

Compte-rendu de la réunion organisée conjointement par Labac et la SFM avec la participation du COFRAC

Mardi 30 janvier 2018 - Paris Novotel Bercy



Contexte de la réunion

Il s'agissait d'une réunion sur les pratiques professionnelles en Bactériologie. L'objectif était d'échanger sur les pratiques propres à cette discipline, afin de définir si besoin des positions consensuelles. Les questions étant particulièrement diverses et variées, les sujets prioritaires étaient ceux issus de problématiques les plus fréquemment identifiées, notamment à l'occasion des évaluations du Cofrac.

Cette réunion n'est pas à considérer comme une réunion d'harmonisation des évaluateurs du Cofrac.

Les diaporamas concernant les différentes interventions ainsi que les vidéos sont disponibles sur le site de LABAC <http://www.labac.eu/> et sur le site de la SFM espace adhérent <http://www.sfm-microbiologie.org/>.

Programme

Organisateurs et modérateurs : **Patrice LAUDAT – Jean-Pierre BOUILLOUX**

Allocutions de Jean-Marc Giannoli (Président de Labac), Gérard Lina (Président de la SFM) et Hélène Méhay (Directrice de la Section Humaine COFRAC).

1-Conditions de transports des échantillons destinés aux analyses microbiologiques : notion de délais optimaux et de délais acceptables – **Patrice LAUDAT**

2- Pratique des hémocultures : limites des recommandations professionnelles en matière de prélèvement - **Audrey MERENS**

3-Ensemencements sur site pré-analytique et dérive des pratiques - **Luc ESSEMILAIRE**

4- Ages des cultures bactérienne et Identification/Antibiogramme : peut-on valider des dispositions du laboratoire en dehors du domaine de validation du fournisseur ? - **François GUERIN**

5- Application de nouvelles recommandations du CA-SFM : les pièges - **Christian CATTOEN**

6- Antibiogramme réalisé directement à partir du milieu d'hémoculture : pratique accréditable ? - **Christian CATTOEN**

7- Modalités d'application du chapitre 5.3.2 aux "réactifs complexes" en microbiologie - chapitre § 5.3.2.3 de la norme 15189 - **Brigitte LAMY**

8- Niveaux de stérilité requis pour les dispositifs de prélèvement - **Patrice LAUDAT**

9- Stratégie des CIQ en bactériologie - **Mouloud HAMMAD**

10-Stratégie des EEQ en bactériologie - **Jean-Louis GALINIER**

11- Un CNR doit-il être évalué comme un sous-traitant ? - **Gérard LINA**

12- Enceintes en Atmosphère enrichie en CO2 – **Jean-Pierre BOUILLOUX**

13- Prestation de conseil : gestion des référentiels et conseils en antibiothérapie – **Patrice LAUDAT et Gérard LINA**

14- Adaptation de la technique Maldi-Tof Portée A/Portée B ? – **Agnès FERRONI**

15-Gestion de la portée flexible en bactériologie – **Agnès FERRONI**

1- Conditions de transport des échantillons destinés aux analyses bactériologiques : notion de délai optimal et de délai acceptable

Patrice LAUDAT

Concernant les conditions de transport des échantillons destinés aux analyses bactériologiques, qu'il s'agisse d'établir le diagnostic d'une infection dans un contexte aigu et urgent (méningite par exemple) ou d'urgence relative ou encore d'assurer la préservation d'un prélèvement précieux voire même de portage (isoler ou non le patient par exemple dans le cadre des recommandations du CLIN), tout doit être mis en place pour assurer le transport rapide du prélèvement au laboratoire. Cependant, du fait de situations locales, liées aux restructurations et à l'éloignement des sites pré/post-analytiques du plateau technique, le recours aux milieux de transport des échantillons s'impose de plus en plus.

Le délai acceptable n'est pas le délai maximal permis par le milieu (48h pour un ECBU par exemple) et il convient de prendre en compte le délai de rendu des résultats pour une prise en charge adaptée des patients (sinon à quoi bon réaliser des prélèvements microbiologiques de diagnostic).

Exemple : hémocultures, délai optimal (le plus rapidement restant le plus efficace) et acceptable (≤ 24 heures - température ambiante). Il convient de faire la différence entre l'absence d'impact technique (la bactérie reste viable jusqu'à 24 heures) et l'impact clinique qui se mesure entre le moment du prélèvement et celui du résultat (positivité, Gram....), et de ce fait un délai de 24 heures avant mise en incubation doit rester l'exception.

L'analyse de risque doit intégrer le type de recrutement et/ou le contexte clinique (ex : LCR urgent en cas de suspicion clinique de méningite, mais non urgent en cas de prélèvement systématique de surveillance d'une dérivation ventriculaire externe).

Positions consensuelles :

-Le laboratoire doit réaliser pour chaque type d'échantillon une analyse de risque relative aux conditions de transport des échantillons. Par exemple : un PV avec une recherche de gonocoque par PCR associée doit-il répondre aux mêmes critères pré-analytiques qu'un PV classique sans PCR associée ?

-Les notions de délai optimal, acceptable et non adapté doivent être introduites

-En cas d'utilisation d'un milieu de transport, le délai de conservation à température ambiante est à adapter en fonction des performances du milieu de transport utilisé. Le laboratoire doit s'assurer auprès du fournisseur que les qualités du milieu envisagé correspondent bien à ses besoins (performances/norme M40-A du CLSI). Il conviendra de faire de même pour le choix d'un tube boraté pour le transport des urines : obtenir des données sur la survie des bactéries.

A défaut de milieu de transport disponible et si la nature de l'échantillon le permet, il sera réfrigéré et maintenu ainsi jusqu'à son analyse en température dirigée à $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (chaîne du froid).

-Le laboratoire doit s'engager dans une politique d'amélioration continue et doit pouvoir démontrer à l'aide d'indicateurs qualité pertinents le résultat de cette amélioration.

Pour les détails, se référer aux indications du **REMIC 2018 à paraître**. www.sfm-microbiologie.org

| Echantillon prélevement | Optimal | Acceptable | Non adapté* |
|----------------------------------|---|--------------------------------|---------------------------------|
| Hémocultures | Dès que possible (< 12 heures à température ambiante) | 12 à 24 heures | > 24 heures* |
| LCR et méningite | Sans délai à température ambiante | < 2 heures | > 2 heures |
| Urines, ECBU | Milieu transport < 24 heures à température ambiante ou sans milieu transport < 12 heures réfrigéré et chaîne du froid | < 24 heures < 24 heures | > 24 heures* > 24 heures |
| Autres données REMIC 2018 | | | |

* Sauf échantillon précieux ou non renouvelable (dérogation argumentée possible)

Pour en savoir plus :

- 1- Baron E-J et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases : 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). CID, 2013, 57; e22-121.
- 2- HAS, Comment sécuriser le circuit d'un prélèvement réalisé au bloc opératoire. Juin 2017.
- 3- HAS, Prise en charge du nouveau-né à risque d'infection néonatale bactérienne précoce (≥ 34 SA). Septembre 2017.
- 4- Galinier J-L, L'analyse bactériologique : l'erreur est dans le pré, Feuilles Biol., 332, 57-63.

2- Pratique des hémocultures : limites des recommandations professionnelles en matière de prélèvement Audrey MERENS

Le REMIC 2015 indique : « chez l'adulte, un volume minimal de 20 ml (2 flacons) augmente la positivité de 30 %, comparativement au volume, très insuffisant, de 10 ml. Chez l'adulte, le volume minimum est de 20 ml de sang, soit 10 ml effectif de sang par flacon ; avec un optimum de 40 à 60 ml (4 à 6 flacons) », **pour autant y -a t- il écart si le laboratoire accepte une seule paire de flacons ?**

Positions consensuelles :

-Une hémoculture « solitaire » ne constitue pas en soi une situation d'écart dans la mesure où le clinicien est informé des préconisations en amont et aval de l'analyse.

-Les besoins de prise en charge du patient sont à prendre en compte (par exemple notion d'antibiothérapie précoce) ainsi que le contexte clinique (patient en état de choc hypovolémique, brûlé, faible capital veineux). D'autre part, chez le nouveau-né et l'enfant la concentration bactérienne est plus élevée de sorte que ces critères ne sont pas adaptés, comme mentionné dans les diverses versions du référentiel (REMIC v2015 et antérieure).

-La problématique doit être abordée dans le dossier de validation des méthodes « hémoculture ». Le laboratoire identifie les points critiques et met en place des moyens de maîtrise pertinents (cf « maîtrise des risques » - QUAMIC 2017 p 104).

-Exemple de réponse adaptée du laboratoire :

→ Le laboratoire a mis en place des indicateurs de suivi :

- Enquêtes ponctuelles de pesée
- Vérification visuelle systématique du volume de sang par flacon
- Nombre de flacons par épisode et par service
- Taux de contamination
- Ecologie...

→ Les indicateurs de suivi recommandés ont pour but de servir de système de pilotage de l'amélioration continue de la qualité à l'échelle d'un établissement de soins ou d'une patientèle et non à l'échelle du dossier patient (QUAMIC).

→ Le laboratoire a mis en place une politique d'informations des services prescripteurs sur les bonnes pratiques, par exemple : Guide des prélèvements, Guide des analyses, Flash Info Labo...

→ Le laboratoire utilise des interprétations adaptées dans son compte-rendu de résultats notamment des commentaires sur la qualité de l'échantillon et sur l'aptitude des échantillons en termes de sensibilité de détection d'une bactériémie ou d'une fongémie (cas des hémocultures « solitaires ») qui pourraient compromettre les résultats de l'examen.

-La notion de dispositions optimales et acceptables peut être introduite dans les documents qualité du laboratoire.

3- Ensemencements sur site pré-analytique (ligne BA2) et dérive des pratiques Luc ESSEMILAIRE

La ligne de portée BA2 (SH INF 50) offre la possibilité d'ensemencer certains échantillons sur les sites pré-analytiques.

Comment garantir la qualité des résultats quand les activités des différents sous-processus sont réalisées sur des sites différents d'un même LBM ou dans un autre LBM ?

Illustration par une situation d'écart :

Constat : le site A du LBM X met en culture et incube certains spécimens (liquide articulaire, prélèvements broncho-pulmonaires), les milieux sont ensuite transférés sur le PT.

Les risques liés à la température et au temps de transport vers le plateau technique (2h30 à 15-25°C) n'ont pas été pris en compte par le LBM.

Conséquences avérées et risques induits :

- Modification significative de la température pendant la phase initiale d'incubation → risque de perte de bactéries sensibles aux conditions environnementales.

Positions consensuelles :

- L'utilisation de la ligne BA2 (SH INF 50) – mise en culture uniquement – est possible, notamment pour des échantillons fragiles et/ou dans un contexte de risque vital élevé, les dispositions prévues et documentées par le LBM doivent être adaptées car elle peut être une source importante de mauvaise pratique de bactériologie : Durée et température d'incubation difficiles voire impossibles à gérer (somme du temps d'incubation sur site pré/post-analytique à 35°C, puis transfert des boîtes à température ambiante, puis incubation complémentaire sur le plateau technique pour assurer un temps minimal d'incubation de 18-24h...).

- Avec uniquement la ligne BA2 sur un site pré/post-analytique, aucun résultat ne peut être rendu (y compris les cultures stériles), les milieux de culture doivent obligatoirement être transférés au plateau technique pour lecture et analyses complémentaires si besoin en fonction du contexte (prolongation de l'incubation, milieux additionnels, coloration de Gram...).

- La stratégie du laboratoire doit être argumentée et documentée (types d'échantillons concernés...), cette pratique doit apporter une valeur ajoutée pour la prise en charge des patients.

- Une analyse de risque doit être disponible et doit démontrer que cette pratique est au moins équivalente à un ensemencement sur le plateau technique : compétence du personnel, maîtrise des conditions environnementales et absence de contamination croisée, stockage des milieux de culture, métrologie des équipements, conditions d'incubation et de transfert des milieux (température, durée, atmosphère)...

4- Ages des cultures bactériennes et Identification/Antibiogramme : peut-on valider des dispositions du laboratoire en dehors du domaine de validation du fournisseur ? François GUERIN

-Les bactéries à croissance rapide, soit essentiellement celles en cause dans les infections du tractus urinaire (*E coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus aureus*....), cultivent en 18-24h. Les bactéries à croissance plus lente (*Staphylococcus saprophyticus*, *Corynebacterium urealyticum*....) peuvent nécessiter une durée d'incubation supérieure à 18-24h. Aussi, pour une bonne pratique, il est souvent indispensable d'incuber au-delà de 18-24h même pour les ECBU dans certains cas : risque de méconnaître un *Staphylococcus saprophyticus* au milieu de quelques colonies de *E. coli* par exemple.

Pour tous les autres prélèvements, l'incubation à 48h au minimum est la règle à respecter.

-La phase de déclin ou de mort des bactéries dépend du stress auquel les bactéries vont être soumises : dessiccation, acidification du milieu, présence de dérivés de peroxyde d'hydrogène... Pour la grande majorité des espèces d'intérêt clinique (sauf *Streptococcus pneumoniae*), la survie sur gélose (par exemple pendant moins de 72h à 35°C ou bien 24h à 35°C puis pendant 24 à 48h à 4°C) n'altère en rien la survie bactérienne à la phase stationnaire.

-La pratique du repiquage peut entraîner un risque de perte de plasmides de résistance aux antibiotiques (*Fitness* bactérien) et le LBM risque de passer à côté d'une souche résistante avec perte de chance pour le patient.

-Les fournisseurs n'ayant pas validé la démarche d'identification sur cultures âgées, les laboratoires sont conduits à réaliser des études internes pour valider leurs pratiques et les évaluateurs à rédiger des fiches d'écart du fait du non-respect des indications du fournisseur ou bien à demander le passage en portée B.

Illustration par deux situations d'écart :

Fiche d'écart 1 :

Constat : Les dispositions du LBM pour la réalisation de l'ECBU indiquent une durée de culture de 18 à 24h. Ces durées sont celles figurant dans le référentiel REMIC et préconisées par le fournisseur (ex ; fiches VITEK bioMérieux®). Or, en pratique, des identifications et antibiogrammes sont réalisées sur des cultures supérieures à 24h (le lundi et les lendemains de jours fériés).

Conséquences avérées : non-respect des dispositions du laboratoire, du référentiel et des recommandations fournisseur

Risque induit : risque d'identification ou de rendu d'antibiogramme non maîtrisés.

Fiche d'écart 2 :

Constat : Les traçabilités effectuées sur le dossier n°xxx du 16 mai 2016 montrent que les boîtes incubées le week-end ont été sorties sur la paillasse, mais non techniquées (il n'y a pas de dispositions sur ce sujet). Dans ce cas précis, un « long week-end », le traitement a été fait le 17 et le résultat rendu le 19.

Conséquences avérées : Non-respect des préconisations du REMIC (référentiel utilisé par le LBM).

Risque induit : Ne pas pouvoir isoler ou identifier une souche correctement.

Dans la réponse du LBM, il est indiqué que la quasi-totalité des examens concernés sont des ECBU avec une identification par méthode automatisée VITEK® et antibiogramme sur milieu solide.

Positions consensuelles pour la réalisation des antibiogrammes :

- L'incubation de 24 à 48h n'a pas d'impact pour les méthodes non rapides comme la technique de diffusion en milieu gélosé, Microscan®, BD Phoenix® car si l'on regarde la courbe de vie d'une bactérie comprenant 1) une phase de croissance (18- 24h en fonction des espèces) puis 2) une phase stationnaire (à nouveau 18-24h) sans mortalité associée (phase décroissance) rien ne justifie de pénaliser un laboratoire qui réalise des antibiogrammes dans l'intervalle de 18 à 36h. Il n'existe aucune restriction validée scientifiquement pour refuser cette pratique.

-Le LBM doit réaliser une analyse de risque concernant la réalisation des identifications bactériennes et des antibiogrammes en exploitant ses données, d'éventuelles études expérimentales et les éléments de bibliographie. Il adaptera ses pratiques en fonction des résultats obtenus (limitation de cette pratique pour certains couples « antibiotique/espèce bactérienne »...).

-Quelques pistes :

→ Réaliser une étude de robustesse, comparaison des résultats des antibiogrammes de cultures de 18-24h (routine de semaine) et de 48 et/ou 72h (week-end et jours fériés).

→ Profiter des CIQ pour réaliser cette étude à titre prospectif et analyser les résultats en concordances essentielles (diamètres ou CMI attendu(e)s) sur une période garantissant le passage de l'ensemble des souches du CIQ (5 fois par exemple).

→ Toujours en prospectif, réaliser les antibiogrammes de routine en double après 24 et 48 heures d'incubation sur une sélection d'espèce de croissance rapide et représentatives, avec mécanismes de résistances, choisies en fonction de l'écologie du LBM : *E coli* (10), *Klebsiella spp* (4), *Proteus spp* (4), *S. aureus* (4), Entérocoque (4), *Pseudomonas aeruginosa* (4).....pour un total de 30 minimum. Analyser en concordances catégorielles (S, I, R et DTM (discordance très majeure), DM (discordance majeure), dm (discordance mineure), voir page 230 du QUAMIC, annexe 2)

Critères : La FDA considère comme recevable, en comparaison de méthode, un écart de 10% avec moins de 1,5% de DTM et 3% de DM.

Cette approche évite le travail supplémentaire lié à une investigation similaire réalisée sur souches conservées.

→ Sortir des souches congelées : toujours possible en complément, mais travail supplémentaire inutile et moins pertinent que l'autre approche.

-Le LBM pourra aussi interroger le fournisseur par écrit à ce sujet.

Remarque : le représentant de la société BioMérieux® présent à la réunion précise que la responsabilité du fournisseur ne peut être engagée si les pratiques du laboratoire ne correspondent pas à celles qui ont été validées par le fabricant.

-Le non-respect strict des préconisations du fabricant ne constitue pas une situation d'écart si une analyse de risques est associée et si un argumentaire est apporté.

Références :

- 1- CASFM 2017 V1 www.sfm-microbiologie.org
- 2- REMIC 2015 V5
- 3- QUAMIC 2017 V1
- 4- L'antibiogramme automatisé, P Courvalin et coll., 1988, MPC/Vigot, Paris
- 5- C Quentin, L'antibiogramme automatisé entre pièges et sécurité, 2012, Feuillet Biologie, 307, 19-31
- 6- Antibiogramme, P Courvalin et R Leclerc, 3^{ème} éd, 2012, ESKA, Paris

Bibliographie sur les performances du vitek2 :

1a: Bobenchik AM, Hindler JA, Giltner CL, Saeki S, Humphries RM. Performance of Vitek 2 for antimicrobial susceptibility testing of Staphylococcus spp. And Enterococcus spp. J Clin Microbiol. 2014 Feb;52(2):392-7.

2a: Hegstad K, Giske CG, Haldorsen B, Matuschek E, Schønning K, Leegaard TM, Kahlmeter G, Sundsfjord A; NordicAST VRE Detection Study Group. Performance of the EUCAST disk diffusion method, the CLSI agar screen method, and the Vitek 2 automated antimicrobial susceptibility testing system for detection of clinical isolates of Enterococci with low- and medium-level VanB-type vancomycin resistance: a multicenter study. J Clin Microbiol. 2014 May;52(5):1582-9.

3a: Paim TG, Cantarelli VV, d'Azevedo PA. Performance of the Vitek 2 system software version 5.03 in the bacterial identification and antimicrobial susceptibility test: evaluation study of clinical and reference strains of Gram-positive cocci. Rev Soc Bras Med Trop. 2014 May-Jun;47(3):377-81.

4a: Bobenchik AM, Deak E, Hindler JA, Charlton CL, Humphries RM. Performance of Vitek 2 for antimicrobial susceptibility testing of Enterobacteriaceae with Vitek2 (2009 FDA) and 2014 CLSI breakpoints. J Clin Microbiol. 2015 Mar;53(3):816-23.

5a. Johnson KN, Andreacchio K, Edelstein PH. Detection of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci by the Vitek 2 system. J Clin Microbiol. 2014 Sep;52(9):3196-9.

5- Application de nouvelles recommandations du CA-SFM : les pièges

Christian CATTOEN

Les recommandations dont disposent les laboratoires font appel à différentes méthodes en matière d'antibiogramme : milieu liquide/automate en première intention puis vérifications et tests complémentaires en diffusion ou CMI (E test...).

-Le laboratoire choisit la date de prise en compte des nouvelles recommandations à son initiative pour la technique de diffusion.

-Les fournisseurs d'automates ne pourront au mieux réaliser la mise à jour en milieu ou fin d'année.

-Quelle stratégie adopter lors de la publication de nouvelles recommandations du CA-SFM pour la mise en place de cette nouvelle version afin d'éviter le risque de DTM et DM ?

Positions consensuelles pour l'application de nouvelles recommandations du CA-SFM :

-La mise en place d'un nouveau CA-SFM nécessite une analyse d'impact, un plan d'action avec analyse de risque associée afin d'éviter des erreurs majeures dans l'interprétation des antibiogrammes réalisés avec 2 méthodes différentes et interprétés avec 2 référentiels différents (année N et N-1).

-Le laboratoire doit avoir clairement écrit ses dispositions concernant un changement de version du référentiel.

-Une situation d'écart peut être envisagée si un laboratoire utilise 2 versions simultanément du CA-SFM, une étant utilisée pour les méthodes automatisées et l'autre pour les techniques en diffusion par exemple sans avoir effectué d'analyse d'impact.

6- Antibiogramme réalisé directement à partir du milieu d'hémoculture : pratique accréditable ? Christian CATTOEN

-Un laboratoire de centre hospitalier ou privé est confronté à de véritables urgences parfois vitales. La pratique d'antibiogramme réalisé directement à partir du milieu d'hémoculture ou de l'urine permet de gagner un temps précieux dans la mise en place d'une antibiothérapie adaptée. Cette pratique est réservée aux hémocultures positives après vérification par coloration de Gram (Gram + et Gram -) et aux urocultures pédiatriques positives au Gram (Gram- uniquement). L'exploitation des résultats n'est autorisée qu'après vérification de la qualité de l'inoculum (densité et pureté). L'objectif est de fournir des résultats rapides mais fiables pour la prise en charge des patients dans un contexte d'urgence infectieuse.

-Pour assurer la continuité des soins en bactériologie, un classement en niveaux d'urgence de A à D a été défini : REMIC 2015, 5.1, chapitre 10, pages 93-103. La classe A correspond à la définition suivante : « le résultat de ces examens peut modifier le pronostic vital ou fonctionnel. La mise en œuvre immédiate et la réponse, même partielle, est justifiée 7j/7 et pour certains 24h/24 ». Dans cette catégorie figure : les hémocultures (mise en culture et traitement des échantillons « positifs ») et les urines dans un contexte de pyélonéphrite chez l'enfant.

- Extrait du CASFM-EUCAST 2017 « préparation de l'inoculum » :
« ...Cette technique, qui reprend in extenso les recommandations EUCAST, et qui ne répond certainement pas à certaines situations d'urgence, n'exclut pas la possibilité de réalisation d'un antibiogramme direct sur la primo-culture sans repiquage pour les prélèvements (LCR, Hémoculture...) dans des situations d'urgence (Un groupe de travail explore actuellement sur la faisabilité de la réalisation d'un antibiogramme directement sur les flacons d'hémoculture). »

Analyse des 5 publications :

Les publications sont de niveau international avec comité de lecture, elles sont récentes de 2011 à 2016. Deux concernent les urines (des effectifs de 233 pour Sunquist (APMSI,2014,123 ;152-155) et de 119 pour Karlijn (Scand J Infect Dis 2011, 43,771-776)). Une, divers prélèvements hors urines et hémocultures (Coorevits (Eur J Clin Micro Infect Dis,2015,34 ;1207-1212) incluant 123 prélèvements) : aspiration bronchique, génital, pus profonds ... Enfin deux concernent les hémocultures : Stokkou (Europ J Micro and Immunology, 2015), 428 hémocultures et 110 tests internes et Daley (Can J Infect Dis, 2016) 89 hémocultures mais du milieu communautaire ce qui n'est pas représentatif d'un laboratoire de type hospitalier.

Critères utilisés :
Résultats tests directs/méthode de référence du laboratoire
Exigence FDA :
CC* > 90%,
DTM < 1.5%
DM < 3%

*CC (Concordances Catégorielles) : S, I ou R

| Type de discordance | Libellé | Définition |
|---------------------|--|---|
| DTM | Discordance très majeure <u>Very major error: VME</u> | Résultat trouvé sensible (S) alors que la souche est résistante (R). |
| DM | Discordance majeure <u>Major error: ME</u> | Résultat trouvé résistant (R) alors que la souche est sensible (S). |
| Dm | Discordance mineure <u>Minor error: mE</u> | Souche trouvée sensible ou résistante répondue à tort intermédiaire (I) OU souche intermédiaire répondue à tort S ou R. |

Urines : les deux études donnent des concordances catégorielles > à 90 % et des DTM < à 1.5 %, et donc répondent aux critères FDA.

Hémocultures : l'étude de Stokkou sur 428 hémocultures donne CC > à 95 % et DTM 1.28. Ces trois études concluent positivement à la possibilité de réaliser les ATB directement sur échantillons positifs.

L'étude de Daley sur 89 hémocultures de milieu communautaire, analyse en fonction de la réponse clinique au traitement et procède donc d'une analyse différente : Se (sensibilité) et Sp (spécificité). Elle conclut avec prudence sur l'utilisation des résultats, fonction des molécules testées, notion d'antibiogramme réduit.

Illustration de la problématique par une fiche de clarification :

Constat : Pour les hémocultures et urocultures pédiatriques, un inoculum direct est effectué à partir du flacon d'hémoculture ou d'urine. Le LBM a validé cette pratique selon différentes dilutions testées en comparaison avec un inoculum calibré à 0.5 McFarland. Différentes conditions ont été définies selon le type de bactéries et le LBM s'est appuyé sur plusieurs publications afin de définir les conditions expérimentales et la pertinence de cette approche.

Ex1 Hémocultures : bacilles à Gram négatif : 5 gouttes dans 9 ml de sérum physiologique ; vérification de la confluence des colonies à la lecture et antibiogramme en milieu liquide sur un autre flacon

Ex2 Uroculture :

*Bacilles à Gram négatif : écouvillonnage direct ; vérification de la confluence des colonies à la lecture
Cocci à Gram positif : 2 gouttes directement ; vérification de la confluence des colonies à la lecture ;
Staphylocoque et entérocoque : antibiogramme Vitek® à partir des colonies ; autres cocci gram positif : antibiogramme refait si inoculum incorrect*

La situation a été jugée acceptable par la CAC : le LBM s'appuie sur des méthodes décrites dans des publications reconnues, récentes et suffisamment complètes en termes de performances de méthodes et l'analyse réalisée est détaillée et étaye les pratiques.

Positions consensuelles pour la réalisation de l'antibiogramme directement à partir du milieu d'hémoculture :

-Au vu des conditions techniques de réalisation, en respect avec le contenu des publications internationales fournies, sans interdiction du CA-SFM et dans le contexte particulier de l'urgence infectieuse et avec un encadrement technique appropriée de contrôle et de validation des résultats, la conclusion est la suivante : la portée A convient pour les laboratoires qui mettent en œuvre cette pratique.

-Elle doit cependant être réservée à des cas strictement encadrés décrits dans les dispositions du laboratoire.

-La version 2018 du CA-SFM à paraître officialise ces pratiques (Ajout de l'annexe 7 Antibiogramme direct par dilution à partir de flacons d'hémocultures positifs).

A voir aussi cette publication très récente : Chandrasekaran S, Abbott A, Campeau S, Zimmer BL, Weinstein M, Thrupp L, Hejna J, Walker L, Ammann T, Kirn T, Patel R, Humphries RM.

Direct-from-Blood-Culture Disk Diffusion To Determine Antimicrobial Susceptibility of Gram-Negative Bacteria : Preliminary Report from the Clinical and Laboratory Standards Institute Methods Development and Standardization Working Group. J Clin Microbiol. 2018 Feb 22;56(3). pii: e01678-17.

7- Modalités d'application du chapitre 5.3.2 aux "réactifs complexes" en microbiologie - chapitre § 5.3.2.3 de la norme 15189 Brigitte LAMY

Chapitre 5.3.2 Réactifs et consommables - norme 15189 v2012

5.3.2.1 Généralités

Le laboratoire doit disposer d'une procédure documentée pour la réception, le stockage, les essais d'acceptation et la gestion des stocks des réactifs et consommables.

5.3.2.2 Réactifs et consommables — Réception et stockage

Si le laboratoire n'est pas le laboratoire destinataire, il doit vérifier que le lieu de destination dispose des capacités de stockage et de manutention adéquates pour conserver les matériels achetés de manière à éviter tout dommage ou toute détérioration.

Le laboratoire doit stocker tous les réactifs et consommables reçus conformément aux spécifications du fabricant.

5.3.2.3 Réactifs et consommables — Essais d'acceptation

Chaque nouvelle formulation de trousse de réactifs prêts à l'emploi résultant de modifications de réactifs ou de procédure, un nouveau lot de fabrication ou une nouvelle expédition doit être vérifiée en termes de performance avant leur utilisation.

Les consommables qui peuvent affecter la qualité des examens doivent être vérifiés en termes de performance avant utilisation.

-En microbiologie, les essais d'acceptation des réactifs et consommables sont-ils utiles et qu'en est-il de leur faisabilité ?

L'antibiogramme :

-L'antibiogramme est un sous-processus critique.

-Il présente de spécificités remarquables :

- à un antibiogramme correspond un très grand nombre de références réactifs :
 - Diffusion: 16 à 32 ATB + 1 milieu par antibiogramme, entre 3 à 8 panels d'antibiogramme par LBM (jusqu'à > 50 références de disques par LBM)
 - antibiogramme liquide : 2 à 5 cartes
 - de nombreux laboratoires utilisent concomitamment les 2 méthodes précitées...
 - des méthodes complémentaires sont nécessaires [UMIC (1 à 3 références), E-tests (5 à 25 références cumulées)],
 - l'ensemble des références n'est pas synchronisé en termes de n° de lots
- une interprétation "globale" : résultats corrélés entre eux (entre molécules d'une même famille, entre résistances naturelles et espèces, entre résistances acquises car résistances croisées). Cette approche est puissante et permet la détection rapide d'erreurs (cohérence du profil de résistance).

-Les contraintes sont fortes :

- Les délais de péremption sont très courts (donc un très grand nombre de lots), pour les milieux de culture par exemple
- Certaines références présentent un délai de péremption plutôt long mais parfois les contraintes logistiques sont fortes (espace de stockage), pour les disques ou cartes (+4°C) ou E-tests (-20°C) par exemple (induisant un nombre élevé d'expéditions)

- Les délais de réalisation d'essai par CIQ longs (minimum 24h, jusqu'à 48h en intégrant l'étape de décongélation) et les CIQ sont « globalisés » par antibiogramme et non par antibiotique testé, rigidifiant les essais.

-Le système de CIQ est sub-optimal mais cependant fonctionnel :

- Il est impossible de transposer les systèmes de CIQ déployés dans les disciplines de chimie et assimilées, notamment en termes de fréquence,
- Pour autant, les CIQ Antibiogramme, en place depuis plusieurs années maintenant dans nos LBM, ne mettent pas en évidence de problème particulier de fiabilité à l'ouverture de lot ou à réception de l'expédition pour un lot donné, montrant des produits robustes au transport,
- Tous les lots de réactifs de l'antibiogramme sont évalués par CIQ, mais avec un petit retard par rapport à leur introduction en routine,

-La lecture globale de l'antibiogramme constitue un système unique, original et puissant de validation. Parce que réalisée systématiquement, c'est un système efficace pour détecter un problème de réactif.

-La libération des produits par les fabricants se fait après CQ (certificat de lots, fiche de stress). Ces fournisseurs sont certifiés (critère de choix des fournisseurs).

-Des essais d'acceptation : quelle utilité et quelle faisabilité pour l'antibiogramme?

1) **Un risque extrêmement faible** : L'état de l'art n'identifie pas de risque particulier, même faible, relatif à cette étape de transport/stockage : ni les résultats des CIQ antibiogramme, ni l'expérience des microbiologistes seniors, ne mettent en évidence de problème de fiabilité à l'ouverture de lot ou à réception de l'expédition pour un lot donné, montrant des produits robustes au transport. La fréquence du risque que l'on cherche à détecter par essai est donc extrêmement faible.

2) **Une faisabilité est très mauvaise** (pour ne pas dire impossible) : Les contraintes et spécificités précitées rendent l'approche d'essai par CIQ coûteuse, fastidieuse et d'autant plus lourde au regard de la fréquence du risque que l'on cherche à détecter. Une approche par échantillonnage limitée à quelques antibiotiques sentinelles qui permettrait *a priori* la mise en œuvre d'essai moins fastidieux reste néanmoins difficile de mise en œuvre. Ce type d'essai aboutirait donc à une sur-qualité et doit être réservé à des situations particulières argumentées.

Ainsi, dans la grande majorité des LBM, la mise en œuvre d'essai d'acceptation par CIQ pour l'antibiogramme n'est ni utile, ni faisable, ni pertinente.

En cas de risque particulier identifié en lien avec une organisation ou un événement particulier (ex : délai de transport exceptionnellement long pas exemple), la mise en œuvre d'un essai, éventuellement limité à certains antibiotiques (échantillonnage) est proposé. Dans ce cas, on privilégiera des antibiotiques d'utilisation courante, et présentant soit une fragilité particulière en raison d'un système complexe (combinaison de 2 molécules), ou une fragilité connue avec conséquence particulière dans le processus analytique. Ces réactifs sont considérés comme étant des réactifs sentinelles.

Molécules proposées : Amoxicilline + Acide Clavulanique et/ou ticarcilline + acide Clavulanique et/ou Imipénème et/ou Ertapénème. L'addition de la céfoxitine à cette liste peut se discuter (caractère critique pour Staphylocoques, entérobactéries avec BLSE). Tous ces antibiotiques sont présents dans tout laboratoire.

L'approche proposée est cohérente aux exigences de la norme dans le sens où une stratégie est définie par le laboratoire. En cas de détection d'un événement non conforme potentiellement lié à un nouveau lot ou une nouvelle expédition, il convient de réaliser l'analyse conformément aux processus de traitement des non-conformités en vigueur au laboratoire.

Positions consensuelles pour les essais d'acceptation des réactifs utilisés pour réaliser l'antibiogramme :

L'approche par « essai d'acceptation » constitue, au regard de i) la fréquence du risque recherché (hors cas particulier argumenté), et ii) l'existence d'alternatives efficaces, une approche couteuse, sans plus-value réelle d'AQ, relevant plus de sur-qualité. D'autres systèmes de détections alternatifs existent et sont à privilégier notamment l'approche pragmatique, validée par l'état de l'art.

Les alternatives sont efficaces (détectent l'événement indésirable en cas de survenue), sont éprouvées par l'expérience et l'état de l'art, n'engendrent pas de surcoût ni d'effet pervers. Il s'agit néanmoins d'approches sub-optimales puisque leur mise en œuvre intervient au moment ou peu après l'utilisation en routine des réactifs. L'approche proposée ne répond pas *stricto sensu* aux exigences de la norme mais elle apparaît légitime au regard de la fréquence du risque recherché (très faible), des difficultés de faisabilité (très élevées) et de l'argumentation ci-dessous développée.

Le laboratoire doit :

- 1-S'appuyer sur les certificats de lots et le SMQ mis en place chez le fournisseur
- 2-conduire une analyse de risques (ex : délais d'attente et modalités de stockage (température) avant stockage dans le lieu définitif) en lien avec les fiches de stress des réactifs,
- 3-disposer d'une procédure documentée pour la réception, le stockage, les essais d'acceptation (stratégie) et la gestion des stocks des réactifs et consommables,
- 4-vérifier l'intégrité des produits à réception,
- 5-s'assurer par la lecture « globale de l'antibiogramme » (quotidienne) de l'absence d'incohérence dans les résultats, et disposer d'une procédure en cas d'incohérence potentiellement liée à la qualité du réactif (l'efficacité de ce point 5 dépend directement des connaissances et du niveau d'expérience du lecteur d'antibiogramme, ce qui renvoie directement à l'habilitation et au maintien des compétences du lecteur et de manière générale à la sensibilisation des opérateurs),
- 6-s'assurer au moyen des CIQ antibiogramme (souches de contrôle recommandées par le CA-SFM/EUCAST) de la conformité des réactifs.

Il est conseillé de procéder pour les E-tests selon la même approche (problématique similaire).
Antibiotique sentinelle proposé en cas de besoin : amoxicilline ou amoxicilline + acide clavulanique.

Les milieux de culture commerciaux :

NB : sont exclus les milieux fabriqués au laboratoire

-Les milieux de culture sont des systèmes de formulation complexe permettant en général la croissance d'un grand nombre d'espèces bactériennes. Les délais de péremption des milieux de culture sont classiquement très courts (par exemple < 2 mois). La complexité des produits autant que de la diversité des bactéries et la variabilité intra-espèce pour chaque taxon rend l'évaluation par l'utilisateur globalement très difficile, pour ne pas dire illusoire : il ne s'agit au mieux que d'essais grossiers dont un résultat satisfaisant ne garantit en rien la qualité standard du produit.

Par ailleurs, la qualité des milieux est garantie par les fournisseurs au moyen d'un certificat de lot et de fiches de stress.

-Leurs utilisations sont variées, sous-tendues par des objectifs variés et des risques variés :

- Isolement de bactéries contenues dans un produit pathologique au moyen de milieux génériques (gélose au sang par exemple), sélectifs (milieux Drigalski, ANC par exemple) ou riche (bouillon Schaedler, Bouillon cœur-cerveille, gélose chocolat, bouillon pour flacon d'hémoculture par exemple),
- Recherche de bactéries particulières au milieu d'une flore (milieux sélectifs, incluant un antibiotique, par exemple milieux VCAT),
- Simple ré-isolément d'un isolat (obtention d'une culture pure, ou contrôle de pureté d'une suspension bactérienne pour antibiogramme par exemple),
- Réalisation d'antibiogrammes par la technique en diffusion gélosé
- Croissance associée à une identification rapide (milieux chromogènes) avec ou sans propriétés sélectives (par exemple milieux pour recherche de VRE et milieux pour ECBU, respectivement)

-Un système de cohérence quotidien existe *de facto* :

- L'utilisation permanente, à haute fréquence par de multiples opérateurs permet de détecter rapidement (pluri-quotidiennement) un milieu défectueux,
- L'écologie bactérienne, en cas de prévalence élevée, constitue une aide renforcée au contrôle de cohérence. Par exemple, la fréquence élevée d'*E. coli* dans les urines (70 à 90%) comme d'*Enterococcus sp* permet un contrôle de cohérence rapide et efficace des milieux (chromogènes et non chromogènes)

-Le système de CIQ est sub-optimal mais fonctionnel :

- le repiquage des souches de CIQ pour antibiogramme passe par une étape d'isolement sur milieu de culture, vérifiant les capacités culturelles *a minima* de ces milieux
- les milieux de cultures sont néanmoins évalués avec un petit retard par rapport à leur introduction en routine.

Des essais d'acceptation : quelle utilité et quelle faisabilité pour les milieux de culture?

Là encore, la faisabilité de mise en œuvre est très mauvaise : fréquence des essais très élevée au regard des délais de péremption, du nombre de références, du coût élevé, de la durée élevée des essais (24h), de l'efficacité illusoire. Pour les milieux de culture commerciaux, l'état de l'art relève ici encore des produits globalement robustes au transport de sorte que la fréquence de produits défectueux uniquement lié à un effet transport / stockage est extrêmement faible.

La mise en œuvre d'essais peut également exposer à des effets pervers. Par exemple, la mise en œuvre régulière d'essais pour les milieux de détection VRE avec CIQ d'*E. faecium* résistant à la vancomycine expose à un risque réel de contamination de l'environnement avec les conséquences négatives associées.

Positions consensuelles pour les essais d'acceptation des milieux de culture commerciaux

Une approche pragmatique fonction de l'analyse de risque et validée par l'état de l'art est légitime au regard de la fréquence du risque recherché (très faible), des difficultés de faisabilité (très élevées), et surtout de l'inefficacité des essais pouvant être mis en œuvre au laboratoire (fausse sécurité). On distinguera 3 cas, en fonction de l'objectif recherché et de l'utilisation faite, les milieux pouvant être considérés comme critiques ou non.

Remarque : plus que la vérification des performances à réception d'une expédition, l'effort doit surtout être fourni par le laboratoire en ce qui concerne :

-Le choix du fournisseur des produits (cahier des charges, appels offres)

-La vérification de l'intégrité des milieux à réception (absence de colonies sur ou dans la gélose, couleur habituelle, uniformité du milieu (couleur homogène), épaisseur, absence de milieux au sang laqué pour les géloses au sang, etc.)

NB : En cas de défaut de stérilité d'un lot, compte tenu des conditions de conservation (+4°C), la non-conformité peut ne pas être mise en évidence à la réception et une vigilance permanente est conseillée.

1-Un résultat est rendu au patient/prescripteur après avoir mis en œuvre des méthodes complémentaires

-Ces milieux sont considérés comme non critiques et ne justifient pas d'essais particuliers.

-Les flacons d'hémocultures, comme tout autre milieu de culture non chromogène entrent dans cette catégorie

2-Un résultat est rendu au patient/prescripteur à partir du milieu sans aucune autre méthode associée

-Cette catégorie concerne quasi exclusivement les milieux chromogènes

-L'approche doit être construite sur une analyse de risque intégrant certificats de lots et fiche de stress : En cas de prévalence élevée permettant un contrôle de cohérence à la première utilisation, privilégier cette approche 'par cohérence' (exemple : milieu chromogène ECBU et *E. coli* / Entérocoque). Dans le cas contraire (prévalence faible), on se reposera sur une analyse de risque pour définir la stratégie adéquate.

Exemple : milieux détection ESBL

1-risque de détérioration de l'antibiotique : problème détecté à 100% en temps réel (croissance de bactéries sensibles et non résistantes) si le laboratoire met en œuvre un antibiogramme pour caractériser le mécanisme de résistance (cas habituel), sinon la mise en place d'un essai d'acceptation doit être discutée.

2-risque de détérioration du chromogène permettant l'identification : l'approche retenue dépendra si l'identification est rendue uniquement à partir du milieu ou après l'utilisation d'une méthode complémentaire (ex : Maldi-Tof). Dans le premier cas un essai est souhaitable en utilisant une souche de CIQ adaptée (entérobactérie C3G R pour un milieu BLSE), dans le second cas, une souche de *E.coli* ou *E. coli* + entérocoque suffit.

Le même type d'approche peut être utilisé pour les autres milieux chromogènes. A noter une prudence particulière pour les milieux VRE (pas d'essai compte tenu du risque de contamination).

3-Un milieu chromogène est utilisé uniquement comme aide à la lecture des cultures (aucun résultat n'est rendu au patient/prescripteur sans utiliser une autre méthode)

Exemple : utilisation d'un milieu chromogène pour ECBU pour lequel toutes les identifications bactériennes sont systématiquement réalisées par spectrométrie de masse MALDI-ToF et non d'après le milieu chromogène. Ce cas de figure suit le cas n°1. Le milieu alors est considéré comme non critique et ne justifie pas d'essai particulier.

Le laboratoire doit :

- 1-S'appuyer sur les certificats de lots,
- 2-conduire une analyse de risques (ex : délais d'attente et modalités de stockage (température) avant stockage dans le lieu définitif) en lien avec les fiches de stress des réactifs,
- 3-disposer d'une procédure documentée pour la réception, le stockage, les essais d'acceptation et la gestion des stocks des réactifs et consommables,
- 4-vérifier l'intégrité des produits à réception,
- 5-conduire une analyse de risque tenant compte de ses pratiques (identification rendue avec ou sans méthode complémentaire), du type de milieux utilisés et de la finalité d'utilisation, de l'écologie bactérienne, etc. aboutissant ou non à une stratégie d'essai.
- 6-s'appuyer sur les CIQ antibiogramme (ou autres) pour documenter la conformité des milieux de culture.

Les réactifs pour PCR :

Contexte :

- Des réactifs onéreux
- Des réactifs très bien encadrés par des CQ multiples (témoins d'extraction, témoins, d'amplification, témoin négatifs, témoins positifs), permettant de détecter un problème lié à l'expédition/lot,
- Des tests réalisés pour la plupart dans un contexte non urgent (permettant de refaire l'analyse en cas de détection de problème, de la différer ou de la sous-traiter).
- Une variabilité inter-lots connue et pouvant impacter les résultats d'analyse avec quantification (PCR en temps réel)

Positions consensuelles pour les essais d'acceptation des réactifs PCR

Deux cas de figure à considérer :

Réactifs pour PCR en point final

- Pas d'essai à réception d'une nouvelle expédition, les témoins associés à la série validant le réactif à la première utilisation
- Pas d'essai au changement de lot avant mise en production, les témoins associés à la série validant le réactif à la première utilisation.

Réactifs pour PCR en temps réel

- Pas d'essai à réception d'une nouvelle expédition, les témoins associés à la série validant le réactif à la première utilisation
- Essai au changement de lot avec chevauchement du lot en cours pour apprécier l'effet lot (quantité des amorces)

Remarque : La problématique des essais d'acceptation des réactifs et consommables en microbiologie fera probablement l'objet d'un nouveau chapitre du QUAMIC à paraître fin 2018.

7- Niveaux de stérilité requis pour les dispositifs de prélèvement Patrice LAUDAT

-Un laboratoire doit-il définir ses exigences vis-à-vis de ses fournisseurs afin de mettre à disposition des services de soins du matériel adapté quant à leur niveau de stérilité ?

-Le niveau de stérilité requis va dépendre de la nature du prélèvement à traiter :
Trois niveaux de stérilité pour les dispositifs de prélèvement sont définis : Niveaux Sanitaires ou Niveaux d'Assurance Sanitaire de Stérilité (SAL).
Le niveau sanitaire est contrôlé selon la norme ARMI/ANSI/ISO 11 137.

Stérile R-SAL –10⁻⁶ : stérilité obtenue grâce à l'utilisation de rayonnements ionisants :

Niveau sanitaire atteint $\geq 10^{-6}$

Stérile R-SAL –10⁻³ Stérilité obtenue grâce à l'utilisation de rayonnements ionisants :

Niveau sanitaire atteint de 10^{-3} à $< 10^{-6}$

Aseptique : Produit fabriqué dans un environnement contrôlé. Procédé de fabrication entièrement automatisé. Veuillez noter que les produits, du moule au conditionnement, n'ont pas de niveau d'Assurance Sanitaire de Stérilité (SAL)

Autres ou absence : Aucune garantie sur la qualité du produit en matière de SAL.

| Nature du prélèvement | Présence d'une flore commensale | Seuil de significativité | Niveau de stérilité préconisé |
|--|---------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| Catégorie 1 prélèvements au niveau de sites « normalement stériles » : hémocultures, LCR, liquides des séreuses, biopsies | Non | Non | R-SAL 10 ⁻⁶ |
| Catégorie 2 autres prélèvements : urines, prélèvements respiratoires | Oui | Oui | R-SAL 10 ⁻³ |
| Catégorie 3 prélèvements fortement colonisés : peau, téguments, muqueuses... | Oui | Non | R-SAL 10 ⁻³ |
| Catégorie 4 selles | Oui | Non | R-SAL 10 ⁻³ ou aseptique |

Remarques :

-L'acide borique (B(OH)₃), est un agent bactériostatique permettant la conservation des urines suite à leur prélèvement chez le patient. Il existe en fonction des fournisseurs des dispositifs de niveaux SAL différents (Ne pas oublier de demander la fiche de sécurité - l'acide borique est un CMR Classe 3).

-Pour d'autres consommables (œse) la même réflexion sur le niveau de stérilité reste valable.

-En fonction de l'analyse de risque du laboratoire, il est facile de déterminer les exigences vis-à-vis des fournisseurs et de mettre ainsi à disposition des services de soin du matériel adapté.

Position consensuelle relative aux niveaux de stérilité requis pour les dispositifs de prélèvement

-Le laboratoire doit rédiger un cahier des charges vis-à-vis des fournisseurs critiques dans le domaine et par conséquent définir ses besoins afin de mettre à disposition des services de soins du matériel adapté (niveau de stérilité, flacons sous simple ou double emballage (Bloc opératoire), fermetures avec sécurité d'inviolabilité...)

9- Stratégie des CIQ en bactériologie Mouloud HAMMAD

Chapitre 5.6 Garantie de qualité des résultats - norme 15189 v2012

Les processus pré-analytiques et post-analytiques appropriés doivent être mis en œuvre.

5.6.1 Généralités

Le laboratoire doit garantir la qualité des examens en les réalisant dans des conditions définies...

5.6.2 Contrôle qualité

5.6.2.1 Généralités

Le laboratoire doit concevoir des procédures de contrôle de qualité permettant de vérifier que la qualité prévue des résultats est bien obtenue.

5.6.2.2 Matériaux de contrôle qualité

Le laboratoire doit utiliser les matériaux de contrôle qualité qui se comportent par rapport au système d'analyse de manière à être le plus fidèle possible aux échantillons des patients.

Les matériaux de contrôle qualité doivent être régulièrement inspectés en fonction de la stabilité de la procédure et du risque de nuisance sur le patient en raison d'un résultat erroné.

5.6.2.3 Données du contrôle qualité

Le laboratoire doit disposer d'une procédure visant à éviter de libérer les résultats des patients en cas de défaillance du contrôle qualité.

En cas de non-respect des règles de contrôle qualité, et si les résultats d'analyse sont susceptibles de contenir des erreurs cliniques significatives, les résultats doivent être rejetés, et les échantillons des patients concernés doivent être de nouveau analysés après avoir corrigé l'erreur et vérifié la conformité de la performance avec les spécifications.

Le laboratoire doit également évaluer les résultats des échantillons de patients qui ont été analysés après le dernier contrôle qualité réussi.

Les données de contrôle qualité doivent être revues régulièrement pour détecter les tendances de réalisation d'analyses qui peuvent indiquer des problèmes dans le système d'analyse. Si de telles tendances sont observées, des actions préventives doivent être prises et enregistrées.

-Le LBM doit mettre en place une stratégie de la maîtrise de la qualité en bactériologie. Cette approche repose sur 3 éléments majeurs :

1- Une évaluation du risque de chaque processus analytique (maîtrise de pré et post analytique). Il peut être calculé via la **Criticité** :

Fréquence F : gestion par les non conformités

Gravité G : impact clinique

DéTECTABILITÉ D : moyens mis en œuvre pour pallier aux dérives

Le laboratoire doit définir son seuil d'acceptabilité (exemple : criticité < 7)

2- L'utilisation de contrôles indépendants du fournisseur : matrice humaine, souche (ATCC, souchothèque)

3- Un rythme de passage des contrôles adapté à la spécificité du processus analytique

- Fonction de la robustesse analytique

- Fonction des maintenances préventive ou curative

- Fonction de rapidité d'exécution

- Fonction des coûts analytiques

- Fonction du volume d'activité

-Fonction de l'épidémiologie locale et de la nature des bactéries sur lesquelles seront réalisés ces antibiogrammes :

- nombre d'ATB pour les espèces à croissance rapide (Staphylocoques, Entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*, Streptocoques/Entérocoques)
- nombre d'ATB pour les espèces significatives cliniquement (Gonocoque, Méningocoque, Pneumocoque, *Campylobacter spp*, Anaérobies)
- cas des espèces rares ou exceptionnelles : à ignorer ?

-Des exemples pour illustrer cette approche ont été présentés dans le diaporama de Mr le Dr Mouloud HAMMAD.

Positions consensuelles relative à la stratégie des CIQ en bactériologie

- La notion de CIQ de processus est essentielle en bactériologie
- Le laboratoire doit faire une analyse de risque avec une évaluation de la criticité adaptée à la spécificité du laboratoire sur tous les processus et écrire ses dispositions relatives à cette stratégie.
- Le laboratoire doit choisir des contrôles selon les recommandations des sociétés savantes et selon la spécificité épidémiologique du laboratoire.
- Le laboratoire doit adapter le nombre et le rythme des contrôles pour ne pas alourdir le fonctionnement du laboratoire avec les risques suivants :
 - retard de rendu de résultat
 - démobilisation du personnel devant une lourdeur de contrôles inutiles et inadaptés
- Le laboratoire doit réévaluer de façon régulière sa stratégie

Pour en savoir plus :

- Védry S : Contrôle de qualité interne en antibiologie : retour d'expérience. Ann Biol Clin, 2012, 70, 341-52

10-Stratégie des EEQ en bactériologie Jean-Louis GALINIER

Illustration de la problématique par une fiche d'écart refusé par le LBM

Constat : Le LBM n'a pas d'EEQ spécifique en Bactériologie pour les hémocultures.

Risque induit : Dérive des pratiques en l'absence de confrontation inter-laboratoires spécifique

Cette fiche d'écart a été annulée par la CAC du COFRAC, la stratégie présentée par le LBM a été jugée pertinente:

-Le laboratoire dispose d'un mode opérateur (Contrôles de qualité en microbiologie)

-Le LBM utilise des contrôles sous forme de souches ATCC à une fréquence hebdomadaire pour tester son processus dans sa globalité mais non spécifiquement pour les hémocultures.

-A la lecture du Dossier de Vérification des Méthodes, le laboratoire a précisé les indicateurs déployés conformément aux recommandations et aux règles de l'art.

-En matière d'EEQ, le laboratoire est abonné au CTCB, les résultats 2015/2016 observés lors de l'évaluation sont tous conformes.

-Recommandations pour le choix de ses EEQ :

1- Ils doivent être adaptés aux niveaux et sous disciplines (zone de compétence) identifiés dans le laboratoire : **approche technique**

-Par matrice (Urines, sécrétions broncho-pulmonaires, sang, sécrétions génitales, etc.) : AGLAE, C.A.P, CTCB, UKNEQUAS,

-Par technique (Microscopie, test immunologique, biologie moléculaire) : CTCB, One World Accuracy, QCMD

-Par équipement : Contrôles dédiés, par exemple pour la cytologie : Cytométrie de flux ou microscopie optique CAP, CTCB, EUROCELL

-Par type de germe (Mycobactéries, mycoplasmes, anaérobies, etc.) : ABP, CAP, CTCB.

2- Ils doivent être adaptés aux niveaux et sous disciplines (zone de compétence) identifiés dans le laboratoire : **approche par (sous) processus**

-Par processus : « culture, isolement, identification, antibiogramme ». Il s'agit d'une approche globale où les contrôles sont soumis aux différentes techniques mises en œuvre au laboratoire : ABP, CTCB...

-Par sous-processus : Ensemencement - isolement, Dénombrement - lecture de gram, identification-antibiogramme, effectués dans les différents sites : Digital PT

3-Un choix issu de **l'analyse de risque** : l'EEQ doit porter sur le(s) point(s) critique(s) identifié(s).

| Examen | Points critiques identifiés | Type de contrôle à privilégier |
|---|--|---|
| Broncho pulmonaire | Examen direct quantification | Lame physique ou virtuelle épreuve de numération |
| Coproculture | Condition d'incubation Identification | Culture |
| E.C.B.U | Quantification colonie Quantification leucocytes erythrocyte | évaluation de numération en CFU Évaluation cytologie |
| Génitiaux | Examen direct ,Condition d'incubation | Lame physique ou virtuelle culture |
| Hémoculture | Volume délai d'insertion | Enquête pré analytique |
| LCR | Examen direct Condition d'incubation | Lame physique ou virtuelle culture |
| ORL | Examen direct Identification | Lame physique ou virtuelle culture |
| Antibiogramme | condition et durée d'incubation lecture (diamètre et aspect) Interprétation | Culture -antibiogramme avec question post analytique |
| Biologie Moléculaire | Extraction Contamination | Essai à partir de souche ou produit pathologique |
| Dans tous les cas à associer à un contrôle "généraliste" sur souche. | | |

Quelles questions se poser pour évaluer la mise en place des EEQ :

- 1- Y a-t-il un programme et une procédure (politique) d'EEQ ?
- 2- Comment sont choisis et évalués les fournisseurs d'EEQ ?
- 3- Les échantillons ont-ils été intégrés aux processus pré-analytique (réception, enregistrement ...)?
- 4- Y a-t-il des dispositions pour s'assurer que les échantillons d'EEQ sont traités de manière identique aux échantillons cliniques de routine ?
- 5- Les échantillons ont-ils été intégrés aux processus post-analytique : le compte rendu d'EEQ a-t-il été traité comme un compte rendu patient : interprétation, validation édition ?
- 6- Les résultats des échantillons d'EEQ sont-ils évalués et, le cas échéant, analysés et communiqués aux « équipes »?
- 7- Le processus EEQ est-il examiné lors des audits internes ?
- 8- Les résultats d'EEQ sont-ils examinés en revue de direction?

En termes de cohérence / gestion des compétences et de processus le plus souvent complexes.

- 9- Les tâches effectuées pour l'EEQ correspondent-elles aux compétences définies des opérateurs ?
- 10- Si le processus de maintien d'habilitation est en lien avec les EEQ ceux-ci sont-ils correctement dimensionnés et exploités ?

Quelle fréquence d'EEQ adopter?

- Recommandations des organismes d'accréditation (SH GTA 06, trimestrielle)
- Recommandation de European Accreditation (EA), qui harmonise les différents organismes d'accréditation européens : La participation aux EEQ précède l'obtention de l'accréditation au minimum sur une base annuelle. Le Document EA-4/18 INF : 2010 envisage une « stratégie » pluri-annuelle couvrant sur le cycle d'accréditation (4 à 5 ans) l'ensemble des niveaux (sous disciplines) définis par le laboratoire.
- L'enquête des organismes d'Accréditation Asie Pacifique sur les EEQ a montré une fréquence en biologie Médicale pour chaque champ (de compétence) de l'ordre de 10 par an (mais cela inclut la biochimie)
- Exigence réglementaire (ordonnance de 2010, arrêté en attente)
- Indication des sociétés savantes (SFM - QUAMIC : programme pluri-annuel)
- Recommandations des Organisations telles que CDC CLIA : minimum de cinq échantillons par envoi et au moins trois envois par an (par programme)
- Pour EQALM (Organisation Européenne des Fournisseurs d'Évaluation Externe de Qualité en biologie médicale), il n'existe pas de preuve qu'augmenter la fréquence améliore les performances des laboratoires.
- Recommandations fournisseurs
- Besoin interne : équipement, méthode et personnel en fonction de leur stabilité ou d'une période de changement.

La stratégie des EEQ reflète l'organisation du laboratoire en termes de technique et de compétence

Quels sont les paramètres qui peuvent être intégrés dans la stratégie des EEQ au sein du LBM ?

- Utilisation régulière de souches de référence (ATCC, CIP)
- Comparaison régulière des différentes techniques au sein du laboratoire (identification biochimique, spectrométrie de masse, biologie moléculaire etc.)
- Envoi de souches aux différents CNRs et analyses
- Participation à des comparaisons, évaluation de nouvelles techniques
- CIQ mis en place : suivi des lots, identification de souches en aveugle

Quels sont les autres paramètres nécessaires à l'élaboration de la stratégie des EEQ en bactériologie ?

- Nombre de tests effectués (antibiogrammes/ CMI)
- Nombre de personnels habilités
- Compétence du personnel (qualification, expérience)
- Type de méthode (industrielle adoptée, adaptée ou « maison »)
- Impact sur les décisions médicales (recherche d'hématozoaires sanguins versus sérologie mycoplasmes génitaux)

Des contraintes réglementaires existent :

- Décret n° 2016-46 du 26 janvier 2016 relatif à la biologie médicale : « Art. D. 6221-20. – I. – Les laboratoires de biologie médicale soumettent à une évaluation externe de qualité chaque système analytique qu'ils utilisent. »

D'autres paramètres sont à prendre en compte dans la mise en place de la stratégie du LBM : gestion des risques, continuité de service, permanence des soins, comparabilité des résultats des équipements.

Positions consensuelles relative à la stratégie des EEQ en bactériologie

-Le laboratoire doit présenter une véritable stratégie concernant les EEQ en bactériologie qui doit faire l'objet de dispositions spécifiques.

-Le laboratoire doit mettre en place un EEQ spécifique dans le cas d'examens hors processus complexe. Une compétence spécifique et dédiée est nécessaire. Exemple : recherche d'antigène *Legionella pneumophila* ou de recherche de toxines de *Clostridium difficile*.

-Le laboratoire n'a pas obligation d'avoir un EEQ propre à chaque examen si ces examens font appel à plusieurs sous-processus maîtrisés à l'intérieur d'un processus complexe bénéficiant d'un EEQ (et s'il n'utilise pas d'équipement spécifique) .

11- Un CNR doit-il être évalué comme un sous-traitant ? Gérard LINA

Avec la participation de Bruno Coignard (Santé Publique France) et Anne-Marie Gallot (DGS)

Chapitre 4.5 Examens transmis à des laboratoires sous-traitants – norme 15189 v2012

4.5.1 Sélection et évaluation de laboratoires sous-traitants et consultants

Le laboratoire doit disposer d'une procédure documentée pour sélectionner et évaluer les laboratoires sous-traitants et consultants sollicités pour fournir une interprétation des examens complexes dans n'importe quelle discipline.

La procédure doit garantir ce qui suit:

- a) le laboratoire, en partenariat avec, le cas échéant, les utilisateurs des prestations de laboratoire, est chargé de la sélection du laboratoire sous-traitant et des consultants, de la surveillance de la qualité des laboratoires, et de s'assurer que les laboratoires sous-traitants ou les consultants sont en mesure de réaliser les examens requis;
- b) les accords avec les laboratoires sous-traitants et consultants sont revus et évalués périodiquement pour garantir le respect des parties correspondantes de la présente Norme internationale;
- c) les enregistrements de ces revues périodiques sont mis à jour;
- d) un registre de tous les laboratoires sous-traitants et consultants sollicités pour un avis est mis à jour;
- e) les demandes et résultats de tous les échantillons sous-traités sont conservés pendant une période préalablement définie.

4.5.2 Compte rendu des résultats d'examens

Sauf indication contraire mentionnée dans le contrat, le laboratoire demandeur (et non le laboratoire sous-traitant) doit être chargé de s'assurer que les résultats des examens transmis par le laboratoire sous-traitant sont bien communiqués au prescripteur.

Si c'est le laboratoire demandeur qui prépare le compte rendu, celui-ci doit comporter tous les éléments essentiels des résultats transmis par le laboratoire sous-traitant ou le consultant, sans modification susceptible d'affecter l'interprétation clinique. Le compte rendu doit indiquer quels sont les examens réalisés par un laboratoire sous-traitant ou un consultant.

L'auteur de remarques supplémentaires doit être clairement identifié.

Les laboratoires doivent adopter les moyens les plus appropriés d'établir le compte rendu des résultats du laboratoire sous-traitant, en tenant compte du délai d'obtention, de l'exactitude de mesure, des processus de transcription et des exigences relatives aux capacités d'interprétation. Si l'interprétation des résultats et leur utilisation nécessitent une collaboration entre les cliniciens et les spécialistes des laboratoires demandeurs et sous-traitants, ce processus ne doit pas être entravé par des considérations commerciales ou financières.

Les centres nationaux de référence (CNR) ont pour mission :

- 1) **l'expertise** concernant la microbiologie et la pathologie des agents infectieux, le développement, l'optimisation, la validation et la diffusion d'examens de biologie médicale ; l'identification et la confirmation des agents pathogènes, en particulier ceux pour lesquels il n'existe pas de dispositif médical de diagnostic *in vitro* répondant aux conditions fixées par les articles L. 5221-2 ou L. 5221-5 du code de la santé publique ;
- 2) **le conseil** scientifique ou technique en réponse à toute demande du ministre chargé de la santé, Santé publique France et des professionnels de santé ;
- 3) la contribution à la **surveillance épidémiologique** :
 - par l'animation d'un réseau de laboratoires auxquels peuvent être confiés la réalisation d'examens et qui en transmettent ensuite les résultats,
 - par la réalisation des analyses nécessaires à la surveillance des agents pathogènes ;

4) **l'alerte** immédiate de Santé publique France, du ministère chargé de la santé et, le cas échéant, de l'agence régionale de la santé de toute constatation de nature à présenter un risque ou une menace sur l'état de santé de la population.

Les structures qui ne remplissent que les missions mentionnées aux 1° et 2° du I sont désignées " Centre national de référence Laboratoire expert " conformément au cahier des charges général mentionné à l'article D. 1413-47.

-Les missions propres à chaque CNR sont détaillées dans un **cahier des charges spécifiques** (format pdf) conforme à un cahier des charges type défini par l'arrêté du 16 juin 2016. Pour assurer certaines de ses missions, un CNR peut s'appuyer sur un ou plusieurs laboratoires dits «laboratoires associés». Dans ce cas, le responsable du CNR est chargé de la coordination de l'ensemble des activités des laboratoires associés et rend à l'agence Santé Publique France (qui réunit maintenant l'InVS, l'Inpes et l'Eprus) un rapport annuel faisant la synthèse des activités réalisées par les différents laboratoires.

-Selon l'article L.6212-1 du CSP : « Les CNR sont des laboratoires de biologie médicale s'ils réalisent des examens de biologie médicale pour des patients »

-Le CNR est un laboratoire de biologie médicale de référence c'est-à-dire un LBM de haut niveau de compétence pour son activité de référence et donc un LBM de recours pour les autres LBM pour cette activité.

-Le terme « sous-traitant » n'est pas un terme utilisé par le code de la santé publique, c'est un terme ayant un sens international utilisé par la norme.

Positions consensuelles relative à l'évaluation des CNRs comme sous-traitants

On distingue :

-les CNRs qui ne réalisent pas de diagnostic médical et ne produisent pas de comptes rendus médicaux à annexer au dossier patient (Exemple : CNR Salmonelles, CNR Méningocoque...). Dans ce cas, le CNR peut ne pas être considéré comme un LBM sous-traitant.

-les CNRs qui contribuent au diagnostic médical et qui fonctionnent comme les laboratoires spécialisés : compte-rendu annexé au dossier patient (Exemple : CNR Leptospirose, CNR Grippe...). Dans ce cas, il peut être considéré comme un LBM sous-traitant.

-Les résultats des CNRs peuvent être exploités comme des contrôles externes de la qualité (mais non comme des Evaluations Externes de la Qualité).

-Les CNRs produisent un compte-rendu d'activité accessible qu'il est utile de consulter. L'évaluation des CNRs ne peut être réalisée au sens normatif car le LBM ne peut sélectionner un CNR et des relations contractuelles ne sont pas mises en place avec les CNRs. A minima, le LBM peut émettre des appréciations sur le service rendu et communiquer ses remarques au CNR dans le cadre d'une démarche d'amélioration de la qualité.

12- Enceintes en atmosphère enrichie en CO2 et bactériologie : quid de la métrologie ? Jean-Pierre BOUILLoux

Illustration de la problématique par une fiche de clarification

Utilisées pour la culture des bactéries exigeantes en CO2, les enceintes du LBM ne sont pas équipées de sonde externe de mesure de ce gaz. Cependant, l'utilisation de deux CQI (souches NCTC 8468 *Haemophilus*, souche ATCC 40619 *Pneumocoque*) permet la vérification indirecte de l'atmosphère par l'obtention d'une culture positive de ces deux CQ. Cette vérification est réalisée au minimum 2 fois par mois.

La situation a été jugée acceptable par la CAC : elle correspond à une bonne pratique recommandée en microbiologie. Néanmoins, le LBM a été invité à réfléchir à une stratégie alternative (ex : utilisation d'autres souches comme CQ...)

-La métrologie des étuves à CO2 utilisées en bactériologie médicale de routine n'est actuellement pas abordée dans les référentiels de métrologie en lien avec les laboratoires de biologie médicale :

-Mise en œuvre de la métrologie dans les laboratoires de biologie médicale. Collège français de métrologie, Lexitis éditions, Paris, 2016.

-Guide de métrologie à l'usage des laboratoires d'analyses de biologie médicale. Collège français de métrologie – AFNOR éditions, Paris, 2017.

-Actuellement, les besoins en matière d'atmosphère en CO2 des étuves d'incubation utilisés pour des cultures microbiennes ne sont pas définis précisément : la concentration en CO2 pour obtenir une croissance optimale est fonction de l'espèce et même du biotype (jusqu'à 10% pour certains biotypes de *Brucella*).

Les recommandations actuelles concernent la réalisation des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé dans le but de standardiser l'examen : taux de 4% à 6% (*Streptococcus pneumoniae*, Streptocoques des groupes A, B, C ou G, Autres streptocoques, *Listeria monocytogenes*, *Haemophilus influenzae*, Corynébactéries...) comme indiqué dans le document CA-SFM/EUCAST 2018 pour la réalisation des antibiogrammes.

-Le laboratoire devra démontrer que les dispositions qu'il a prises sont en adéquation avec ses besoins.

-Le laboratoire devra aussi réaliser une analyse de risque relative au système utilisé (ex. : défaut d'approvisionnement ou bouteille vide la nuit ou le WE) et prévoir une solution de backup efficace.

Positions consensuelles sur la métrologie des enceintes en atmosphère enrichie en CO2

-En microbiologie, l'affichage d'une étuve, correctement calibrée et maintenue, fournit une indication satisfaisante pour la pratique médicale. Une vérification de l'atmosphère par l'utilisation de souches de contrôle strictement capnophiles (culture et antibiogramme) comme CQI permet de prouver la maîtrise de ce paramètre. D'autre part, les résultats obtenus quotidiennement au LBM permettent de mettre rapidement en évidence un système défectueux (analyse de tendance) : qualité de l'hémolyse, fréquence d'isolement de bactéries capnophiles selon écologie locale.

-Dans le cas des générateurs d'atmosphère (Système type Bact-R®) : les systèmes de contrôles internes, associés aux CQI, sont suffisants pour maîtriser le processus (alarmes défaut de vide, remplissage en gaz de la jarre...)

-Dans le cas d'utilisation des sachets générateurs d'atmosphère, il convient de suivre les recommandations du fournisseur (ex. nombre de boîtes par sachet) et associer les CQI adaptés.

-Enfin, pour la méthode dite « de la bougie », il appartient au laboratoire de démontrer que la teneur en CO₂ est conforme et permet l'obtention des résultats attendus (utilisation de souches de contrôle strictement capnophiles (culture et antibiogramme) comme CQI).

Une analyse de risque concernant la problématique critique de la gestion d'un back-up doit être réalisée par le laboratoire et des moyens de maîtrise mis en place.

Pour les autres types d'atmosphères utilisées en microbiologie : anaérobiose, micro-aérophile, le laboratoire mettra en place des dispositions qui lui permettront de maîtriser ces atmosphères (ex : indicateur papier pour l'anaérobiose, CQI...).

13- Prestation de conseil : gestion des référentiels et conseils en antibiothérapie Patrice LAUDAT et Gérard LINA

Votre veille informationnelle et réglementaire vous apporte de nouvelles données entre les versions des REMIC (tous les 3 ans environ). Comment choisir le niveau de preuve de celles-ci et décider de les intégrer dans vos procédures ? Idem en cas de publications scientifiques d'intérêt.

Voici des exemples :

HAS : Comment sécuriser le circuit d'un prélèvement réalisé au bloc opératoire, juin 2017

HAS : Évaluation des actes de diagnostic biologique des infections à Plasmodium, décembre 2016

ANSM : Contrôle du marché des tests de diagnostic rapide pour la détermination du statut immunitaire vis-à-vis du tétanos, octobre 2015

HAS : Prise en charge du nouveau-né à risque d'infection néonatale bactérienne précoce (≥ 34 SA), avril 2017

BMJ 2017 : Faster clean catch urine collection (Quick-Wee method) from infants : randomised controlled trial. J Kaufman et coll.

Conférence de consensus: Infections urinaires associées aux soins, décembre 2015

Positions consensuelles relative à la gestion des référentiels et conseils en antibiothérapie

Le laboratoire doit réaliser une analyse d'impact et mettre en place un plan d'action pour les publications d'intérêt type HAS ou autres.

La SFM envisage de mettre en place sur son site internet une signalétique accompagnant les publications et/ou recommandations d'intérêt qui seront prises en compte pour la mise à jour de la version du REMIC à paraître.

14- Adaptation de la technique Maldi-Tof : Portée A/Portée B ?

Agnès FERRONI

L'adaptation de la technique Maldi-Tof dans les laboratoires, par rapport aux préconisations du fournisseur, concerne principalement deux points :

1. Identification de colonies sur des géloses autres que COS (le fournisseur pour autant n'interdit pas d'autres géloses)
2. Durée d'incubation supérieure à celle préconisée par le fournisseur, le dimanche par exemple (48h maximum au lieu des 18-24h préconisées)

Ces pratiques restent dans le cadre d'une portée A malgré l'utilisation de milieux non testés par le fournisseur ou la réalisation d'identification sur des colonies issues de culture de plus de 18-24h :

- la littérature est abondante sur le sujet
- les identifications réalisées sont étayées par les différents tests présomptifs et/ou les observations visuelles
- les identifications réalisées sont étayées par les antibiogrammes/résistances naturelles des espèces (CA-SFM)
- L'expérience quotidienne de laboratoires ne met pas en défaut cette pratique.

Positions consensuelles

L'identification de colonies sur des géloses autres que COS et l'utilisation de colonies issues de culture de plus de 18-24h avec la technique Maldi-Tof est acceptable si le laboratoire a réalisé une analyse de risques basée sur des données bibliographiques et expérimentales.

-La bibliographie présentée dans un dossier de validation de méthode doit être accompagnée de commentaires reprenant les points essentiels des publications justifiant la démarche et/ou les choix du laboratoire.

-Le contenu des études internes réalisées devront s'appuyer sur des recommandations SFM (QUAMIC 2017- chapitre 10 p 83) ou reproduire les données expérimentales d'une publication de notoriété reconnue.

15- Gestion de la portée flexible en bactériologie Agnès FERRONI

Sujet 1 : Les lignes de portée, validant les compétences, sont-elles toujours adaptées aux examens de microbiologie ?

-D'après le SH INF 50, version en cours, 8 à 9 lignes de portée sont nécessaires pour valider l'analyse Examen Cytobactériologique des Urines (ECBU) :

- BA1 (examen microscopique, ensemencement...)
- BA3 (cytologie automate)
- BA5 (identification)
- BA6 (antibiogramme)
- voire BA2 (si ensemencement sur un site pré-post analytique)

L'isolement fréquent de levures avec éventuellement antifungigramme associé et exceptionnel de parasites type *Trichomonas vaginalis* nécessite aussi l'ouverture des lignes de portée PM1, PM5, PM6, PM7 de la famille « Parasitologie-Mycologie ».

Des dossiers de vérification/validation incluant de nombreux sous-processus correspondant aux lignes de portée concernées sont nécessaires et l'évaluation dans le cadre de l'extension de portée peut faire intervenir plusieurs évaluateurs ayant des domaines de compétences complémentaires.

Remarque : Il existe aujourd'hui une réflexion au travers d'un groupe de travail microbiologie au sein du Cofrac pour proposer des modifications des lignes de portée du SH INF 50 et répondre au mieux aux attentes des laboratoires. Les propositions suivantes viendront alimenter leur réflexion.

Proposition concernant l'examen microscopique dans le cadre de l'ECBU : BA1 (bactériologie) et PM1 et PM7 (mycologie/parasitologie)

-Proposition d'intégrer dans BA1 la recherche de levures et de parasites susceptibles d'être retrouvés dans les échantillons suivants :

- Prélèvements respiratoires: expectorations, LBA
- ECBU : recherche de levures en routine
- PV : recherche de levures et de trichomonas en routine
- Et tous les prélèvements pour lesquels une recherche de levures est systématiquement intégrée à la recherche de bactéries (ORL...)

-PM1 : proposition de créer une ligne de portée spécifique pour l'identification des champignons qui demande une compétence particulière comme par exemple l'identification des dermatophytes, champignons exotiques...

Proposition concernant les hémocultures : BA4 (bactériologie) et PM3 (mycologie/parasitologie)

-Proposition d'intégrer dans BA4 les hémocultures fongiques (ou créer une ligne de portée commune « hémoculture »):

- Il n'y a pas d'automate spécifique pour les levures.
- L'habilitation à la lecture du Gram est commune aux bactéries et aux levures.

-PM3 devrait être gardé uniquement pour les recherches fongiques spécifiques dans les liquides, en enlevant les hémocultures.

Proposition concernant la spectrométrie de masse : BA5 (bactériologie) et PM4 (mycologie/parasitologie)

-Technique identique (même compétence) : proposition d'intégrer dans BA5 la spectrométrie de masse « fongique » (ou créer une ligne de portée commune « spectrométrie de masse »)

Proposition concernant la biologie moléculaire (BM) : BA8 (bactériologie) et PM6 (mycologie/parasitologie)

-Technique identique: proposition d'intégrer dans BA8 la BM « fongique » (ou créer une ligne de portée commune)

Proposition concernant la recherche d'antigènes urinaires : IB3 (bactériologie, virologie, mycologie/parasitologie) et BA7 (bactériologie)

Les lignes de portée IB3 et BA7 se recoupent pour la recherche des antigènes bactériens.

La ligne de portée BA7 pourrait être réservée à la bactériologie et IB3 à la parasitologie/virologie.

Autre solution encore plus simple : supprimer la ligne de portée BA7 et tout regrouper (bactériologie, virologie, mycologie/parasitologie) dans la ligne IB3.

Sujet 2 : Gestion des ajouts d'examens coproculture, analyse cyto-bactériologique d'une expectoration... dans le cadre de la portée flexible

Il ressort de la réunion 4 types d'approches :

1-Le LBM présente un dossier de validation/vérification de méthode pour l'ensemble d'un processus complexe, ECBU par exemple, avec tous les sous-processus associés. Lors de l'ajout de nouveaux examens, le LBM crée de nouveaux dossiers de validation/vérification (coproculture, analyse cyto-bactériologique d'une expectoration...) indépendant du dossier principal (le principal étant par exemple l'ECBU), avec la même trame mais en faisant référence au dossier de VM ECBU ("cf dossier ECBU") si le contenu de certains items (dans l'analyse de risque ou les performances) est identique.

2-Le LBM peut aussi utiliser un seul dossier VM qui inclut tous les sous-processus. Il ajoute des items si besoin au niveau de la gestion de risques ou des performances, si nécessaire, relatifs au nouvel examen. Le dossier s'appellerait alors : ECBU, puis ECBU + coproculture, puis ECBU + coproculture + analyse cyto-bactériologique d'une expectoration...

3-Le LBM présente un dossier de validation/vérification des méthodes par ligne de portée pour l'ensemble des examens, exemple BA1 examen direct avec toutes les colorations et les matrices, il suffit ensuite de rassembler les « briques » pour accréditer toute la bactériologie.

4-Le LBM peut aussi faire un dossier SH FORM 43 par sous-processus (exemple l'ensemencement/incubation, l'examen microscopique, les colorations GRAM/MGG/ZIEHL, l'identification, l'antibiogramme...), les sous-processus ne correspondant pas systématiquement à des lignes de portée, en incluant les spécificités relatives à chaque examen (nouveaux risques identifiés).

Le laboratoire devra alors adapter ses dossiers de validation/vérification en conséquence (rappel : un dossier de validation/vérification des méthodes peut se présenter sous une autre forme que le SH FORM 43 qui n'est pas un document opposable).

Positions consensuelles

-La création d'une famille « microbiologie » incluant la bactériologie et la mycologie/parasitologie avec des lignes de portée rapportées à des compétences spécifiques se rapprocherait plus de l'exercice de la biologie médicale actuelle.

-Un dossier de validation/vérification des méthodes unique devrait ainsi être recevable pour les analyses liées à des processus complexes : ECBU, PV, ORL, hémoculture...