	0.000
E07	Cy5	NTC		Bp/Bpp	30.58	30.58	0.000
E08	Cy5	NTC	+	Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
F06	Cy5	NTC		Bp/Bpp	31.11	31.11	0.000
F07	Cy5	NTC	+	Bp/Bpp	30.65	30.65	0.000
F08	Cy5	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
G06	Cy5	NTC		Bp/Bpp	30.78	30.78	0.000
G07	Cy5	NTC		Bp/Bpp	30.40	30.40	0.000
H06	Cy5	NTC		Bp/Bpp	31.06	31.06	0.000
H07	Cy5	NTC		Bp/Bpp	31.17	31.17	0.000
A06	FAM	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
A07	FAM	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
A08	FAM	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
B06	FAM	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
C07	FAM	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
C08	FAM	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
D06	FAM	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
D07	FAM	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
D08	FAM	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
E06	FAM	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
E07	FAM	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
E08	FAM	NTC		Bp/Bpp	18.35	18.35	0.000
F06	FAM	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
F07	FAM	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
F08	FAM	NTC		Bp/Bpp	18.13	18.13	0.000
G06	FAM	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
G07	FAM	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
H06	FAM	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
H07	FAM	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
A06	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
A07	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
A08	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
B06	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
B07	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
B08	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
C06	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
C07	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
C08	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
D06	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
D07	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
D08	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
E06	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
E07	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
E08	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
F06	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
F07	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
F08	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
G06	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
G07	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
H06	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000
H07	VIC	NTC		Bp/Bpp	N/A	0.00	0.000

Laboratoire de biologie médicale xxx	PROCEDURE GENERALE DE VALIDATION/ VERIFICATION D'UNE METHODE QUALITATIVE DE PCR EN TEMPS REEL BACTERIENNE PORTEE A OU B	Procédure xxx Version : Date d'application : Page :
--	--	--

Tous les extraits attendus négatifs sont bien retrouvés négatifs (seuls 2 puits positifs ont été testés en PCR parmi ceux qui ont été extraits)

4. CONCLUSION

Il n'y a pas de contamination inter-échantillons lors de l'extraction avec l'automate d'extraction utilisé.

9. IDENTIFICATION BACTERIENNE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Sont indiquées en italique les parties à remplir spécifiquement par les laboratoires.

9. 1. OBJET DU DOCUMENT

Ce document détaille la méthode d'identification bactérienne par spectrométrie de masse sur colonies bactériennes, et notamment la vérification/validation de méthode, selon les recommandations du SH GTA 04.

9. 2. DOMAINE D'APPLICATION

L'identification bactérienne est une étape essentielle du diagnostic bactériologique. Pendant longtemps, elle était possible grâce à un ensemble de méthodes conventionnelles (morphologie des colonies, hémolyse, coloration de Gram, caractères culturels et biochimiques par exemple) qui constituent le diagnostic phénotypique. Plus récemment, les techniques de biologie moléculaire ont bouleversé l'identification des microorganismes et ont permis de mettre en évidence les insuffisances et les limites de l'identification phénotypique. Encore plus récemment, est apparue une nouvelle technique d'identification : la spectrométrie de masse, technologie basée sur l'analyse des protéines ribosomiques et membranaires composant une cellule bactérienne.

Classiquement, la spectrométrie de masse est une technique de choix pour l'étude des composés organiques et des biomolécules.

Une des applications de la spectrométrie de masse est l'identification des bactéries et l'identification des champignons (levures, filamenteux).

Cet appareillage est en plein essor dans les laboratoires de microbiologie pour plusieurs raisons :

- simplicité d'utilisation
- rapidité des résultats
- faible coût d'utilisation après acquisition
- fiabilité des résultats avec identification concordante d'environ 95% des espèces couramment isolées en bactériologie humaine

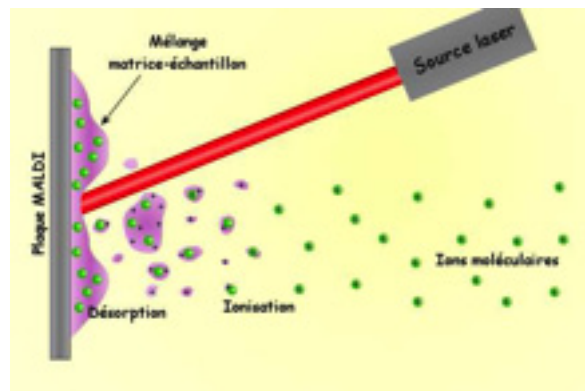
D'autres applications en bactériologie sont envisagées et en cours de développement: comparaison de souches, étude de facteurs de virulence, détection de résistance aux antibiotiques.

9. 3. PRINCIPE DE LA METHODE

Les spectromètres de masse utilisés en biologie médicale pour l'identification de microorganismes sont de type MALDI TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight= désorption-ionisation laser assistée par matrice-temps de vol). La matrice est capable de transférer les protons sur les protéines et d'absorber les rayons UV. Un laser UV intégré au spectromètre irradie ensuite le composite matrice-échantillon, entraînant l'évaporation rapide et la libération de protéines chargées positivement. Ces ions sont accélérés électrostatiquement sur une courte distance et entrent dans le tube de vol à une vitesse dépendant de la masse. Les protéines ionisées présentant différentes masses, leurs ions arrivent au détecteur après différentes périodes de temps (temps de vol). La mesure du temps (échelle en nanoseconde) entre l'accélération en impulsion et les signaux correspondant du détecteur, peut alors être convertie en rapport masse/charge (noté m/z), et en masse moléculaire pour les ions monovalents majoritaires.

Un spectromètre de masse est composé de trois éléments principaux :

- une source d'ions dans laquelle se produisent le passage à l'état gazeux, l'ionisation et la décomposition des ions
- un analyseur où sont triés les ions en fonction de leur rapport m/z
- un détecteur dont le rôle est de compter les ions



Principe du MALDI TOF (Wikipedia)

9. 4. PRESENTATION DE LA TECHNIQUE

Le test est réalisé avec une petite quantité de bactéries prélevée sur une gélose. L'échantillon est transféré sur une position de la cible MALDI (porte-échantillon). Après séchage à l'air, de la matrice est ajoutée sur la totalité de l'échantillon. La matrice cristallise pendant le séchage à l'air. La préparation des échantillons est alors terminée et la cible peut être évaluée.

Différentes matrices sont commercialisées et permettent d'obtenir des spectres plus ou moins riches, avec des plages de masses moléculaires différentes :

- l'acide 4-cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA)
- l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB)
- l'acide sinapinique

La préparation et le dépôt des échantillons peuvent différer: dépôt direct, extraction rapide avec l'acide formique sur la plaque et extraction à l'acétonitrile.

Le spectromètre de masse est couplé à un logiciel dédié à l'interprétation des spectres protéiques obtenus. Le logiciel analyse les protéines intrinsèques des micro-organismes. Le profil protéique (spectre de masse) de la souche étudiée est comparé aux entrées référencées dans la base de données. L'identification est établie en termes de niveaux de fiabilité biostatistique, sur la base d'une corrélation entre le spectre acquis et les spectres de référence. La congruence des spectres est représentée par une valeur numérique (« $\log(\text{score})$ » = score) entre 0 et 3, par un pourcentage de similitude ou par un pourcentage de degré de confiance.

Pour les systèmes non fermés, il est possible de créer sa propre base de spectres. Par contre, ce n'est plus possible quand la base est marquée CE-IVD. L'ajout de spectres n'est alors possible que par le fournisseur, lors des mises à jour.

La spécificité diagnostique de la technique est bonne (bibliographie).

Les discordances d'identification peuvent dans certains cas s'expliquer par le fait qu'à l'heure actuelle, avec les algorithmes utilisés, la distinction entre deux ou plusieurs espèces n'est pas possible, selon les bases de données (exemples : *Shigella/Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae/mitis/oralis*, *Neisseria gonorrhoeae/meningitidis*).

**EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE :
IDENTIFICATION BACTERIENNE
PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DE TYPE MALDI TOF (PORTEE A)**

Pré-analytique

DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte/Mesurande	Identification bactérienne à partir de colonies et d'extraits de colonie
Principe de la Mesure	Spectrométrie de masse
Méthode de mesure	Comparaison d'un spectre protéique à une banque de données
Marquage CE (Oui/Non)	OUI/NON
Codage C.N.Q. (s'il existe)	néant

Analytique

MISE EN OEUVRE

Opérateurs (Habilitation)	Personnes habilitées (cf liste)
Procédure de validation	Procédure de validation de méthode qualitative
Procédure de gestion de la portée flexible	Procédure de gestion de la portée flexible
Période d'évaluation	
Date de mise en service	
Autorisation par	Nom, prénom du biologiste validant la méthode

Post-analytique

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs	Qualité du dépôt bactérien et du dépôt de la matrice	Formation et habilitation du personnel
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...)	néant	néant
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	Personnel habilité	Habilitation du personnel (Cf grille d'habilitation pour chaque technicien)
Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,...)	Appareil sensible aux variations de température, à l'empoussièrement	Contrôle de la température de la pièce
Référence du réactif (référence fournisseur, version)	Liste des réactifs (à indiquer en <i>annexe</i>)	Réactifs marqués CE
Matériau de références (témoins)	- Souche calibrant et contrôle interne - CIQ - EEQ	- Souche calibrant et contrôle interne marquée CE ; passage à chaque projet Passage à chaque projet - CIQ : périodicité à définir - EEQ : nom et fréquence de l'EEQ si disponible
Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	a) Spectromètre de masse MALDI TOF, fournisseur X b) Cible c) Logiciel Y	a) Maintenances du fournisseur b) Nettoyage de la cible selon protocole du fabricant, si plaque non jetable ; contrôle visuel de la cible avant utilisation c) Connaître la liste des espèces disponibles dans la base de données ; nombre de mises à jour annuelles prévues par le fournisseur ; impact(s) des modifications des bases, évalué(s) par le fabricant ; critères de validation technique basés sur le score et la répétabilité

* item à renseigner si nécessaire

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

SPECIFICITE & SENSIBILITE DIAGNOSTIQUES

Résultats de l'étude des courbes ROC à partir d'une étude clinique :	NA
--	----

CONTAMINATION

Inter échantillon pour les paramètres sensibles :	OUI : Alternance de puits avec matrice seule et de matrice+bactérie
(N ≥ 6)	
Inter réactif si nécessaire :	NON
Vérification bibliographique :	NON
Vérification sur site :	absence de contamination entre échantillons déposés sur la cible

COMPARAISON DE METHODES

Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire	Comparaison avec autre méthode d'identification et/ou méthode de référence (ARNr 16S, sodA)
Nombre de mesures	N ≥ 50, en fonction de l'activité du laboratoire
Descriptif de l'échantillon étudié	Identification des espèces bactériennes les plus fréquentes en routine
Méthode d'exploitation des résultats (études des concordances)	Concordance avec séquençage : <i>score/ % similitude/% degré de confiance</i>
Résultats et interprétations des discordances	Résultats conformes
Conclusions et disposition	Conformité

ROBUSTESSE

Données bibliographiques	OUI
Résultats	Fonction de l'« âge » des cultures; Fonction des milieux de culture à partir desquels les colonies sont prélevées ; dans le cas de cultures conservées à +4°C
Conclusions et dispositions :	Conformité

STABILITE

Données bibliographiques	NON/données fournisseur
Résultats	NA
Conclusions et dispositions	NA

Commentaires éventuels :

9. 5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A compléter en fonction de son spectromètre de masse et de son activité.

1. NF EN ISO 15189. Norme européenne, norme française. Laboratoires d'analyses de biologie médicale-Exigences particulières concernant la qualité et la compétence. 2007.
2. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale, document SH GTA 04, révision 00- Avril 2011. COFRAC Section Humaine.
3. European Manual of Clinical Microbiology. 1rst edition (2012).SFM-ESCMID.
4. Gravet A, Camdessoucens-Miehé G. Application de la spectrométrie de masse à la microbiologie. RFL. Déc 2011. 55-64.

10. EXAMEN MICROBIOLOGIQUE DES SELLES PROCEDURE DE VERIFICATION D'UNE METHODE QUALITATIVE PORTEE A :

Les gastro-entérites aiguës sont fréquentes. Leur étiologie est principalement virale (Rota-, Adéno-, Noro-, Astro- et Corona-virus), parfois bactérienne et rarement fongique. Le diagnostic est utile lorsqu'il existe un enjeu pronostique ou un impact épidémiologique, par exemple : chez le nourrisson, dans les formes sévères, chez le patient immunodéprimé, en cas d'origine nosocomiale ou de cas groupés.

Ainsi la coproculture est justifiée :

- pour une diarrhée aiguë dans un contexte clinique évocateur d'une origine bactérienne (fièvre, selles glaireuses ou sanglantes, douleur abdominale, retour de zone endémique par exemple) ou dans certains contextes particuliers : comme celui d'une toxi-infection aiguë communautaire (TIAC).
- pour une diarrhée chronique, uniquement chez le patient immunodéprimé.

La culture et l'identification des levures et filamenteux est utile chez le patient immunodéprimé.

La recherche de *Clostridium difficile* et/ou de ces toxines est recommandée chez tout patient présentant une diarrhée post-antibiotique qu'il soit hospitalisé ou non.

La connaissance du contexte clinique permet un examen microbiologique pertinent.

La coproculture repose sur la culture des selles sur des milieux adaptés, tels que bouillons d'enrichissement et milieux sélectifs et incubés dans des conditions d'atmosphère et de température recommandées. L'ensemencement peut être manuel ou automatisé.

L'analyse microbiologique est une méthode qualitative permettant d'identifier le ou les micro-organismes pathogènes, et leur sensibilité aux antibiotiques.

NB : Ce document concerne la coproculture standard, la culture et/ou la recherche des toxines de *C. difficile* et la recherche de virus. La recherche d'EHEC ou le portage de BMR ne sont pas abordés.

Les recherches spécifiques de levures ou de virus concernent la famille « parasitologie-mycologie » ou « virologie », qui sont distinctes de la famille « bactériologie ».

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande	Recherche de bactéries, levures ou virus entéropathogènes Recherche de portage de <i>Salmonella</i> ou <i>Shigella</i> Recherche de l'antigène (Ag) et/ou des toxines de <i>C.difficile</i>
Principe de la Mesure	<ul style="list-style-type: none"> • Examen macroscopique • Examen microscopique direct • Culture • Identification bactérienne (et/ou fongique) • Etude de la sensibilité aux antibiotiques En fonction du contexte clinique : <ul style="list-style-type: none"> • Recherche des toxines et/ou antigène de <i>C. difficile</i> par immuno-essai ou biologie moléculaire
Méthode de mesure	qualitative
Marquage CE (Oui/Non)	oui

MISE EN OEUVRE	
Opérateurs (Habilitation) :	Liste gérée des habilitations du personnel
Procédure de validation :	Méthode qualitative, nommer la procédure de validation générale
Procédure de gestion de la portée flexible :	Procédure générale du laboratoire de la gestion de portée
Type de portée	Portée flexible A
Période d'évaluation :	A définir
Date de mise en service :	
Date de début de rendu sous accréditation	
Autorisation par :	Nom du ou des biologistes validant la méthode

Objectifs :

- Obtention de colonies isolées en culture, permettant l'identification des bactéries/levures pathogènes selon les méthodes utilisées au laboratoire
- Détection rapide d'antigène (Ag) ou de toxines
- Prestation de conseils : relecture pertinente de la prescription en fonction des renseignements cliniques, différenciation portage/infection, conseils thérapeutiques
- Respect des recommandations des sociétés savantes :

Exemple de référentiels : REMIC 2010

Contexte	Entéropathogènes	Technique(s)	Commentaires
Coproculture standard	<i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Campylobacter</i>	Culture +/- agglutination	
< 20 ans	Coproculture standard + <i>Yersinia</i>	Culture	
Voyage récent en pays tropical	Coproculture standard + <i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> <i>Plesiomonas shigelloïdes</i> <i>Aeromonas</i> <i>ETEC*</i> , <i>EIEC</i>	Culture	Si syndrome cholériforme, recherche de <i>Vibrio</i> = urgence Déclaration obligatoire * ETEC , étiologie fréquente mais habituellement non recherchée
Antibiothérapie récente	<i>Clostridium difficile</i>	Recherche de la GDH et ou des toxines +/- culture	Ville ou hôpital. Existence de diarrhées à <i>Clostridium</i> en dehors de toute antibiothérapie

Contexte	Entéropathogènes	Technique(s)	Commentaires
Diarrhées sanglantes	Coproculture standard + Vérotoxines/ shigatoxines E. coli O157 ETEC	Recherche des toxines +/- culture +/- agglutination	
TIAC	Incubation longue (12-76h) Coproculture standard + V. parahaemolyticus Plesiomonas shigelloïdes Clostridium perfringens Bacillus cereus Aeromonas		Déclaration obligatoire V. parahaemolyticus et Plesiomonas shigelloïdes (poissons crus, fruits de mer)
	Incubation courte (1-4h) S. aureus +/- toxines B. cereus +/- toxines	Recherche des toxines +/- culture	A rechercher dans l'aliment par des centres spécialisés
Epidémies de gastro- entérites virales	<i>Norovirus</i> <i>Rotavirus</i>	Test rapide par immuno-analyse ou biologie moléculaire	
Gastro- entérites nosocomiales virales	Rotavirus Adenovirus ...	Immunodétection ou RT-PCR	
Coprocultures réglementaires	Salmonella		Recherche de portage chez le personnel de restauration.
	Shigella, STEC		2 coprocultures négatives à 24h d'intervalle pour la réintégration en collectivité

MAITRISE DES RISQUES Phase pré-analytique		
Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise et documentation
Matériel	Qualité des pots de recueil avant utilisation ± milieu de transport	- Propre, à usage unique, étanche, marquage CE - cf manuel de prélèvement
	Conformité de la demande : - Identification du prélèvement - Identité et âge du patient - renseignements cliniques	- Date et heure du prélèvement (surtout en l'absence de milieu de transport) - Recherche active des renseignements cliniques: voyage, symptômes, traitement antibiotique, notion d'épidémie...
Matière	Qualité de l'échantillon	- Critères de réalisation définis et contrôlés à la réception des échantillons - Contrôle à la réception avec des critères d'acceptation définis - Traçabilité des dysfonctionnements et non-conformités, mention d'un commentaire sur le compte-rendu
Méthode	Méthode de prélèvement	Protocole décrit dans le manuel de prélèvement
	Délai et conditions de transport	Document écrit précisant : - température et délai d'acheminement entre prélèvement (service, domicile, laboratoire) et site d'analyse Exemple : 4h à température ambiante, 12h à +4°C si selles liquides/sanglantes, 48h si milieu de transport - température et délai entre réception sur site d'analyse et ensemencement
	Enregistrement de l'échantillon	- Procédures diffusées et appliquées : vérification de l'identité, accueil des patients, saisie d'un dossier, critères de refus de l'échantillon et conduite à tenir - Formation et habilitation du personnel

MAITRISE DES RISQUES Phase pré-analytique		
Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise et documentation
Main d'œuvre	Compétences du personnel Information du patient	<ul style="list-style-type: none"> - Manuel de prélèvement - Formation et habilitation du personnel : préleveurs, enregistrement des demandes, réception des prélèvements - Information patient : fiche avec modalités de prélèvement et demande de renseignements cliniques par exemple - Prestation de conseil : évaluation de la prescription en fonction du contexte clinico-biologique et thérapeutique (âge, ville/hôpital, durée d'hospitalisation, aspect de la selle, séjour en zone d'endémie, antibiothérapie, symptômes, notion d'épidémie par exemple) et appel du prescripteur si besoin - Convention entre l'établissement de soins et le laboratoire
Milieu	Conditions de stockage des milieux de transport avant utilisation	Si milieu de transport : local de stockage adapté, maîtrise de la température
Matière	Hétérogénéité de la selle	- Prélever une fraction suspecte (mucopurulente, sanglante)
	Colonies : quantité, qualité, âge et pureté	Cf document spécifique « ensemencement, culture et reconnaissance des colonies »
	Matériau pour CIQ, EEQ	<ul style="list-style-type: none"> - Existence de souches de référence : <i>S. typhimurium</i>, <i>S. sonnei</i>, <i>Y. enterocolitica</i>, <i>Campylobacter</i> par les CNR - Souchothèque interne au laboratoire - Cf document spécifique « CQ en microbiologie »

MAITRISE DES RISQUES Phase analytique		
Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise et documentation
Matériel et équipement	Petit matériel : ose, pastette...	- marquage CE - matériel stérile et à usage unique
	Réactifs Milieux d'enrichissement Milieux de culture (liste détaillée en annexe ?)	- traçabilité des lots à la réception du fournisseur - fiches techniques des fournisseurs - fiches de stress et de conformité des milieux - procédure de gestion et de conservation des réactifs - réactovigilance
	Enceintes thermostatées (étuve, réfrigérateur, congélateur)	-Maîtrise métrologique
	Atmosphère d'incubation	- Surveillance, enregistrement et contrôle des conditions d'incubations (CO2, micro aéroophile et anaérobiose)
	Automate (ensemencement, colorateur de lame, identification, antibiogramme...)	- cf validation de méthode correspondante
	Microscope	Existence d'un mode opératoire, nettoyage respecté
	PSM II	- procédure d'utilisation et de nettoyage, contrôle annuel
	Informatique	-Vérification des connexions (SIL- automate - serveur...) Gestion des versions
Main d'œuvre	Opérateurs	-Personnel habilité et formé aux différents postes

MAITRISE DES RISQUES Phase analytique		
Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise et documentation
Méthode	Ensemencement (manuel ou automate) Choix des milieux de culture ou des kits	<ul style="list-style-type: none"> - Modes opératoires diffusés et appliqués - Milieux appropriés aux microorganismes recherchés selon les recommandations des sociétés savantes, et le contexte clinico-biologique - Performances évaluées par étude bibliographique. - Ecologie du laboratoire constitue un bon indicateur des performances de culture (annexe) - Choix des kits : marquage CE, analyse bibliographique, EEQ
	Lecture des cultures : reconnaissance des pathogènes	<ul style="list-style-type: none"> - Formation et habilitation et évaluation du personnel - Connaissance des pathogènes : formation continue - Evaluation avec des critères objectifs - Ex : Dossiers à problèmes revus par le biologiste = indicateur de formation
	Tests d'orientation (catalase, oxydase...)	<ul style="list-style-type: none"> - Formation et habilitation du personnel - Modes opératoires diffusés et appliqués - Agglutination des souches de <i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i>
	Recherche d'Ag ou de toxines (immuno-chromatographie, immuno-enzymologie ou biologie moléculaire)	<ul style="list-style-type: none"> - Modes opératoires diffusés et appliqués
	Identification	<ul style="list-style-type: none"> - Voir document spécifique « identification » - Confrontation avec les résultats des CNR le cas échéant
	Antibiogramme	<ul style="list-style-type: none"> - Voir document spécifique « antibiogramme »

MAITRISE DES RISQUES Phase analytique		
Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise et documentation
Milieu	Environnement	<ul style="list-style-type: none">- Suivi de la température du local, climatisation- Environnement conforme aux recommandations constructeur des automates le cas échéant
	Risque de contamination	<ul style="list-style-type: none">- Procédure de nettoyage et de désinfection des surfaces- Hygiène et sécurité, gestion des DASRI- Mode opératoire pour l'utilisation des PSM II- Document unique

MAITRISE DES RISQUES Phase post-analytique		
Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise et documentation
Matériel	Moyens de transmission des comptes rendus Système informatique	- Procédure écrite
Matière	Conservation des prélèvements et des souches après analyse	-Procédure écrite de conservation des prélèvements (température et durée) -Procédure écrite de gestion de la souchothèque du laboratoire
	Données informatiques, compte-rendus	-Procédure écrite
Méthode	Saisie des résultats dans l'informatique	- Double saisie ou vérification des saisies manuelles - Traçabilité des opérateurs
	Validation biologique	- Interprétation en fonction du contexte clinico-biologique - Procédure écrite de validation biologique - Procédure écrite de transmission des résultats - Gestion des Alertes, maladies à Déclaration Obligatoire - Envoi de certaines souches à des réseaux : identification difficile, phénotypes particuliers, intérêt épidémiologique, CNR... - Traçabilité des prestations de conseils
	Transmission des résultats	- Procédure écrite de transmission (téléphone, fax, serveur, papier...) - Vérification de l'intégrité de l'information envoyée au prescripteur / service
Main d'œuvre	Secrétaires, techniciens, internes, biologistes, personnel d'entretien	- Formation et habilitation du personnel
Milieu	Conditions de conservation des archives papier	- Support de sauvegarde - Lieux de stockage appropriés

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Examen direct :

L'évaluation des performances de l'examen direct manuel repose en grande partie sur l'habilitation du personnel.

Ensemencement, Culture :

Pour la répétabilité et la reproductibilité de l'ensemencement ou de la culture, se référer au document spécifique « ensemencement, culture et reconnaissance des colonies ».

En cas d'ensemencement, se référer au dossier de validation de méthode dédié à l'automate.

Recherche de toxine ou d'Ag par immuno-chromatographie :

Validation bibliographique

SPECIFICITE ET SENSIBILITE DIAGNOSTIQUES (modèle)

<p>Milieu de culture Bouillon d'enrichissement Réactif</p> <p>NOM, fournisseur, Référence</p>	<p>1) fiche produit fournisseur Préciser la méthode de référence utilisée pour l'étude</p> <ul style="list-style-type: none"> - sensibilité - spécificité - réactions croisées connues si mentionnées - autre (précision, concordance, VPP, VPN) - fréquence de colonisation et portage sain <p>2) données de la littérature (par exemple, à adapter à ses réactifs):</p> <p>3) données EEQ</p>
---	--

Exemple 1

<p>Recherche combinée GDH et toxine de <i>C.difficile</i></p> <p>XXXXXX</p>	<ul style="list-style-type: none"> - sensibilité : 86 % pour la toxine, 90,7% pour la GDH (N=289) - spécificité : 100 % pour la toxine, 95.1% pour la GDH (par rapport à la technique de référence, concordance 99%) <p>Etude d'évaluation du kit XXXXX</p>
---	---

Exemple 2

Recherche d'Adeno et de Rotavirus XXXXXX	- sensibilité : 100% (N=103) (par rapport à un autre test ICT, concordance 96.1%) - spécificité : 97.6% (N=42) (par rapport à un autre test ICT, concordance 97.6%) - Pas de réaction croisé avec des bactéries ou des virus pouvant être présents dans les selles Fiche technique XXXX
---	--

CONTAMINATION

L'évaluation de la contamination inter-échantillons en méthode manuelle ne peut pas être réalisée selon les recommandations du SH GTA04 car chaque échantillon est lu individuellement.

Elle est utile en cas d'utilisation d'un ensemenceur automatisé (cf dossier de validation dédié).

COMPARAISON DE METHODES (qualitatif)

La comparaison de méthode n'est utile que si la méthode en question est nouvelle dans le laboratoire. C'est le cas des exemples suivants :

- qualification d'un nouveau colorateur de Gram
- qualification d'un ensemenceur automatisé pour vérifier la comparabilité des résultats avec la méthode manuelle
- changement de technique (arrêt d'une technique immuno-chromatographique au profit de la biologie moléculaire par exemple)

Date

Biologiste

Méthode validée le
Utilisation sous accréditation à partir du

Références

1. Référentiel en microbiologie médical (REMIC), 4ème édition 2010, SFM
2. Précis de bactériologie clinique J. Freney, F. Renaud, R. Leclercq, P. Riegel ESKA 2007
3. Manual of clinical microbiology J. Versalovic and al, book ISBN 2011
4. Bactériologie Médicale pratique, J.P. Flandrois, M. Chomarat, Collection le laboratoire Edition MEDSI/Mc graw - Hill 1988
5. Toxi Infection alimentaires collectives 2006 à 2008 BEH 2010 31-32
6. Epidémies hivernales de gastro entérites en France 2006 à 2009 BEH 2010 31-32
7. Enquête nationale des infections à Yersinia enterocolitica BEH 2010 29
8. Diarrhée infectieuse C. Eloy Feuillet de Biologie 2004, 35 : 261 p 17-18
9. Rousée JM, Rieder C, Gueudet. Peut-on standardiser l'ensemencement en bactériologie? A propos de l'automate PREVI Isola (bioMerieux). T. RICAI, 2009
10. M Crobach, O Dekkers, M Wilcox, E Kuijper. Data review and recommendations for diagnosing Clostridium difficile-infection (CDI). CMI 2009; 15, 1053–1066.
11. Bessede E, Mégraud F. Identification of Campylobacter species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. Clin Microbiol Infect. 2011 Nov;17(11):1735-9
12. He Y, Li H, Lu X, Stratton CW, Tnag YW. Mass spectrometry biotyper system identifies enteric bacterial pathogens directly from colonies grown on selective stool media. J Clin Microbiol. 2010 Nov;48(11):3888-92

11. EXAMEN MICROBIOLOGIQUE DU LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN (LCR) - (EXAMEN MICROSCOPIQUE ET RECHERCHE DE MICRO-ORGANISMES CULTIVABLES) METHODE QUALITATIVE PORTEE A

L'examen microbiologique du liquide céphalorachidien (LCR) comporte un examen microscopique pour la recherche de cellules (numération et formule leucocytaire par la coloration de May Grunwald Giemsa), une recherche de bactéries par la coloration de Gram, une mise en culture avec identification bactérienne et antibiogramme +/- la recherche d'antigènes solubles +/- . La recherche de cryptocoques dans un contexte d'immunodépression fait l'objet d'une analyse distincte dans le cadre des examens de mycologie. Il est cependant recommandé de signaler toute suspicion de levures à l'examen direct.

Cette recherche, à l'exception des LCR de dérivation de neurochirurgie, est **toujours un examen urgent**, dans un contexte soit communautaire, soit nosocomial. Les germes à rechercher en priorité seront alors différents.

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande	Recherche de bactéries (et de levures*) cultivables dans le LCR
Principe de la Mesure	<ul style="list-style-type: none"> • Examen macroscopique • Examen direct microscopique, sans et avec coloration • Culture avec identification bactérienne et fongique • En fonction du contexte clinique : <ul style="list-style-type: none"> - Recherche d'antigènes solubles <i>S. pneumoniae</i>** par immunochromatographie - Recherche d'antigènes solubles, tels Cryptocoques et Pneumocoques**
Méthode de mesure	examen microscopique direct et culture
Marquage CE (Oui/Non)	Oui

* la recherche spécifique de levures concerne la famille « Parasitologie-Mycologie », distincte de la famille « Bactériologie »

** les recherches spécifiques d'antigènes solubles concernent des lignes de portée distinctes au sein des familles « Bactériologie » et « Mycologie ».

Selon la structure du LBM, certaines techniques mycologiques sont réalisées dans des laboratoires de spécialités différentes.

MISE EN OEUVRE	
Opérateurs (Habilitation) :	Personnes habilitées (techniciens, internes, biologistes)
Procédure de validation :	Méthode qualitative
Procédure de gestion de la portée flexible :	Procédure générale du laboratoire xxx
Type de portée	A déterminer
Période d'évaluation :	
Autorisation par :	Nom du biologiste validant la méthode

MAITRISE DES RISQUES Phase préanalytique		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Matériel	Qualité des flacons de recueil avant utilisation	- Choix des récipients primaires : - Stérilité (gestion des dates de péremption) - Etanchéité -Cf manuel de prélèvement
	Conformité de la demande : • identité du patient • information clinique	- Contrôle à la réception avec critères d'acceptabilité définis - Traçabilité du préleveur et du prescripteur - Heure de prélèvement
Matière	Quantité d'échantillon	Non conformité en cas de quantité insuffisante
	Qualité de l'échantillon : contamination lors du prélèvement	- Procédure diffusée connue et appliquée (manuel de prélèvements) - Commentaire biologique sur le résultat final en cas de contamination avérée après interprétation de la culture
	Délai entre réception du prélèvement et examen microscopique le plus court possible	-Non conformité en cas de délai dépassé -Procédure de gestion des examens urgents diffusée et appliquée -Acheminement des prélèvements sans délai (délai maximum à définir pour chaque laboratoire)

MAITRISE DES RISQUES Phase préanalytique		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Milieu	Conditions de stockage des flacons avant utilisation	-Local de stockage adapté
Méthode	Antisepsie du site de prélèvement Méthode de prélèvement	- Recommandations d'antisepsie figurant sur le manuel de prélèvement - Procédure de prélèvement diffusée, connue et appliquée

MAITRISE DES RISQUES Phase analytique (examen direct, mise en culture)		
Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise et documentation
Main d'oeuvre	<p>- Examen direct à l'état frais: macroscopique microscopique : reconnaissance des éléments et appréciation quantitative des cellules</p> <p>- Lecture des colorations : MGG : formule Gram : morphologie des germes Ziehl, auramine : morphologie des germes</p> <p>Ensemencement : -Conditions de stérilité -Connaissance des milieux de culture à ensemercer et de l'atmosphère d'incubation</p> <p>Lecture des cultures : -Connaissance des pathogènes à identifier</p>	<p>-- Formation et habilitation du personnel à toutes les étapes de l'analyse : CIQ, EEQ cytologie, coloration, ensemencement et lecture des cultures</p> <p>- Vérification des compétences en cytologie: possibilité d'utiliser des CIQ et des EEQ commercialisés (CIQ : au moins 2 niveaux de quantités de cellules sont conseillés pour l'appréciation quantitative)</p> <p>- Vérification des compétences en lecture de Gram (Ziehl) + formule : lecture d'au moins 10 lames</p> <p>- Connaissance du mode opératoire</p>

MAITRISE DES RISQUES Phase analytique (examen direct, mise en culture)		
Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise et documentation
Matière	- Connaissance des risques de contamination du personnel et du prélèvement	- Préparation des lames et ensemencement sous PSM respecté - Repérage des cellules de comptage utilisées - Formation à la gestion du risque biologique - Document unique
	Matériau de référence (témoins)	- CQI et EEQ à toutes les étapes clefs du diagnostic si disponibles : cytologie, Gram, identification, antibiogramme - Définir la périodicité - Cf procédure QUAMIC sur les CIQ
Matériel	Petit matériel, réactifs, milieux de culture	- Marquage CE - Matériel à usage unique - Certificat de conformité fourni par le Fabriquant - Traçabilité des lots utilisés, - Gestion du stock, péremption
	PSM II (maîtrise du risque de contamination du personnel et du prélèvement)	- Procédure d'utilisation et de nettoyage - Contrôle annuel des PSM
	Enceintes thermostatées	- Cartographie, surveillance métrologique des températures (étuve, réfrigérateur)
	Cytocentrifugeuse	- Mode opératoire diffusé - Maintenance annuelle
	Microscope	- Mode opératoire connu - Nettoyage respecté

MAITRISE DES RISQUES		
Phase analytique (examen direct, mise en culture)		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Méthode	Lecture macroscopique et microscopique à l'état frais + coloration	- Modes opératoires diffusés et appliqués
	Choix des milieux	- Modes opératoires diffusés - Utilisation de milieux appropriés aux microorganismes recherchés selon la bibliographie et le contexte clinique
	Ensemencement et lecture des cultures	- Modes opératoires diffusés - Formation / Habilitation du personnel - Respect des durées et température d'incubation
	Test immunoenzymatique de recherche des antigènes solubles de Pneumocoques** et Cryptocoques **	- Modes opératoires diffusés - Utilisation selon la Bibliographie (REMIC) - Cf validations de méthode correspondantes
Milieu	<ul style="list-style-type: none"> Sécurité biologique et maîtrise de la contamination du prélèvement 	<ul style="list-style-type: none"> - Travailler sous PSM II obligatoirement - Instructions d'utilisation et nettoyage des PSM - Nettoyage et désinfection des surfaces - Hygiène et sécurité
	Atmosphère d'incubation	- Surveillance, enregistrement et contrôle des conditions d'incubations (CO2, anaérobiose)

Phase analytique : identification et antibiogramme selon leur validation de méthode

MAITRISE DES RISQUES Phase post analytique		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Matière	Conservation des prélèvements et des souches après analyse	- Procédure de conservation des prélèvements après analyse (température et durée)
Matériel	Moyens de transmission des comptes-rendus (système de gestion du laboratoire)	- Procédure écrite, vérification des connexions
Main d'œuvre	Transmission des résultats (techniciens, biologistes, secrétaires)	- Personnels formés et habilités - Connaissance des procédures de saisie et de validation
Méthode	Saisie des résultats dans l'informatique	- Procédure écrite de saisie des résultats - Procédure de contrôle de la justesse des données rentrées manuellement dans le SGL
	Validation biologique	- Procédure de validation biologique - Procédure de transmission des résultats « critique » ou mettant en jeu le pronostic vital - Procédure de prestations de conseils par les biologistes à désigner - Interprétation biologique en fonction des renseignements cliniques s'il y a lieu - L'interprétation des résultats doit figurer dans le mode opératoire de l'examen
	Transmission des résultats	- Procédure écrite de transmission (téléphonique, informatique, papier) - Vérification de l'intégrité des informations envoyées au service clinique (SIL, Fax, serveur de résultats, Tél. par exemple)
Milieu	Conditions de conservation des archives papier (feuilles de prescription et examens)	-Support de sauvegarde et lieux de stockage appropriés

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE :
cf validations/vérifications de méthodes pour l'analyse cyto bactériologique d'un
prélèvement:

examen direct avant colorations, et après colorations, culture, identification,
antibiogramme

Références

1. Guides techniques d'accréditation et documents du COFRAC, section humaine (SH). SH Form 44. Fiche qualitative. Vérification (portée A)/ validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale.
2. European manual of clinical microbiology. 1ère édition. 2012. ESCMID.
3. Infections neuroméningées. Quels outils diagnostics pour une prise en charge optimale en 2012 ? Colloque SFM-SPILF. 11 avril 2012
4. REMIC, Référentiel en microbiologie médicale, 4ème édition. SFM, 2010. www.sfm-microbiologie.org

12. EXAMEN MICROSCOPIQUE DIRECT : (NUMÉRATION CELLULAIRE ET RECHERCHE DE MICROORGANISMES DANS UN LIQUIDE BIOLOGIQUE AVANT COLORATION

Vérification (Portée A) d'une méthode de biologie médicale

L'examen microscopique direct d'un liquide biologique à l'état frais (sans coloration) comprend :

- Soit une recherche de la présence de germes entre lame et lamelles au microscope
- Soit une appréciation quantitative des cellules nucléées et des hématies sur une cellule de comptage associée à la recherche de germes. La cytologie est réalisée au microscope sur des liquides homogénéisés non centrifugés (ex : urines, LCR, liquide pleural, péricardique, dialyse péritonéale, liquide synovial).

La présence de cellules nucléées et d'érythrocytes est appréciée en nombre d'éléments détectés par unité de volume.

- Soit la mise en évidence de microorganismes (bactéries, levures)

DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte/Mesurande	Analyse de l'échantillon au microscope optique à l'état frais (sans coloration) : - appréciation quantitative des cellules : hématies, cellules nucléées - recherche de microorganismes
Principe de la Mesure	Microscopie optique (objectif 40 par exemple)
Méthode de mesure :	Cellule de comptage ou observation entre lame et lamelle
Type d'échantillon primaire (urine, sang, ...) :	Liquides biologiques. Ex : LCR, urine, ponctions diverses (pleurale, ponction ascite, dialyse péritonéale, synoviale)
Type de récipient, Additifs (tubes, ...) :	Urines : Tube avec conservateur (borate) - récipient stérile sans additifs Autres liquides : récipient stérile ±additif (anticoagulant : citrate ou héparinate de sodium)
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Non
Unités :	Nombre d'hématies / μ L, mm ³ ou mL , nombre de leucocytes/ μ L, mm ³ ou mL
Intervalles de référence :	Cf REMIC et procédures du laboratoire pour chaque examen concerné
Marquage CE (Oui/Non) :	oui
Instrument (analyseur automatique, etc.) :	microscope
Matériau d'étalonnage (références)/ Raccordement métrologique :	aucun
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	aucun

MISE EN OEUVRE	
Opérateurs (Habilitation) :	Tous les techniciens habilités au poste
Procédure de validation :	inscrire le Numero de la procédure
Procédure de gestion de la portée flexible :	inscrire le Numero de la procédure
Type de portée	A
Période d'évaluation :	xxx
Autorisation par :	Biologiste référent

MAITRISE DES RISQUES Phase préanalytique		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Matériel	Qualité des flacons de recueil avant utilisation	<ul style="list-style-type: none"> - Cf manuel de prélèvement - Choix des récipients primaires : - stérilité (gestion des dates de péremption) - étanchéité • Urines : utilisation de tubes avec ou sans conservateur • Autres liquides : additifs adaptés à l'examen (anticoagulants par exemple)
	Conformité de la demande : <ul style="list-style-type: none"> • identité du patient • information clinique 	<ul style="list-style-type: none"> - Contrôle à la réception avec critères d'acceptabilité définis - Traçabilité du préleveur et du prescripteur - Heure de prélèvement

MAITRISE DES RISQUES Phase préanalytique		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Matière	Quantité d'échantillon	- Non conformité en cas de quantité insuffisante
	Qualité de l'échantillon : contamination lors du prélèvement	-- Procédure diffusée connue et appliquée (manuel de prélèvements) - Commentaire biologique sur le résultat final en cas de contamination avérée après interprétation de la culture
	Délai entre réception du prélèvement et examen microscopique le plus rapide possible	- Non conformité en cas de délai dépassé - Procédure de gestion des examens urgents diffusée et appliquée (exemple : LCR) - Acheminement des prélèvements : • LCR : le plus rapidement possible (délai maximum à définir pour chaque laboratoire) • autres liquides : < 2H à température ambiante sans conservateur Urine sans conservateur : jusqu'à 24h entre 2 et 8°C Urine sur conservateur (tube boraté) : jusqu'à 48h à température ambiante
Main d'oeuvre	Compétence du préleveur (et du patient pour le recueil d'urine) Compétence des responsables de l'enregistrement et de la réception des prélèvements	- Préleveur : connaissance du manuel de prélèvement - Patient informé (exemple: fiche d'instruction pour le recueil d'urines) - Récupération si possible des renseignements cliniques dont dépend l'interprétation du résultat biologique - Formation et habilitation du personnel (préleveurs, agents responsables de la réception, de l'enregistrement) - Convention entre l'établissement de soins et le laboratoire

MAITRISE DES RISQUES		
Phase analytique (examen direct, mise en culture)		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Méthode	Antiseptie du site de prélèvement Méthode de prélèvement	- Recommandations d'antiseptie figurant sur le manuel de prélèvement - Procédure de prélèvement adaptée en fonction du contexte, diffusée, connue et appliquée
Milieu	Conditions de stockage des récipients boratés pour ECBU avant utilisation	Urines : zone de stockage adaptée aux recommandations du fabricant
Main d'œuvre	Examen direct à l'état frais: <ul style="list-style-type: none"> • macroscopique • microscopique : reconnaissance des éléments et appréciation quantitative des hématies et cellules nucléées 	- Formation - habilitation, maîtrise des compétences. Pour l'évaluation des compétences en cytologie: possibilité d'utiliser des CIQ et des EEQ commercialisés (CIQ : au moins 2 niveaux de quantités de cellules sont conseillés pour l'appréciation quantitative) - Connaissance des modes opératoires
	Connaissance des risques de contamination du personnel et du prélèvement	- Préparation des lames et ensemencement sous PSM respecté pour les liquides précieux ou potentiellement contaminants (exemple : LCR, liquide synovial) - Repérage des cellules de comptage utilisées - Formation à la gestion du risque biologique - Document unique
Matière	Matériau de référence (témoins)	-CIQ et EEQ pour cytologie - Cf procédure QUAMIC sur les CIQ en bactériologie

MAITRISE DES RISQUES Phase analytique (examen direct, mise en culture)		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Matériel	Petit matériel (cellule de comptage, pipette)	- Marquage CE - Matériel à usage unique - Certificat de conformité (volumétrie)
	PSM II (maîtrise du risque de contamination du personnel et du prélèvement)	- Procédure d'utilisation et de nettoyage - Contrôle annuel
	Microscope	- Mode opératoire connu - Nettoyage respecté
Méthodes	Lecture macroscopique et microscopique à l'état frais	- Modes opératoires diffusés et appliqués
Milieu	Sécurité biologique et maîtrise de la contamination des prélèvements précieux	-Pour certains liquides (LCR et liquides articulaires par exemple) : travailler sous PSM II obligatoirement -Instruction d'utilisation et nettoyage des PSM -Nettoyage et désinfection des surfaces -Hygiène et sécurité

MAITRISE DES RISQUES Phase post analytique		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Matière	Conservation des prélèvements après analyse	- Procédure de conservation des prélèvements après analyse (température et durée)
Matériel	Moyens de transmission des comptes-rendus (système de gestion du laboratoire)	- Procédure d'utilisation du SGL
Main d'œuvre	Transmission des résultats (techniciens, biologistes, secrétaires)	- Personnels formés et habilités - Connaissance des procédures de saisie et de validation

MAITRISE DES RISQUES Phase post analytique		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Méthode	Saisie des résultats dans l'informatique	<ul style="list-style-type: none"> - Procédure écrite de saisie des résultats - Dispositions sécurisant la saisie manuelle dans le SGL (ex : échantillonnage de dossiers)
	Validation biologique	<ul style="list-style-type: none"> - Procédure de validation biologique à nommer - Procédure de prestations de conseils par les biologistes (cf procédure QUAMIC) - Interprétation biologique en fonction des renseignements cliniques ou de la qualité des échantillons prélevés s'il y a lieu (échantillon pauci-cellulaire, de faible volume, contaminé par exemple) - L'interprétation des résultats doit figurer dans le mode opératoire de l'examen
	Transmission des résultats	<ul style="list-style-type: none"> - Procédure écrite de transmission (téléphone, informatique, papier) - Vérification de l'intégrité des informations envoyées au service clinique (SIL, Fax, serveur de résultats, tel..) - Procédure de transmission des résultats urgents ou en cas de situation critique (LCR).
Milieu	Conditions de conservation des archives papier (feuilles de prescription et examens)	<ul style="list-style-type: none"> - Support de sauvegarde et lieux de stockage appropriés

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Il est important de souligner que l'évaluation des performances d'un examen microscopique direct « manuel » d'un liquide biologique repose en grande partie sur l'**habilitation des opérateurs à cet examen**.

L'évaluation de la performance de la méthode manuelle peut être utile notamment pour les cytologies urinaires lors de la comparaison avec une méthode automatisée.

Répétabilité:

Elle n'est **pas nécessaire** lors de l'utilisation exclusive d'une méthode manuelle.

La répétabilité de la cytologie en méthode manuelle peut être intéressante dans le cadre d'une comparaison entre une méthode automatisée et manuelle, pour les échantillons urinaires. Elle s'effectue alors par le dépôt et le décompte cellulaire par le même opérateur, si possible 20 fois de suite.

Reproductibilité:

L'analyse de la reproductibilité (ou fidélité intermédiaire) de la numération cellulaire peut être réalisée à l'aide de CIQ commercialisés ou en effectuant une lecture simultanée d'un même échantillon clinique par tous les techniciens habilités à réaliser l'analyse. **L'utilisation de chaque type de liquide (urine, LCR...) n'est pas utile : la technique doit être évaluée sur au moins un liquide biologique ou un CIQ commercialisé.**

Les objectifs sont:

- Une variation cliniquement non significative des résultats inter opérateur
- Pouvoir assurer que quelque soit l'opérateur, le résultat soit ne soit pas différent

Exemple de reproductibilité inter opérateur sur les hématies et leucocytes à partir d'urines :

Reproductibilité Hématies (Urines):

Echantillons	Nombre de techniciens (N)	Moyenne (nb de cell/ μ L)	Ecart-type	CV (%)	Conclusion
Echantillon niveau 1 bas	8	23	15,21	65,7	à formuler
Echantillon niveau 2 bas	8	90	37,37	41,5	à formuler

Conclusions : *Le CV inter opérateur est élevé, lié à la lecture manuelle microscopique, méthode connue pour son manque de précision, sa grande variabilité inter technicien et son manque de standardisation. Les résultats obtenus sont conformes à ceux attendus par cette technique et les CV sont nettement supérieurs à ceux de la méthode automatisée.*

TEST CONFORME

Reproductibilité Leucocytes (Urines):

Echantillons	Nombre de techniciens (N)	Moyenne (nb de cell/ μ L)	Ecart-type	CV (%)	Conclusion
Echantillon niveau 1 bas	8	12	1,58	13,4	à formuler
Echantillon niveau 2 bas	8	422	100,41	23,8	à formuler

Conclusions : les CV inter opérateurs se situent entre 15 et 24 %. Ces CV ont des valeurs inférieures à celles retrouvées dans la littérature. **TEST CONFORME**

NB : il est intéressant d'identifier les **discordances majeures**, c'est à dire les résultats faisant changer l'interprétation des résultats par rapport au seuil de décision de 10/ μ l pour les leucocytes.

COMPARAISON DE METHODES (qualitatif)

L'examen direct est une méthode utilisée depuis des décennies dans tous les laboratoires de microbiologie.

La comparaison des méthodes n'est utile que lors de la mise en place d'une nouvelle méthode dans le laboratoire : par exemple :

- lors de l'acquisition d'un automate de cytologie urinaire ou lorsque ce dernier est utilisé en miroir ou back up.
- lors d'un changement de type de cellule de comptage

Pour la comparaison des méthodes, on cherchera à obtenir:

- une bonne corrélation entre la cytologie en méthode manuelle microscopique et celle réalisée par l'automate
- une absence de différence d'interprétation de l'ECBU entre une méthode manuelle et une méthode automatisée

COMPARAISON DE METHODES (qualitatif)	
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire :	Méthode automatisée/ Méthode manuelle
Nombre de mesures :	Cf chapitre cytologie urinaire automatisée
Descriptif de l'échantillon étudié :	Cf chapitre cytologie urinaire automatisée
Méthode d'exploitation des résultats (études des concordances) :	Cf chapitre cytologie urinaire automatisée
Résultats et interprétations des discordances :	Cf chapitre cytologie urinaire automatisée

CONTAMINATION

L'évaluation de la **contamination inter-échantillons** en méthode manuelle ne peut pas être réalisée selon les recommandations du SH GT04 car chaque échantillon est lu individuellement.

La contamination inter échantillon peut exister lors du dépôt d'un échantillon sur une cellule déjà utilisée. La maîtrise du risque est à réaliser lors de la formation et de l'habilitation du personnel

Date**Biologiste****Méthode validée le****Utilisation sous accréditation à partir du**

13. ENSEMENCEMENT, CULTURE ET RECONNAISSANCE DES COLONIES:

Vérification (Portée A) d'une méthode de biologie médicale

L'ensemencement d'un prélèvement biologique après coloration comprend, pour les examens le nécessitant (cf procédures des examens correspondants) :

- Un **ensemencement** des prélèvements sur milieux appropriés à l'examen demandé, en respectant la température, l'atmosphère et le délai d'incubation. Un ou des milieux de culture supplémentaire (s) en cas de présence de levures et/ou de bactéries observées à l'examen direct microscopique et/ou en fonction de la cytologie et des renseignements cliniques pourra être réalisé.
L'utilisation d'une anse calibrée permettra d'effectuer la numération bactérienne.
- Une **appréciation qualitative** des colonies ayant poussé après incubation des milieux de culture, ainsi qu'une **appréciation quantitative** (nombreux, rares..).
Pour certains prélèvements : urines, expectorations, LBA, prélèvements pulmonaires protégés, il est également prévu une appréciation quantitative du nombre des colonies de bactéries ayant poussé sur les différents milieux (cf procédures des examens correspondants)
Le but est d'obtenir des colonies bactériennes bien différenciées sur le milieu de culture approprié permettant une identification de la bactérie par le système utilisé au laboratoire.
- Une approche **phénotypique manuelle de l'identification** des microorganismes après culture, en fonction du microorganisme suspecté: morphologie et examen microscopique de la colonie (Gram), oxydase, catalase, agglutination, uréase, par exemple. En cas d'utilisation de milieux chromogènes, respecter les recommandations du fournisseur notamment en cas de réalisation de tests complémentaires (indole).

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande	- Ensemencement sur milieux appropriés - Lecture des cultures, reconnaissance, appréciation quantitative du nombre des colonies sur gélose (puissance de 10) - Analyse des colonies au microscope optique après coloration de Gram - Examens phénotypiques complémentaires sur colonies
Principe de la Mesure	-Analyse qualitative visuelle + tests manuels biochimiques
Méthode de mesure	-Lecture visuelle -Microscopie optique -Méthodes manuelles phénotypiques d'identification
Type d'échantillon primaire (urine, sang, ...) :	-Tout prélèvement biologique nécessitant un examen bactériologique

Type de récipient, Additifs (tubes, ...) :	- Urines : Tube avec conservateur (boraté) ou flacon stérile sans additifs - Autres prélèvements : flacons stériles, Ecouvillons, dispositifs implantables, milieu de transport spécifique
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	- Expectorations, LBA, PDP : dilution dans eau physiologique pour appréciation quantitative - Biopsie os, tissu : Broyage - Autres prélèvements : non
Unités :	NA
Intervalles de référence :	Interprétation des cultures variable en fonction des examens (cf procédures correspondantes)
Marquage CE (Oui/Non) :	Oui
Instrument (analyseur automatique, etc.) :	Si utilisation d'un ensementeur automatique, faire une vérification de méthode de l'automate
Matériau d'étalonnage (références)/ Raccordement métrologique :	aucun
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	aucun

MISE EN OEUVRE

Opérateurs (Habilitation) :	Tous les techniciens habilités au poste Technicien référent : xxxx
Procédure de validation :	inscrire le Numero de la procédure
Procédure de gestion de la portée flexible :	inscrire le Numero de la procédure
Type de portée	A
Période d'évaluation :	xxx
Autorisation par :	Biologiste référent

MAITRISE DES RISQUES Phase préanalytique		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Matériel	Qualité des flacons de recueil avant utilisation	<ul style="list-style-type: none"> - Choix des récipients primaires : - stérilité (gestion des dates de péremption) - étanchéité - adapté au prélèvement et à l'analyse réalisée - Urines : utilisation de tubes avec conservateur ou non
	Conformité de la demande : <ul style="list-style-type: none"> • identité du patient • information clinique 	<ul style="list-style-type: none"> - Contrôle à la réception avec critères d'acceptabilité définis - Traçabilité du préleveur et du prescripteur
Matière	Quantité d'échantillon	- Non conformité en cas de quantité insuffisante
	Qualité de l'échantillon : contamination lors du prélèvement	<ul style="list-style-type: none"> - Procédure diffusée connue et appliquée (manuel de prélèvements) - Commentaire biologique sur le résultat final en cas de contamination avérée après interprétation de la culture
	Délai entre réception du prélèvement et examen microscopique le plus court possible	<ul style="list-style-type: none"> - Non conformité en cas de délai dépassé - Procédure de gestion des examens urgents diffusée et appliquée (LCR) - Acheminement des prélèvements : <ul style="list-style-type: none"> • LCR : sans délai (délai maximum à définir pour chaque laboratoire) • autres liquides : < 2H à température ambiante sans conservateur Urine sans conservateur : 24h entre 2 et 8°C Urine sur conservateur (tube boraté) : 48h à température ambiante - Autres échantillons biologiques : à définir dans chaque mode opératoire au regard des référentiels et des milieux de transport utilisés.

MAITRISE DES RISQUES Phase préanalytique		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Main d'oeuvre	Compétence du préleveur (et du patient pour le recueil d'urine) Compétence des responsables de l'enregistrement et de la réception des prélèvements	- Préleveur : connaissance du manuel de prélèvement - Patient informé par une fiche d'instruction pour le recueil d'urines - Formation et habilitation du personnel (préleveurs, responsables de la réception, de l'enregistrement)
Méthode	Antiseptie du site de prélèvement Méthode de prélèvement	- Recommandations d'antiseptie figurant sur le manuel de prélèvement - Procédure de prélèvement adaptée à l'examen, diffusée, connue et appliquée
Milieu	Conditions de stockage des récipients	- Stockage des récipients adapté aux recommandations des fournisseurs

MAITRISE DES RISQUES Phase analytique (examen direct, mise en culture)		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Matériel	- Ensemencement : Conditions de stérilité Connaissance des milieux de culture à ensemercer et de l'atmosphère d'incubation - Lecture des cultures : Recherche et connaissances des pathogènes à identifier	- Formation- habilitation, maîtrise des compétences Vérification des compétences: Ensemencement manuel des cultures : ensemencement de 10 échantillons d'un même prélèvement d'urine positive à l'examen direct et vérification de l'obtention d'un résultat identique
Matière	Matériau de référence (témoins)	-CIQ et EEQ à toutes les étapes clés de l'analyse si disponibles -Périodicité à définir -Cf procédure QUAMIC sur les CIQ

MAITRISE DES RISQUES		
Phase analytique (examen direct, mise en culture)		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
matériel	Petit matériel (oeses, pipettes, milieux de culture), broyeur	<ul style="list-style-type: none"> - Marquage CE - Matériel à usage unique - Fiches de conformité des milieux de culture - Fiches de stress des milieux de culture - Mode opératoire du broyeur
	PSM II (maîtrise du risque de contamination du personnel et du prélèvement)	<ul style="list-style-type: none"> - Procédure d'utilisation et de nettoyage des PSM - Contrôle annuel des PSM
	Microscope Ensemenceur	<ul style="list-style-type: none"> - Mode opératoire connu - Nettoyage respecté
	Colorateur (Gram)	<ul style="list-style-type: none"> - Contrat de maintenance - Mode opératoire connu - Nettoyage respecté
Méthode	Ensemencement, lecture microscopique des colonies et tests manuels phénotypiques	-Modes opératoires diffusés
Milieu	Sécurité biologique et maîtrise de la contamination des prélèvements précieux	<ul style="list-style-type: none"> -LCR, os et liquides articulaires: travailler sous PSM II obligatoirement -Instruction d'utilisation et nettoyage des PSM -Nettoyage et désinfection des surfaces -Hygiène et sécurité

Phase analytique des autres étapes de l'analyse microbiologique : se reporter aux chapitres « examen direct sans coloration » « examen direct après coloration » , « recherche d'antigènes solubles » « identification » et « antibiogramme » selon leur validation de méthode

MAITRISE DES RISQUES Phase post analytique		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Matière	Conservation des prélèvements et des souches après analyse	- Procédure de conservation des prélèvements et des souches après analyse (température et durée)
Matériel	Moyens de transmission des comptes-rendus (système de gestion du laboratoire)	- Procédure écrite d'utilisation du SGL
Main d'œuvre	Transmission des résultats (techniciens, biologistes, secrétaires)	- Personnels formés et habilités - Connaissance des procédures de saisie et de validation
Méthode	Saisie des résultats dans l'informatique	- Procédure écrite de saisie des résultats - Procédure de contrôle de la justesse des données rentrées manuellement dans le SIL
	Validation biologique	- Procédure de validation biologique à nommer - Procédure de prestations de conseils par les biologistes à nommer - Interprétation biologique en fonction des renseignements cliniques s'il y a lieu - L'interprétation des résultats doit figurer dans le mode opératoire de l'examen
	Transmission des résultats	- Procédure écrite de transmission (téléphonique, informatique, papier) - Vérification de l'intégrité de l'information envoyée au service clinique
Milieu	Conditions de conservation des archives papier (feuilles de prescription et examens)	- Support de sauvegarde et lieux de stockage appropriés

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Il est important de souligner que l'évaluation des performances d'un examen direct manuel de liquides biologiques repose en grande partie sur **l'habilitation des techniciens à cet examen**.

Répétabilité:

Elle n'est pas nécessaire lors de l'utilisation exclusive d'une méthode manuelle.
En cas d'utilisation d'un ensementeur automatique, faire un dossier de vérification des méthodes dédié à l'automate.

Reproductibilité:

L'analyse de la reproductibilité (ou fidélité intermédiaire) de la lecture qualitative ou de l'appréciation quantitative d'une culture peut être réalisée en effectuant une lecture d'un même échantillon clinique (ensemencé par une seule personne) par tous les techniciens habilités à réaliser l'analyse. L'utilisation pour cette vérification de types différents de prélèvements est recommandée, à moduler en fonction du recrutement du laboratoire. Exemples : expectorations, LBA, LCR, urines.

Une dilution et un ensemencement d'un même prélèvement nécessitant une dilution (ex : expectorations, LBA) peuvent être intéressants à réaliser par différents opérateurs, dans le cadre de la formation de nouveaux techniciens.

Les objectifs sont:

- Une faible variation des résultats inter opérateurs
- Pouvoir assurer que quelque soit la personne au poste, le résultat soit identique et juste.

Exemple de reproductibilité inter opérateur à partir de LBA :

Echantillons	Nombre de techniciens (N)	types de germes prédominants poursuivire (CG+, BG-)	% de techniciens ayant donné le résultat attendu
Echantillon 1	8	10 ⁴ CGP type <i>S. aureus</i> , 10 ⁵ BGN	X%
Echantillon 2	7	10 ⁶ CGP type pneumocoque	X%
Echantillon 3	10	10 ⁵ BGN	X%

Conclusion : à moduler en fonction des résultats

Exemple de reproductibilité inter opérateur à partir d'urines:

Echantillons	Nombre (N)	Résultat attendu	bacilles Gram -	bacilles Gram +
Echantillon 1	8	10 ⁴ <i>E. coli</i>	x	x
Echantillon 2	8	10 ³ CGP type staphylocoque	y	y
Echantillon 3	10	10 ⁵ CGP type enterocoque	z	z

Conclusion : à moduler en fonction des résultats

COMPARAISON DE METHODES (qualitatif)

La comparaison des méthodes n'est utile que si la méthode en question est nouvelle dans le laboratoire. Or, la culture est une méthode utilisée depuis des décennies dans tous les laboratoires de microbiologie. Il y a donc uniquement 2 cas où la comparaison de méthode est utile :

- **la qualification d'un nouveau colorateur de Gram ou de MGG**, où l'on cherchera à obtenir une bonne corrélation entre la lecture après coloration manuelle et par colorateur
- **la qualification d'un enseigneur automatique pour vérifier la corrélation des résultats avec la méthode manuelle**

COMPARAISON DE METHODES (qualitatif)

Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire :	colorateur
Nombre de mesures :	
Descriptif de l'échantillon étudié :	
Méthode d'exploitation des résultats (études des concordances) :	
Résultats et interprétations des discordances :	
Conclusions et dispositions ³ :	

² Le laboratoire précise les dispositions mises en œuvre (par exemple : utilisation transitoire et documentée d'un facteur de correction).

CONTAMINATION

L'évaluation de la **contamination inter-échantillons** en méthode manuelle ne peut pas être réalisée selon les recommandations du SH GT04 car chaque échantillon est lu individuellement. Elle est utile en cas d'utilisation d'un ensementeur automatique (cf dossier de validation de l'ensementeur)

La contamination inter échantillon peut exister lors de la retranscription des résultats dans le SIL du LBM. La maîtrise du risque est à réaliser lors de la formation et de l'habilitation du personnel.

Date

Biologiste

Méthode validée le
Utilisation sous accréditation à partir du

14. ANTIBIOGRAMME PAR LA METHODE DE DIFFUSION : VÉRIFICATION (PORTÉE A) D'UNE MÉTHODE DE BIOLOGIE MÉDICALE

Cette fiche a du être modifiée pour pouvoir s'adapter aux méthodes d'analyses microbiologiques

Préalable :

Les tests d'étude de la sensibilité aux antibiotiques en routine peuvent être effectués à l'aide de diverses techniques phénotypiques dont la méthode de diffusion. C'est une méthode très ancienne, elle convient à la majorité des bactéries pathogènes, ne nécessite pas d'équipement spécial, et largement éprouvée. Elle est basée sur la constitution d'un gradient décroissant de concentration d'antibiotiques dans une gélose (par diffusion radiale à partir d'un support papier = « disque » ou d'un comprimé) qui va inhiber la croissance bactérienne à une certaine concentration d'antibiotique ; la distance entre le bord du disque et la zone d'inhibition est proportionnelle à la CMI. Cette distance étant mesurée, l'antibiogramme en diffusion est donc une approche quantitative dans un 1er temps qui sera secondairement interprétée pour fournir au final un résultat qualitatif (rendu du résultat en catégorie clinique Sensible/Intermédiaire/Résistant). Elle est donc considérée comme une méthode qualitative au final.

Cette méthode nécessite une standardisation ; des recommandations sont émises par un comité européens, l'EUCAST, et seront effectives en France à partir du 1/1/2014. Le laboratoire adoptant des méthodes/équipements/réactifs « fournisseur » correspondant à l'utilisation de DM-DIV marqués CE, cette méthode d'antibiogramme s'inscrit alors en portée A ; il s'agit de vérifier que le résultat final est obtenu dans les conditions attendues. L'analyte est l'inhibition de la croissance bactérienne, le mesurande étant le diamètre d'inhibition. Dans tous les cas, l'approche ne pourra pas être la même qu'en biochimie car l'analyte n'est pas un composant « inerte » d'une matrice stable.

Les bactéries sont des microorganismes vivants capables de résister à l'action des antibiotiques par des mécanismes biochimiques et génétiques qui s'expriment plus ou moins. La particularité de la méthode par diffusion est de pouvoir visualiser des images phénotypiques de la bactérie sur la façon de résister (ou pas) à l'action d'un antibiotique ou d'une famille d'antibiotiques. Ces images sont dites informatives sur les mécanismes de résistance, font intervenir une expertise de celui qui les visualisent et donc in fine cette méthode laisse encore une large part à la qualification et aux connaissances théoriques. En France notamment, les experts de l'antibiogramme restent très attachés à la lecture interprétative, concept visant à éviter des pièges dont le plus grave est la non détection d'un mécanisme de résistance.

D'après le SH GTA 04, la vérification comprend 3 étapes :

1. Une étude bibliographique approfondie sur la méthode.
2. La détermination des critères de performance et leurs limites d'acceptabilité.
3. La vérification expérimentale sur site selon la procédure établie par le LBM avec l'exploitation des résultats et la conclusion sur la validité de la méthode.

1) Pour l'étude bibliographique les documents sur l'EUCAST (10,11,12) constituent une très bonne base.

2) Les paramètres pertinents à vérifier pour cette méthode sont ; après la maîtrise des risques ; la fidélité, l'approche de la justesse, les interférences. La vérification des limites de quantification et linéarité n'est pas applicable, ni celle de la contamination inter échantillons;

les intervalles de référence des matériaux de référence (souches ATCC) sont ceux de l'EUCAST (20). Quant à la notion d'incertitude de mesure, sa pertinence est certainement faible dans le contexte.

« L'antibiogramme » (8) est l'ouvrage de référence, c'est une aide précieuse pour l'interprétation qui doit refléter l'état de l'art et la pertinence clinique.

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande	Croissance bactérienne en présence d'antibiotique / diamètre d'une zone
Principe de la Mesure	Diffusion d'un antibiotique dans un milieu de culture, créant un gradient de concentration par diffusion radiale à partir d'un disque ou comprimé imprégné d'antibiotique. La croissance bactérienne est alors stoppée à une certaine concentration d'antibiotique, matérialisée par une zone d'inhibition dont le diamètre est mesuré.
Méthode de mesure	Métrique à l'aide d'un décimètre, pied à coulisse ou système optique automatisé.
Type d'échantillon primaire (urine, sang, ...) :	Suspension bactérienne obtenue à partir d'une ou de plusieurs colonies de même morphotype
Type de récipient, Additifs (tubes, ...) :	Tubes stériles à usage unique contenant le diluant (solution saline).
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution) :	aucun (suivi de l'EUCAST ou utilisation de l'inoclic)
Unités :	mm
Intervalles de référence :	NA
Marquage CE (Oui/Non) :	Oui
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	
Instrument (analyseur automatique, etc.) :	Analyseur d'images
Référence du réactif (référence fournisseur, version notice) :	disques antibiotiques comprimés ...
Matériau d'étalonnage (références)/ Raccordement métrologique :	Souches bactériennes de collection recommandées par l'EUCAST (phénotype sauvage ou résistant)
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	variable

MISE EN OEUVRE	
Opérateurs (Habilitation)	Techniciens habilités
Procédure de validation	Procédure générale de validation d'une méthode d'analyse qualitative
Procédure de gestion de la portée flexible	Procédure de gestion de la portée flexible du laboratoire
Période d'évaluation	Du / / au / /
Date de mise en service	
Autorisation par	Biologiste responsable du site

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs :	Inoculum standardisé à partir de colonies bactériennes Contamination de l'inoculum	<ul style="list-style-type: none"> - Personnel habilité - Recommandations de l'EUCAST - Guides fournisseurs - Utilisation d'un densitomètre sous contrôle métrologique ou autre méthode éprouvée (inoclic) - Vérification de l'obtention d'un inoculum confluent - Vérification visuelle de la pureté de l'inoculum au moment de la lecture de l'antibiogramme
Pré-traitement de l'échantillon (centrifugation, dilution,.)	Non	Non
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	Personnel technique : méthodologie	<ul style="list-style-type: none"> - Personnel habilité à la réalisation et à lecture des antibiogrammes (fiches d'habilitation, de poste et de fonction). - Connaissance des modes opératoires
	Personnel qui valide Connaissance des mécanismes de résistance Contrat de collaboration avec un laboratoire expert	<ul style="list-style-type: none"> - DPC, congrès, participation à des réseaux, - Contrôle grâce aux EEQ - Revue de contrat

Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,...) :	Température ambiante de la pièce hébergeant l'automate	<ul style="list-style-type: none"> - Système de climatisation - Contrôle température ambiante - Recommandations INRS Ed999 quand le laboratoire peut les mettre en œuvre
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	A nommer en annexe ou sur le protocole opératoire	<ul style="list-style-type: none"> - Fiches techniques référencées - Obtenir les fiches de stress des réactifs - Utilisation de matériel CE et DM-DIV selon DE 98/79/CE - Traçabilité des lots de disques (gestion des stocks, ou à défaut traçabilité des utilisations) - Contrôle grâce aux CIQ et EEQ
Matériau de références (témoins) :	Contrôle interne de qualité (CIQ) Evaluation externe de qualité (EEQ)	<p>• CIQ : Passage des souches recommandées par EUCAST (l'EUCAST propose des recommandations qui permettent une certaine standardisation (11, 12, 13). Il convient également de choisir des souches représentative de l'activité du laboratoire dont certaines possédant des phénotypes de résistance particuliers. Par exemple :</p> <p>Souches de routine pour apprécier l'inoculum: <i>E. coli</i> ATCC 25922 (sensible) <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (sensible) <i>S. aureus</i> ATCC 29213 (Pase) <i>E. faecalis</i> : ATCC 29212(sensible) <i>H. influenzae</i> CIP 5494 sensible</p> <p>Souches pour détection mécanismes de résistance : <i>E. coli</i> ATCC 35218 TEM1 <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 BLSE SHV-18 <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 (Péni G Inter) SARM, mecA, <i>E. faecalis</i> vanco R ATCC51299 RHN /ERV <i>H. influenzae</i> BLNAR</p>

		<p>- Protocole interne de conservation et de transformation des souches</p> <p>- Cf. recommandations QUAMIC chapitre CIQ antibiogramme</p> <p>- Contrôle de la céfinase avec une souche betalactamase +</p> <p>- Contrôle du test de recherche de la PLP2a</p> <p>Périodicité : cf. recommandations QUAMIC chapitre CIQ antibiogramme</p> <p>EEQ : au moins 4 fois/an : pour l'antibiogramme peu d'organismes proposent des programmes on peut citer notamment ABP, CTCB, ASQUALAB, CCLIN...</p>
Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	Fiabilité du densitomètre Fiabilité du lecteur d'images d'antibiogramme (ADAGIO, SIRSCAN...)	Procédures d'utilisation Etalonnage du densitomètre (gammes MF) Cahier de vie de l'automate Gestion des maintenances du lecteur automatisé (périodicité selon fournisseurs) Contrat de maintenance Suivi métrologique de l'étuve d'incubation des antibiogrammes (si distincte de celle de l'automate) Validation des règles d'expertises/commentaires Traçabilité des images en cas de problème d'interprétation Traçabilité de la mise à jour du Système expert
	Etuve externe (si absence d'automate)	
	Fiabilité du système expert	
	Etuves	Suivi métrologique de l'étuve d'incubation des antibiogrammes Cahier de vie des enceintes Fiche signalétique Gestion des maintenances dans le SIL
	Distributeurs de disques	Personnel formé et habilité

* item à renseigner si nécessaire

Cette maîtrise des risques peut être approfondie par une analyse de risques type AMDEC (Analyse des Modes de Défaillances, de leur Effets et de leur Criticité) basée sur les 5M.

Exemple d'étude de criticité pour l'ensemble du processus d'antibiogramme en diffusion avec lecture automatisée :

- Le SH GTA 06 a évalué les indices de criticité : 3 items cotés de 1 à 3 : Fréquence, Gravité , Détectabilité de l'anomalie

$$\text{Indice de criticité (IC)} = F \cdot G \cdot D$$

Un CIQ doit être mis en place à partir d'un seuil que chacun déterminera (6 selon le SH GTA 06).

Exemples :

Anomalie	Fréquence	Gravité	Détection	IC	Remarque	Action
Absence plan qualité à la production	1	3	1	3	Fiches qualité obligatoire	Document fournisseur
Anomalie lot	1	3	3	9	Enquête rétrospective	CIQ adapté
Sensibilité pneumocoque	3	3	2	18	Contrôle des disques	CIQ
BLSE	3	3	2	18	Connaissance	CIQ formation

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

SPECIFICITE & SENSIBILITE DIAGNOSTIQUES (indispensable en portée B)

Résultats de l'étude des courbes ROC à partir d'une étude clinique :	NA
--	----

La spécificité analytique, la sensibilité diagnostique, la stabilité des réactifs, les interférences et les intervalles de référence pourront être traités bibliographiquement.

Répétabilité :

A n'envisager que si la technique en diffusion est nouvellement implantée dans le laboratoire

Utiliser par exemple une souche de référence de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) en raison de sa sensibilité à l'effet inoculum.

Ex : 10 passages de la souche ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*

Fidélité intermédiaire :**Pour les laboratoires venant d'adopter la méthode ou qui change leur technique :**

le groupe recommande de suivre les recommandations de l'EUCAST c'est à dire réaliser 1 test quotidiennement pendant 20 jours (au moins pour les antibiotiques utilisés en routine). Le laboratoire peut comparer les résultats consécutifs de l'organisme suivi à ceux indiqués par l'EUCAST (comparaison avec les valeurs cibles) (19), Ce contrôle à lieu quotidiennement jusqu'à ce que la performance soit satisfaisante (pas plus d'un test sur 20 en dehors des limites) ; Il est ensuite remplacé par le suivi des CIQ.

Pour les laboratoires ayant déjà une expérience de la technique :

Reporter les résultats des CIQ sur un tableau ou les mettre en annexe sous forme de diagramme.

L'exploitation des résultats de répétabilité et reproductibilité se fera en pourcentage de concordance de catégorisation (R, I, S) avec une justification sur les écarts par rapport au 100% de concordance.

Autre proposition : suite aux travaux publiés (16, 17) le laboratoire pourrait également déterminer ses propres valeurs cibles et définir ses limites acceptables avec ± 2 écart-type comme en biochimie.

Approche de l'exactitude : cf. document QUAMIC pour l'exploitation de l'EEQ.

Les contrôles nationaux de qualité ne donnent aucun résultat de mesurande, mais de l'interprétation SIR ; le groupe propose alors d'approcher l'exactitude par la comparaison SIR avec les souches EEQ .

Propositions :

- Reporter les résultats qualitatifs S/I ou R des EEQ (les 10 derniers par ex)

Echantillons	ATB testés	Valeur Labo ²	Cible (résultat attendu)	% de bonnes réponses/ attendu	Conclusion
Souche x	Amox	R	R	X%	
	ticar	R		Y%	
	cefotax	S			
	...				
Souche y	...				

² Le laboratoire précise les dispositions mises en œuvre (par exemple : utilisation transitoire et documentée d'un facteur de correction).

- Comparer les distributions de diamètres obtenus au sein d'un laboratoire pour certains couples judicieux et bien choisis de germe/antibiotique à ceux publiés par l'EUCAST (19) est une approche intéressante.

Conclusions :

ROBUSTESSE

Données bibliographiques :	Si disponible
Vérification sur site	EUCAST recommande une lecture après 16 à 20H d'incubation. Il est donc préconisé de faire des essais de lecture dans des intervalles plus courts ou plus longs, par ex sur une vingtaine de souches d'exigences de croissance différentes. Exemple lire les antibiogrammes après 48h à l'étuve ou après 24h au réfrigérateur.
Conclusions et dispositions ² :	Donner le pourcentage de bonne identification par rapport à une incubation de 16-20H et en tirer les conclusions

CONTAMINATION : habilitation du personnel

La contamination est vérifiée au moment de la lecture de l'antibiogramme. Une habilitation du personnel, revue régulièrement est le seul moyen de la maîtriser.

COMPARAISON DE METHODES

Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire :	Corrélation méthode EUCAST avec une méthode automatisée s'il y a lieu
Nombre de mesures :	Au moins 10 passages
Descriptif de l'échantillon étudié :	Souche ATCC de référence.
Méthode d'exploitation des résultats (études des concordances) :	Calcul des concordances de catégorisation.
Résultats et interprétations des discordances :	
Conclusions et dispositions ³ :	

³ Le laboratoire précise les dispositions mises en œuvre (par exemple : utilisation transitoire et documentée d'un facteur de correction).

Références bibliographiques :

1. Ordonnance 2010-49 du 13 Janvier 2010 relative à la Biologie Médicale, publié au Journal Officiel le 15 Janvier 2010.
2. Arrêté du 26 Novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA), J.O. n° 287 du 11 Décembre 1999, page 18441.
3. Norme NF EN ISO 15189, Laboratoire d'analyses médicales : Exigences relatives à la qualité et à la compétence, Août 2007, éd. Afnor.
4. Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des Laboratoire d'Analyses de Biologie Médicale, SH REF 02, éd. Cofrac.
5. Guide de vérification/validation des méthodes en biologie médicale, SH GTA 04, éd. Cofrac.
6. European Manuel of Microbiology (EMCM), 1^{ère} édition, 2012.
7. Référentiel en microbiologie médicale (REMIC), 4^{ème} édition, 2010.
8. Antibiogramme, 3^{ème} édition, éditions ESKA.
9. Bactériologie médicale, techniques usuelles, 2^{ème} édition, éditions Elsevier et Masson
10. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques, Méthode de diffusion EUCAST en gélose, EUCAST
11. Guide de lecture, Méthode EUCAST de diffusion en gélose pour déterminer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, EUCAST
12. Direct antimicrobial susceptibility testing, EUCAST
13. Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters, EUCAST
14. Routine internal quality control as recommended by EUCAST, version 3.1, EUCAST
15. Extended quality control as recommended by EUCAST, version 1.0, EUCAST
16. Comparaison inter-laboratoire, Evaluation Externe de la Qualité, Jean-Louis Galinier, SFM Lille, 7-8 février 2013.
17. Accréditation et contrôles de qualité interne des antibiogrammes, V. Cocquerelle, T. Gueudet, C. Rieder-Monsch, J.M. Rousée, SFM Lille, 7-8 février 2013.
18. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, Recommandations 2013 ; SFM
19. http://www.eucast.org/zone_diameter_distributions/
20. http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/qc_tables/

15. DÉTECTION QUALITATIVE D'ADN OU D'ARN VIRAL PAR PCR TEMPS RÉEL

Méthode d'analyse qualitative portée A

La détection qualitative des génomes viraux est devenue incontournable, en particulier dans le diagnostic étiologique des infections aiguës neuroméningées (méningites et encéphalites) La recherche de génomes viraux peut se faire dans tous les liquides biologiques avec nécessité d'un prétraitement pour certains types d'échantillons.

DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte/Mesurande	Détection d'ADN ou d'ARN viraux dans les liquides biologiques
Principe de la Mesure	Extraction des acides nucléiques. PCR avec sondes et amorces spécifiques
Méthode de mesure	PCR temps réel
Marquage CE (Oui/Non)	OUI

MISE EN OEUVRE

Opérateurs (Habilitation)	Personnes habilitées (techniciens, biologistes)
Procédure de validation	Inscrire la référence de la procédure
Procédure de gestion de la portée flexible	Inscrire la référence de la procédure
Période d'évaluation	
Date de mise en service	
Autorisation par	Biologiste référent

MAITRISE DES RISQUES Phase préanalytique		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Matériel	<p>Centrifugeuse : respect des accélérations, vitesses préconisées et températures maximum</p> <p>Enceintes réfrigérées pour conservation des échantillons avant et après prétraitement éventuel (+4°C ou congélation <-20°C ou <-70°C selon recommandations fournisseur et durée de conservation)</p> <p>PSM pour prétraitement, décantation en tube secondaire...</p>	<p>Qualification de l'installation</p> <ul style="list-style-type: none"> - Contrat de maintenance maintenance régulière - Métrologie <p>Qualification de l'installation</p> <ul style="list-style-type: none"> - Contrat de maintenance maintenance régulière - Suivi métrologique des enceintes <p>Qualification de l'installation</p> <ul style="list-style-type: none"> - Contrat de maintenance - maintenance régulière
Matière	<p>Prélèvement : types de tubes utilisables</p> <p>Recueil des prélèvements dans les tubes ou flacons adéquats, stériles</p>	<p>Procédure de prélèvement diffusée, connue et appliquée.</p> <p>Procédure de gestion des non conformités</p>
Main d'œuvre :	<p>Conformité à la prescription: Identité du patient</p> <p>Enregistrement des demandes (prise en compte de la demande de biologie moléculaire pour le circuit du prélèvement et sa conservation)</p> <p>Identification des prélèvements</p> <p>Sécurité de la décantation (risque d'erreur d'identification du tube secondaire)</p>	<p>Formation et habilitation du personnel</p> <p>Connaissance du catalogue des analyses</p> <p>Maîtrise du SIL</p> <p>Fiches d'habilitation du personnel</p> <p>Fiches de poste</p>
Milieu	Organisation des locaux	Plan des locaux
Méthode	<p>Méthode de prélèvement</p> <p>Prétraitement de l'échantillon : spécifier les échantillons : selles (centrifugation), biopsies (traitement à la protéinase K), écouvillon (décharger dans milieu de transport ou PBS stérile)</p>	<p>Manuel de prélèvement diffusé et appliqué</p> <p>Procédure de prétraitement des échantillons</p>

MAITRISE DES RISQUES Phase analytique		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Matériel	Bon fonctionnement des matériels utilisés : Extracteurs d'acides nucléique, thermocycleurs, pipettes	Qualification des installations Cahier de vie des automates Contrats de maintenance Suivi métrologique des pipettes critiques et des thermocycleurs Suivi des CIQ
Matière	<u>Matériau de référence</u> témoins négatifs et positifs : bonne conservation et non contamination Contrôles de qualité <u>Réactifs, consommables</u>	Respect des indications fournisseur CIQ : Gestion des lots (longue durée de péremption pour suivi sur une longue période, par exemple 1 an) passage régulier (définir la fréquence en fonction de l'activité et des résultats obtenus : au moins une fois/semaine/mois et aux changements de lots) Cf procédure de gestion des contrôles EEQ : contrôle externe si disponible ou échanges inter-laboratoires Traçabilité des lots utilisés Procédure de gestion des alertes de réacto-vigilance
Main d'œuvre :	<u>Qualification, compétence et habilitation du personnel</u> Maintien des performances techniques	Fiches d'habilitation du personnel Fiches de poste
Milieu	Organisation des locaux	Plan des locaux

MAITRISE DES RISQUES Phase analytique		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Méthode	Spécificités techniques : - Local - Température - Alimentation électrique	Local dédié à l'activité Suivi continu de la T° du local si nécessaire Installation électrique adaptée aux exigences du matériel Alimentation protégée par courant ondulé
	Contamination de l'environnement	Procédure de nettoyage Respect de la marche en avant et des règles de manipulation (habillage, protocole pour le port des gants...) + précautions particulières en post PCR (en cas d'ouverture de tubes par exemple). Gestion des déchets Contrôle périodique de non contamination (Par exemple 1 fois par mois) Programme de décontamination à définir
	- Identification des patients - Utilisation correcte des réactifs (homogénéisation, interversion, etc...)	Mode opératoire diffusé, appliqué

MAITRISE DES RISQUES Phase post-analytique		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Matériel	Transmission des résultats Conservation des résultats	Validation de la connexion Automate- SIL (avec ou sans middleware) Validation de la connexion SIL – serveur de résultats Procédures de sauvegarde et archivage
Matière	Conservation des échantillons ou des acides nucléiques extraits après analyse : modalités (< -70°C) et durée Elimination des déchets	Procédure spécifique de conservation et d'élimination des échantillons Surveillance métrologique des températures
Main d'œuvre :	Personnel médical habilité pour l'interprétation et la validation	Habilitation du personnel
Milieu		
Méthode	Validation des résultats	Procédure de validation médicale et rendu des résultats Confrontation clinico-biologique

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE Portée A

SPECIFICITE & SENSIBILITE DIAGNOSTIQUES

Données bibliographiques	OUI
--------------------------	-----

CONTAMINATION

Inter échantillons pour les paramètres sensibles :	Par exemple, pour HSV, qui est un paramètre sensible : tester au minimum 3 fois un échantillon positif fort en alternance avec un négatif 3 fois.
Vérification bibliographique :	OUI
Vérification sur site :	OUI

COMPARAISON DE METHODES

Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire :	Nom de la méthode précédente, réactifs utilisés
Nombre de mesures :	A définir : au minimum 5 échantillons
Descriptif de l'échantillon étudié :	ADN ou ARN connus, positifs ou négatifs avec l'ancienne méthode, issus d'échantillons congelés ou échantillons de contrôle Tester les différentes matrices si possibles
Résultats et interprétations des discordances :	
Conclusions et dispositions :	Concordance. Praticabilité supérieure

ROBUSTESSE

Données bibliographiques	OUI
--------------------------	-----

STABILITE

Données bibliographiques	OUI
--------------------------	-----

Bibliographie :

Référentiel en virologie médicale 2ème édition. 2007. SFM

Guides techniques d'accréditation et documents du COFRAC, section humaine (SH) :

- SH Form 44.Fiche qualitative. Vérification (portée A)/ validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale
- SH GTA 04 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale

Raymaekers M, Bakkus M, Boone E, de Rijke B, El Housni H, Descheemaeker P, De Schouwer P, Franke S, Hillen F, Nollet F, Soetens O, Vankeerberghen A, Reflexion and proposals to assure quality in molecular diagnostics. Acta Clinica Belgica, 2011; 66-1, 33-41

Conception des laboratoires d'analyses médicales, Guide INRS, 2007, ED999.

16. DÉTECTION QUANTITATIVE DE GÉNOMES VIRAUX PAR PCR EN TEMPS RÉEL (CHARGES VIRALES). MÉTHODE D'ANALYSE QUANTITATIVE PORTÉE A

La détection quantitative des génomes viraux, ADN ou ARN, est actuellement indispensable pour le diagnostic, le pronostic et le suivi thérapeutique des infections virales chroniques ou susceptibles de récurrences.

Des plates-formes de tests entièrement automatisées et marquées CE sont disponibles pour la quantification des génomes viraux dans le plasma, le sérum ou le sang total.

Ce document ne s'applique pas à la recherche qualitative des mêmes génomes viraux par les mêmes tests dans des prélèvements tissulaires (sperme traité ou non, liquide séminal, liquide folliculaire, biopsies de foie, de colon....).

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande	Quantification des génomes viraux Citer les différents virus
Principe de la Mesure	Extraction des acides nucléique. PCR avec amorces spécifiques.
Méthode de mesure	PCR en temps réel Trousse xxx Automate xxx
Marquage CE (Oui/Non)	Oui
Type d'échantillon primaire (urine, sang, ...) :	Sang total EDTA, plasma EDTA ou sérum
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Pas de prétraitement pour examen sur sang total sauf précautions spécifiques selon extracteur d'acides nucléiques. Centrifugation (par exemple 15 minutes à 2200 g) Dilution possible (par exemple prélèvements pédiatriques) pour obtenir un volume minimum (1 ml par exemple)
Unités :	Soit : - UI/ml - Copies ou équivalents copies/ml
Intervalles de référence¹ :	Non pertinent
Marquage CE (Oui/Non) :	OUI
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	Code VHC pour ARN du VHC Code CHB pour ADN du VHB

Instrument (analyseur automatique, etc.) :	Par exemple : Abbott m2000 sp et m2000 rt Roche Cobas ampliprep et Cobas Taqman Siemens VERSANT kPCR Qiagen QIASymphony SP/AS Extracteur + thermocycleur temps réel indépendants
Référence du réactif (référence fournisseur, version notice) :	
Matériau d'étalonnage (références)/ Raccordement métrologique :	Calibrateurs fournisseur
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Par exemple Abbott : 2 niveaux de calibrateurs testés en triple

MISE EN OEUVRE

Opérateurs (Habilitation)	Personnes habilitées (techniciens, biologistes)
Procédure de validation	Par exemple : Procédure de validation générale (ref....) Procédure de validation des Méthodes quantitatives (ref...)
Procédure de gestion de la portée flexible	Référence procédure
Type de portée	A
Période d'évaluation	A déterminer
Date de mise en service	
Autorisation par	Nom du biologiste validant la méthode

MAITRISE DES RISQUES Phase préanalytique		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Matériel	<p>Centrifugeuse : respect des accélérations, vitesses préconisées et températures maximum</p> <p>Enceintes réfrigérées pour conservation des échantillons avant et après centrifugation et décantation éventuelle (+4°C ou congélation < -20°C ou < -70°C selon recommandations fournisseur et durée de conservation)</p> <p>PSM pour décantation</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Qualification de l'installation • Contrat de maintenance maintenance régulière • Métrologie <p>Qualification de l'installation</p> <ul style="list-style-type: none"> • Contrat de maintenance maintenance régulière • Métrologie <p>Qualification de l'installation</p> <ul style="list-style-type: none"> • Contrat de maintenance maintenance régulière
Matière	Prélèvement : types de tubes utilisables	<p>Gestion des non-conformités en réception :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Anticoagulant incorrect ou absent • Quantité insuffisante • Mauvaises conditions de transport (Température et durée de conservation) <p>Ref : manuel de prélèvement Procédure de gestion des non conformités</p>
Main d'œuvre :	<p>Conformité à la prescription:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Identité du patient • Enregistrement des demandes (prise en compte de la demande de biologie moléculaire pour le circuit du prélèvement et sa conservation) • Identification des prélèvements <p>Sécurité de la décantation (risque d'erreur d'identification du tube secondaire)</p>	Habilitation du personnel (Cf grille d'habilitation pour chaque technicien)
Milieu	Organisation des locaux	Plan des locaux
Méthode	Méthode de prélèvement	Manuel de prélèvement diffusé et appliqué

MAITRISE DES RISQUES Phase analytique		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Matériel	<p>Bon fonctionnement de l'automate</p> <p>Contamination de l'instrument</p>	<p>Respect des maintenances de l'instrument Suivi des CIQ</p> <p>Procédure de nettoyage régulier</p> <p>Contrôle périodique de non contamination (Par exemple 1 fois par mois cf recommandations fournisseur)</p>
Matière	<p><u>Matériau de référence</u> Calibrateurs et témoins négatifs et positifs : bonne conservation et non contamination</p> <p>Contrôles de qualité</p> <p><u>Réactifs, consommables</u></p>	<p>Respect des indications fournisseur</p> <p>CIQ : Gestion des lots (longue durée de péremption pour suivi sur une longue période, par exemple 1 an) passage régulier (définir la fréquence en fonction de l'activité : dans chaque réaction puis en fonction des résultats obtenus : au moins une fois/semaine/mois et aux changements de lots et calibration)</p> <p>EEQ : contrôle externe (CTCB, QCMD) ou échanges inter-laboratoires</p> <p>Traçabilité des lots utilisés (gestion informatisée des réactifs) avec fiche de stress éventuelle, contrôle qualité fournisseur</p> <p>Procédure de gestion des alertes de reacto-vigilance</p>

MAITRISE DES RISQUES Phase analytique		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Main d'œuvre :	<p><u>Qualification, compétence et habilitation du personnel</u></p> <p>Utilisation de l'automate :</p> <p>Manipulation des échantillons et réactifs</p> <p>Maintien des performances techniques</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Diplôme et formation initiale - Personnel formé à l'emploi des techniques de biologie moléculaire - Habilitation au poste - Formation à l'emploi du système <p>Passage du CIQ</p> <p>Réalisation de l'EEQ</p>
Milieu	<p>Spécificités techniques :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Local - Température - Alimentation électrique <p>Contamination de l'environnement</p>	<p>Local dédié à l'activité</p> <p>Suivi continu de la T° du local si nécessaire</p> <p>Installation électrique adaptée aux exigences du système</p> <p>Alimentation protégée par courant ondulé</p> <p>Procédure de nettoyage</p> <p>Respect de la marche en avant et des règles de manipulation (habillage, gants...) mais simplifié dans l'utilisation de plateformes fermées.</p> <p>Gestion des déchets</p> <p>Contrôle périodique de non contamination (Par exemple 1 fois par mois – cf recommandations fournisseur) (Rappel)</p>
Méthode	<ul style="list-style-type: none"> - Identification des patients - Utilisation correcte des réactifs (homogénéisation, interversion, etc...) 	<p>Mode opératoire diffusé, appliqué</p> <p>Codes à barres</p>

MAITRISE DES RISQUES Phase post-analytique		
Type de risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Matériel	Transmission des résultats Conservation des résultats	Validation de la connexion Automate- SIL (avec ou sans middleware) Gestion des arrondis Validation de la connexion SIL – serveur de résultats Procédures de sauvegarde et archivage
Matière	Conservation des échantillons après analyse : modalités et durée Elimination des déchets	Procédure spécifique de conservation et d'élimination des échantillons Surveillance métrologique des températures
Main d'œuvre :	Capacité d'analyse des résultats (les résultats faiblement positifs) Prise en charge des résultats dits « invalides »	Habilitation du personnel
Milieu	Organisation des locaux	Plan des locaux
Méthode	Validation des résultats	Procédure de validation médicale et rendu des résultats Confrontation clinico- biologique

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

REPETABILITE

Exigence requise : Ecart-type < 0.25 log copies/ml

Matériel utilisé : échantillons de contrôle ou de patients, ou pool d'échantillons à 2 niveaux de concentration (bas/élevé) : typiquement CIQ de niveau bas proche du seuil de détection, pool de patients à charge virale élevée.

Réaliser x répétitions au sein d'une même série.

Si le nombre de répétitions est réduit (< 30), en expliquer la raison : analyse couteuse, faible intérêt médical.

Une limitation à 5 répétitions peut être justifiée en particulier si la fidélité intermédiaire est conforme

Calculs : moyenne (m), écart-type (sd), CV en %

Interprétation : comparaison aux objectifs fixés

Conclusion : performances atteintes ou non

FIDELITE INTERMEDIAIRE

Exigence requise : Ecart-type < 0.25 log copies/ml

Matériel utilisé : échantillons de contrôle ou de patients, ou pool d'échantillons à 2 niveaux de concentration (bas/élevé) : typiquement CIQ de niveau bas proche du seuil de détection, pool de patients à charge virale élevée.

Réaliser au minimum 15 dosages dans des conditions différentes (jour, opérateur, lot réactif...) sur une durée minimum de 6 semaines pour 2 niveaux de concentration.

Si utilisation des données rétrospectives, indiquer les valeurs obtenues sur le CIQ sur une période la plus longue possible.

Attention, la fidélité intermédiaire ne peut être évaluée que sur un lot de contrôle donné.

Pour des raisons de coût, le nombre de tests peut être limité à 15 sur un des deux niveaux.

En pratique les 30 répétitions seront obtenues avec le CIQ niveau bas au cours de l'utilisation du test permettant la mise à jour de la fidélité intermédiaire après la vérification de méthode initiale sur un nombre de répétition faible.

Calculs : moyenne (m), écart-type (sd), CV en %

Interprétation : comparaison aux objectifs fixés

Conclusion : performances atteintes ou non

JUSTESSE (approche de la justesse)

La justesse est quantifiée par le biais, en utilisant des matériaux de référence certifiés (rarement réalisable) Et/ou un CIQ externalisé.

Comparer la moyenne obtenue (m) lors de l'étude de répétabilité ou de fidélité intermédiaire à la valeur cible assimilée à la valeur vraie (v). La valeur cible est la moyenne des valeurs obtenues par plusieurs laboratoires (CIQ externalisé).

Calcul du Biais % = $((m - v) / v) * 100$

EXACTITUDE

Si on ne dispose pas de résultats de CIQ externalisés, on évaluera l'inexactitude à partir des résultats des EEQ.

Comparer les résultats des EEQ obtenus au laboratoire avec la valeur cible (v) qui est la moyenne des résultats du groupe de pairs (ou moyenne des résultats obtenus par le même principe technique) ou la moyenne de l'ensemble des participants si la dispersion des résultats selon les techniques est faible.

Inexactitude % = $((x - v) / v) * 100$

x= valeur trouvée par le laboratoire pour l'EEQ

INCERTITUDE

Selon les exigences de l'ISO 15 189, « le laboratoire doit déterminer l'incertitude des résultats, dans le cas où cela est **pertinent** et **possible**. »

L'estimation de l'incertitude sera **pertinente** au niveau des seuils de décision clinique et pour la comparaison de résultats (antériorité).

L'estimation de l'incertitude sera techniquement **possible** pour les paramètres quantitatifs, c'est à dire, fournissant un résultat chiffré.

Déterminer le(s) niveau(x) auxquels on souhaite estimer l'incertitude de mesure : niveau proche du seuil de détection/quantification ; niveau intermédiaire pour la comparabilité des résultats en suivi.

1. Evaluer la fidélité intermédiaire

Exploiter par exemple 30 valeurs validées du CIQ pour un même lot de contrôle donné sur une période la plus longue possible pour prendre en compte la contribution des facteurs majeurs d'incertitudes (changement de lot de réactif, calibrations, ...).

Pour un niveau intermédiaire, en l'absence souvent de CIQ la fidélité intermédiaire sera en pratique estimée sur un nombre de tests plus limité et sur une période de temps restreinte.

- Pour chaque niveau de concentration C_x :
 - Calculer le coefficient de variation CV et la moyenne C_x :
 - Calculer l'incertitude de fidélité : $u_{ciq} = CV \times C_x$

2. Quantifier la composante de justesse à l'aide des EEQ

- Calculer les biais E_i pour chaque EEQ : $E_i = X_{labo} - X_{ref}$

Quand on dispose d'un nombre d'EEQ suffisants, on pourra utiliser uniquement les EEQ de niveau de concentration proche de C_x .

- Dans la mesure du possible, on exploitera les résultats de comparaison inter-laboratoires sur une période à déterminer par le biologiste-référent incluant l'année en cours.
- Dans le cas où il n'existe pas d'EEQ suffisant ou s'ils ne sont pas exploitables, on pourra utiliser les biais issus du CIQ externalisé, lorsqu'il existe.
- Supprimer les valeurs aberrantes (erreur de retranscription, erreur d'échantillon, erreur ponctuelle de reconstitution, ...) que l'on peut justifier et en garder la traçabilité.
- Calculer la moyenne E_m (en valeur absolue) et l'écart-type des écarts E_{et}
- Calculer l'incertitude de justesse pour le niveau de concentration C_x :

$$u_{eeq} = \sqrt{(E_m/\sqrt{3})^2 + E_{et}^2}$$

3. Combiner les deux composantes d'incertitudes

- L'incertitude-type composée pour chaque niveau de concentration se calculera de la manière suivante :

$$uc = \sqrt{u_{ciq}^2 + u_{eeq}^2}$$

4. Exprimer le résultat

- L'incertitude élargie U (en % ou dans les unités de la mesure), pour chaque niveau de concentration, se calculera de la manière suivante : $U = u_c \times 2$

Multiplier par 2 permet d'associer un niveau de confiance de 95% à l'incertitude obtenue.

- L'incertitude obtenue est un indicateur interne de la confiance sur le résultat de mesure. Conformément au SH GTA 01, elle ne doit être fournie aux prescripteurs que sur leur demande explicite.
- D'autres méthodes peuvent être utilisées pour l'estimation de l'incertitude, à condition de le justifier.

5. Exploiter les incertitudes estimées

- Une fois l'incertitude estimée, on devra la comparer aux objectifs cliniques
- L'incertitude obtenue est un indicateur interne de la confiance sur le résultat de mesure. Conformément au SH GTA 01, elle ne doit être fournie aux prescripteurs que sur leur demande explicite..

COMPARAISON DE METHODES

Evaluer la concordance entre 2 techniques (moyenne des différences requises entre les 2 techniques $< 0.5 \log$ copies/ml)

- avec la méthode précédemment utilisée au laboratoire (si possible)
- inter automates du même site (appareil en miroir ou back-up)

La comparaison avec l'ancienne technique est nécessaire du fait de la comparaison avec le résultat antérieur.

Rapporter les données bibliographiques.

Matériel utilisé : classiquement 30 échantillons minimum (frais ou congelés), couvrant le domaine de quantification. Pour des raisons de coûts évidentes, il est légitime de réduire ce nombre.

Les échantillons sont choisis en fonction du niveau de charge virale (couvrant la plage de quantification cliniquement pertinente) et de la variabilité génomique (Génotypes VHC, génotypes VIH et recombinants). La diversité d'origine géographique des patients testés sera recherchée et sera représentative du recrutement du laboratoire.

Réaliser les analyses en simple par les 2 techniques.

X : technique de référence/ technique usuelle/ancienne technique

Y : technique à vérifier

On obtient les couples de valeurs (x_i, y_i)

Tracer la **droite de régression à partir de la méthode des moindres carrés** : calcul de la pente et de l'ordonnée à l'origine \rightarrow similitude optimale si **pente =1** et ordonnée à l'**origine=0**.

NB : le calcul du coefficient de corrélation est inutile.

Etablir les **graphiques des différences** $(x_i - y_i)$ en fonction de x_i et, éventuellement des **rapports** (y_i / x_i) en fonction de x_i .

Si des différences significatives sont observées, le biologiste formalisera la conduite à tenir : information des prescripteurs, ou rejet de la méthode si elle ne correspond pas au cahier des charges initial.

INTERVALLE DE MESURE

Non obligatoire en portée A

NB : Pas de valeur de référence

INTERFERENCES

Non obligatoire en portée A

CONTAMINATION entre échantillons

Recherche non obligatoire en portée A pour tous les mesurandes mais recommandée pour les paramètres sensibles.

Toutes les techniques de biologie moléculaires peuvent en être victimes.

Pour les charges virales une plateforme peut être testée sur ce critère pour un paramètre avec extrapolation pour les autres examens réalisés avec les mêmes automates.

On pourra choisir la charge virale VHC du fait de l'importance clinique des résultats faussement faiblement positifs.

Matériel utilisé : Echantillons à concentration très élevée et à concentration basse.

Réaliser la séquence de mesure : 3 fois l'échantillon à concentration élevée (H1, H2, H3→mH) suivi de 3 fois l'échantillon à concentration basse (B1, B2, B3). La séquence peut être répétée plusieurs fois (n : nombre de répétitions de la séquence).

Calculer les différences entre les résultats B1 et B3 et la moyenne de ces différences.

Cette moyenne doit être inférieure à 2,8 fois l'écart type mesuré en niveau de concentration bas (typiquement avec le CIQ)

Calculer le pourcentage de contamination à partir des moyennes des B1, B3 et H :

$$\frac{(mB1 - mB3) / (mH - mB3)}{2.8} \times 100$$

Le taux de contamination doit être proche de zéro, sinon définir la conduite à tenir.

SPECIFICITE ANALYTIQUE & SENSIBILITE DIAGNOSTIQUE

	Bibliographie	Vérification sur site
Spécificité analytique	oui	non
Sensibilité diagnostique	oui	non

STABILITE des réactifs

	Bibliographie	Vérification sur site
Stabilité des réactifs après ouverture	oui	non

ROBUSTESSE

	Bibliographie	Vérification sur site
Comparaison avec méthode de référence	oui	non
Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire	Oui (si existe)	Oui (si possible)

C. POST-ANALYTIQUE

Pré-analytique

Analytique

Post-analytique

1. LA PRESTATION DE CONSEILS EN MICROBIOLOGIE

L'ordonnance 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale positionne et renforce le rôle du biologiste médical dans la prestation de soins au patient. A ce titre la prestation de conseils prend une place essentielle. Ceci constitue une exigence de la norme 15189 clairement documentée dans le recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale (SH REF 02) et dans le guide technique d'accréditation en biologie médicale (SH GTA 01). La prestation de conseils s'avère particulièrement importante dans le domaine de la microbiologie médicale, discipline dans laquelle le microbiologiste apporte, bien au-delà de la simple interprétation des résultats d'examen, son expertise dans le cadre du dialogue avec les médecins cliniciens pour une prise en charge optimale du patient. L'objet de ce document est de proposer les dispositions adaptées à la microbiologie pouvant être mises en œuvre par le biologiste pour répondre aux exigences de la norme et pour développer une mission efficiente de conseil.

1. 1. LE CADRE DE LA PRESTATION DE CONSEILS

Le biologiste s'attachera à recueillir auprès de ses différents correspondants cliniciens leurs besoins et attentes en termes de conseils. La nature et la précision des conseils seront adaptés aux interlocuteurs (Médecin junior ou senior, spécialistes...).

La prestation de conseils s'inscrit dans un contexte réglementaire et normatif, elle doit être assurée et valorisée dans tous ses aspects par les biologistes habilités qui ont la pleine responsabilité de cette mission, elle s'intègre pleinement au cadre du dialogue clinico-biologique et à chaque étape de l'examen biologique :

- Prescription et sa modification éventuelle, modalités de prélèvement
- Recueil des renseignements cliniques
- Interprétation des résultats
- Transmission de résultats critiques ou particuliers (téléphone, Fax, messagerie)
- Aide au diagnostic
- Conseil thérapeutique
- Maîtrise de la qualité de l'environnement des secteurs à risque infectieux
- Communication de données épidémiologiques
- Réunions de concertation pluridisciplinaires
- Participation aux commissions au titre d'expert (CLIN, CAI...)
- Commission d'interface clinico-biologique.

Pour certains domaines précis et limités, le biologiste pourra donner délégation pour le conseil aux internes, préleveurs, techniciens et secrétaires du laboratoire, cette tâche s'effectuera sous la responsabilité du biologiste dans le strict respect du domaine de compétence de chaque professionnel et nécessitera une formation et une habilitation.

1. 2. LA PRESTATION DE CONSEILS À LA PHASE PRÉ-ANALYTIQUE

1.2.1. AIDE À LA PRESCRIPTION ET AU PRÉLÈVEMENT

La diffusion d'éléments pertinents ayant pour objet d'optimiser la prescription et la réalisation des prélèvements constitue la base de la prestation de conseils particulièrement en microbiologie où il sera essentiel de communiquer sur l'intérêt clinique de chaque examen

et sur les conditions strictes à respecter lors du prélèvement.

Le microbiologiste s'assurera notamment:

- De l'élaboration d'un catalogue de prélèvement et d'examen explicite, détaillé, régulièrement mis à jour et accessible précisant en particulier les indications, le choix du prélèvement pertinent et les conditions de ce prélèvement, les supports ou récipients à utiliser, la nature et le site du prélèvement, le volume minimal nécessaire, les délais d'acheminement et les conditions de conservation à respecter, les techniques mises en œuvre par le laboratoire.
- De la rédaction de protocoles spécifiques relatifs à des prélèvements sensibles ou requérant des conditions rigoureuses (hémocultures, ponctions de séreuses, biopsies, charges virales...)
- De l'élaboration de documents précisant les indications de certains examens particuliers.

La mise en œuvre d'un logiciel de prescription connectée qui permet de guider le clinicien dans sa prescription en s'appuyant sur des critères établis en partenariat avec le biologiste médical pourra contribuer au respect des bonnes pratiques.

1.2.2. LE RECUEIL DES RENSEIGNEMENTS CLINIQUES

La prise en charge d'un prélèvement (choix des techniques, choix des milieux àensemencer), mais également l'interprétation des résultats nécessitent que le microbiologiste développe une stratégie pour obtenir les données cliniques utiles relatives au patient. Le SH GTA 02 précise la notion de « récupération active des renseignements cliniques ».

Les renseignements qu'il est nécessaire d'obtenir pour l'interprétation des examens doivent être pertinents et sont fonction de l'examen, ils concernent le patient, ses antécédents, sa pathologie, ses traitements anti-infectieux, ses facteurs de risques, les données para-cliniques éventuellement utiles... Dans ce cadre, il est essentiel que le biologiste puisse avoir accès au dossier du patient.

Le format des bons de demande d'examen ou le paramétrage du logiciel de prescription connectée doit faciliter l'obtention des données cliniques.

Les données cliniques ainsi obtenues doivent demeurer accessibles pour l'interprétation du résultat : par exemple en les intégrant dans le dossier patient dans le SIL ou en scannant les bons de prescription.

L'analyse de l'obtention des renseignements cliniques peut donner lieu à un indicateur qualité qui doit être évalué en revue de direction.

1.2.3. LA REVUE DE PRESCRIPTION

La revue de prescription par un personnel formé et habilité doit permettre de vérifier la pertinence de la prescription (choix des examens, non redondance, respect des rythmes recommandés dans le suivi des infections chroniques), la pertinence du prélèvement, sa conformité et les données cliniques obtenues.

Elle peut être tracée grâce à un commentaire « échantillon conforme aux critères qualité du laboratoire » sur le compte rendu. Le cas échéant le biologiste contactera le médecin prescripteur pour obtenir les renseignements manquants voire si nécessaire modifier ou compléter la prescription, étapes tracées dans le dossier du patient.

1.2.4. INFORMATION DES PRESCRIPTEURS ET DES PRÉLEVEURS

Le laboratoire informe les cliniciens sur la pertinence des analyses, la place des nouvelles techniques, et les préleveurs sur les changements de matériels par le biais, à titre d'exemple:

- Diffusion de lettre du laboratoire
- Site internet
- Réunion clinico-biologique
- FMC, EPU organisés par le laboratoire

1. 3. LA PRESTATION DE CONSEILS À LA PHASE POST-ANALYTIQUE

1.3.1. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'interprétation des résultats est obligatoire et doit figurer clairement, chaque fois que nécessaire, sur le compte-rendu. Elle est rendue possible grâce à l'obtention des données cliniques envisagées ci-dessus.

A titre d'exemple, doivent ainsi apparaître clairement sur le compte-rendu :

- -La non significativité d'une espèce microbienne retrouvée isolément dans un prélèvement d'hémoculture (Staphylocoque à coagulase négative, *Corynebacterium* spp...).
- L'interprétation d'un ECBU au regard de son résultat (culture, cytologie) et du contexte clinique.
- L'interprétation d'un mécanisme de résistance aux antibiotiques notifiant clairement les conséquences en matière de prise en charge du patient et d'hygiène (précautions complémentaires)
- L'interprétation d'un génotypage en termes de résistance aux antiviraux
- L'interprétation des résultats de sérologie infectieuse.
- La nécessité éventuelle de contrôler un résultat sur un autre prélèvement
- La nécessité éventuelle de compléter un bilan pour l'interprétation d'un résultat ou la prise en charge future du patient.
- Certaines références sur lesquelles s'appuie le biologiste pour faire son interprétation.
- L'interprétation doit être harmonisée entre les différents biologistes du laboratoire : commentaires codés prédéfinis consensuellement entre les biologistes inclus dans le système informatique. L'organisation régulière de réunions internes entre biologistes doit faciliter l'application de ces mesures.

1.3.2. RÉSULTATS TÉLÉPHONÉS ET TRANSMISSION DE RÉSULTATS CRITIQUES

La prestation de conseils s'effectue au quotidien en communiquant en urgence des résultats définitifs ou partiels (examen microscopique sur hémoculture, par exemple) importants pour la prise en charge du patient, entraînant éventuellement des décisions thérapeutiques rapides ou un suivi rapproché particulier. Il convient de mettre en place des outils permettant d'assurer une traçabilité des appels reçus ou sortants (cahiers, registres, informatique) mentionnant les données communiquées et les intervenants. L'organisation du laboratoire doit faciliter l'application de ces dispositions par exemple en tenant à jour un tableau de service précisant le biologiste à contacter.

1.3.3. DIALOGUE AVEC LE CLINICIEN – CONSEIL THÉRAPEUTIQUE

De par sa compétence, le microbiologiste dialogue au quotidien avec les cliniciens non seulement en termes de démarche diagnostique mais également en termes de prise en charge notamment thérapeutique des patients. Il convient, particulièrement dans ce dernier cas, de respecter le champ d'action de chaque professionnel et d'apprécier l'impact du conseil donné. Ainsi, si le microbiologiste n'a pas la légitimité de se substituer à l'infectiologue ou au spécialiste, il doit cependant participer activement au conseil thérapeutique et de prise en charge dans le cadre d'une approche pluridisciplinaire.

1. 4. AUTRES ASPECTS DE LA PRESTATION DE CONSEILS

1.4.1. EN MATIÈRE D'HYGIÈNE HOSPITALIÈRE

Le microbiologiste est un partenaire indispensable des hygiénistes, il est le collaborateur privilégié de l'EOH, il apporte son expertise dans les décisions et les actions à mener. Il doit participer au CLIN ou à la sous-commission de la CME chargée de ce domaine.

1.4.2. EN MATIÈRE DE BON USAGE DES ANTI-INFECTIEUX

La prestation de conseils par le microbiologiste doit également s'inscrire dans le cadre transversal du bon usage des anti-infectieux. Le microbiologiste doit donc s'impliquer activement dans les formations et dans les instances et comités dont cela constitue la mission.

Le microbiologiste a vocation à participer ainsi :

- Aux actions de formation (EPU...)
- Aux RCP
- A la CAI (commission des anti-infectieux) : rédaction de protocoles, choix des molécules...

Le microbiologiste diffuse auprès des cliniciens et auprès des instances les données de la surveillance épidémiologique microbienne dont il a la responsabilité.

Pour les établissements qui ont mis en place une équipe opérationnelle en infectiologie (recommandations de la SPILF 2002), le microbiologiste doit être un acteur incontournable au sein de cette structure en partenariat avec le clinicien référent et le pharmacien.

1.4.3. PARTICIPATION AU SIGNALEMENT

Le microbiologiste se trouve fréquemment en première ligne dans la détection d'évènements infectieux particuliers, à ce titre il est impliqué dans la déclaration obligatoire des maladies infectieuses et dans le signalement. Une procédure écrite au laboratoire peut être utile pour formaliser cet aspect.

1. 5. EVALUATION ET DÉMARCHE DE PROGRÈS

Le microbiologiste doit participer à un programme de développement professionnel continu qui lui permettra l'actualisation de ses connaissances. Il est par ailleurs essentiel qu'il participe régulièrement à des congrès, qu'il consulte des revues médicales spécialisées, qu'il adhère à des sociétés savantes relevant de sa discipline.

1. 6. RÉFÉRENCES

Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale, JORF n°00012 du 15 janvier 2010, page 819, texte n°43.

Norme NF ISO 15189 : Laboratoires d'analyses de biologie médicale – exigences particulières concernant la qualité et la compétence. AFNOR. www.afnor.org

SH REF 02- Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale. www.cofrac.fr

SH GTA 01- Guide technique d'accréditation en biologie médicale. www.cofrac.fr

REMIC, Référentiel en microbiologie médicale, Société Française de Microbiologie.

European Manual of Clinical Microbiology, 1st edition 2012, SFM, ESCMID.

REVIR, Référentiel en virologie, Société Française de Microbiologie.
Vivactis Plus.

Stratégie d'antibiothérapie et prévention des résistances bactériennes en établissement de santé, Recommandations professionnelles – avril 2008 – HAS.

Comment améliorer la qualité de l'antibiothérapie dans les établissements de soins, 14ième conférence de consensus – mars 2002 – SPILF.

Szymanowicz.A et coll. Recommandations concernant les prestations de conseil et l'interprétation des résultats de biologie médicale. Ann Biol Clin 2012 ; 70 (Hors série n°1) : 47-74.

Klein J-P. Le processus postanalytique en bactériologie clinique dans le cadre de l'accréditation. Rev. Fr Labo 2013; 449; 25-38



SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE

Siège social :

Institut Pasteur Paris

Bureaux :

191, rue de Vaugirard

75015 Paris

Tél. 01 45 66 77 46 / 79 44

Fax. 01 45 67 46 98

www.sfm-microbiologie.org

comptabilite@sfm-microbiologie.org

secretariat@sfm-microbiologie.org