

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
PREMIÈRE PARTIE.....	4
I Historique de la Qualité	5
I.1. Le Taylorisme	5
I.2. Le Contrôle de Qualité.....	6
I.3. L'Assurance Qualité et la Qualité Totale.....	7
I.4. Le Management de la Qualité Totale	8
II Les enjeux de la qualité	10
II.1 Les enjeux économiques.....	10
II.2 Les enjeux technologiques.....	10
II.3 Les enjeux juridiques.....	11
II.4 Les enjeux sociaux.....	11
III Les principes du management de la qualité.....	12
III.1 Principe 1 – Orientation Client.....	12
III.2. Principe 2 – Leadership.....	13
III.3. Principe 3 – Implication du personnel.....	14
III.4. Principe 4 – Approche processus	14
III.5. Principe 5 – Management par approche système	15
III.6. Principe 6 – Amélioration continue.....	16
III.7. Principe 7 – Approche factuelle pour la prise de décision	18
III.8. Principe 8-Relations mutuellement bénéfiques avec les fournisseurs.....	18
IV Outils utilisés dans le management de la qualité.....	19
IV.1. Les 5S (48)	19
IV.2. AMDEC (Analyse des Modes de Défaillance de leurs Effets et de leur Criticité)	22
IV.3. Le Brainstorming ou Remue-méninges.....	24
IV.4. Le diagramme des 5M ou diagramme de causes et effets de ISHIKAWA	25
IV.5. Le diagramme de Pareto.....	26
IV.6. Le QQOQCCP	28
IV.7. Les 5 pourquoi.....	29

V	Les différentes étapes pour la mise en place de la qualité	32
V.1.	La méthodologie TOP-DOWN.....	32
V.2.	La méthodologie DOWN-TOP.....	32
V.3.	Mise en œuvre de l'approche processus	33
V.4.	Les familles des processus.....	34
V.4.1.	Processus opérationnels ou de réalisation ou orientés client	34
V.4.2.	Processus support ou de soutien	34
V.4.3.	Processus de pilotage ou de management ou de direction.....	35
V.5.	Le management d'un processus.....	35
V.6.	La cartographie des processus	35
VI	Analyse des prélèvements microbiologiques au laboratoire	38
VI.1.	La phase préanalytique.....	38
VI.1.1	La prescription	38
VI.1.2	Le prélèvement.....	39
VI.1.3	La conservation et transport	40
VI.1.4	Le rebut des prélèvements inappropriés	40
VI.2	La phase analytique.....	40
VI.2.1.	L'identification bactérienne	41
VI.2.2.	La sensibilité aux antibiotiques	42
VI.3	La phase post-analytique.....	42
VII	VALIDATION DES METHODES (105, 106).....	43
VII.1.	Vérification sur site d'une méthode de type qualitatif	44
VII.2.	Maîtrise de la qualité d'un examen de type qualitatif	44
DEUXIÈME PARTIE	45
Justification de l'étude.....	46	
Objectifs	46	
Cadre de l'étude.....	47	
METHODOLOGIE	49	
I	Exigences applicables	49
II.	Vérification des performances des méthodes automatisée	50
II.1.	BacT/ALERT	50
II.1.1.	Principe de la méthode.....	51
II.1.2.	Matériels	52
II.1.3.	Méthode	52

II.2. Cobas TaqManTM CT v2.0.....	53
II.2.1. Principe de la méthode.....	53
II.2.2. Matériels	54
II.2.3. Méthode	56
II.3. VITEK 2 Compact.....	58
II.3.1. Principe de la méthode.....	58
II.3.2. Matériel.....	58
II.3.3. Méthode	60
III. Vérification de la performance des méthodes d’identification par agglutination.....	61
III.1. Sérum anti-Salmonella (OMA et OMB)	62
III.2. Sérum anti- <i>Staphylococcus aureus</i> (PASTOREX™ STAPH-PLUS).....	62
IV. Evaluation des points critiques.....	63
IV.1. Maîtrise des 5M.....	63
IV.2. Etude de la criticité des réactifs et processus	65
RESULTATS	67
I. Recueil des exigences	68
I.1. Les exigences générales	68
I.2. Les exigences techniques	70
II. Vérification des performances des méthodes	76
II.1.BacT/ALERT™	76
II.2. COBASTaqMan™	77
II.2.1. Répétabilité	77
II.2.2. Vérification de la non contamination inter échantillon.....	77
II.2.3. Reproductibilité	78
II.2.4 Evaluation Externe de la Qualité	78
II.3. VITEK 2 Compact™	78
II.3.1. Carte Identification	78
II.3.2. Carte AST (Antimicrobial Susceptibility Testing)	79
II.4. Identification par les sérum s d’agglutination.....	81
III. Evaluation des points critiques.....	83
III.1. Maîtrise des 5M.....	83
III.1.1 Main d’œuvre : maîtrise et maintien de la compétence du personnel	83
III.1.2. Milieu : maîtrise de l’environnement de travail	84
III.1.3. Matériel : maîtrise de l’équipement utilisé	85

III.1.4. Matière : maîtrise de l'échantillon et des réactifs	86
III.1.5. Méthode : maîtrise des procédures et modes opératoires	87
III.2.1. Anomalies de la phase préanalytique	88
III.2.2. Anomalies de la phase analytique	88
III.3. Evaluation des points critiques sur la recherche de <i>C trachomatis</i>	89
III.3.1. Anomalie de la phase préanalytique	89
III.3.2. Anomalie de la phase analytique	89
III.4. Evaluation des points critiques sur la recherche des mycoplasmes	90
III.4.1. Anomalies de la phase préanalytique	90
III.4.2. Anomalie de la phase analytique	91
III.5. Evaluation des points critiques sur le diagnostic de la VB	91
III.5.1. Anomalie de la phase préanalytique	91
III.5.1. Anomalie de la phase analytique	91
III.6. Evaluation des points critiques sur l'hémoculture	92
III.6.1. Anomalie de la phase préanalytique	92
III.6.2. Anomalie de la phase analytique	92
III.6.3. Anomalie de la phase post-analytique	93
III.7. Evaluation des points critiques sur l'identification et l'antibiogramme	94
III.7.1. Anomalie de la phase analytique	94
III.7.2. Anomalie de la phase post-analytique	96
DISCUSSIONS	97
CONCLUSIONS	105
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	106

Liste des tableaux

Tableau 1. Score de Nugent-Krohn-Hillier	74
Tableau 2. Performances COBAS TaqMan	77
Tableau 3. Résultats performances VITEK 2 Compact	80
Tableau 4. Comparaison AST-XNO5 et la méthode de diffusion de disques	81
Tableau 5. Exemple d'enregistrement de l'harmonisation des pratiques de lecture	83
Tableau 6. Exemple CIQ préparation du milieu Hektoen	87

Liste des illustrations

Figure 1. La roue de l'amélioration continue (www.piloter.org).....	17
Figure 2. Fonctionnement des 5 S dans une entreprise (http://www.sudonline 05/12/13).....	22
Figure 3. Diagramme d'ISHIKAWA (www.biotechno.fr 10/12/13)	26
Figure 4. Les 5 pourquoi	29
Figure 5. Recherche des causes racine	30
Figure 6. Liste des causes.....	31
Figure 7. Cartographie des processus d'un LBM (http://www.labobio24.sn).....	36
Figure 8. Fiche d'un processus opérationnel (Préanalytique) (http://www.labobio24.sn)	37
Figure 9. Automate BacT/ALERT™ (www.biomerieux-usa.com)	50
Figure 10. Flacons aérobie et anaérobie et pédiatriques positif et négatif du BacT/ALERT (www.biomerieux-usa.com)	51
Figure 11. Principe du COBAS TaqMan (molecular.roche.com)	54
Figure 12. Réactifs COBAS TaqManTM CT v2.0 (molecular.roche.com)	55
Figure 13. Appareil COBAS TaqMan™ (molecular.roche.com).....	56
Figure 14. Automate VITEK 2 Compact et carte d'identification (www.biomerieux-usa.com)	59
Figure 15. Carte AST sur portoir, carte identification VITEK 2 Compact et DensiChek Plus (www.biomerieux-usa.com)	59

Liste des abréviations et acronymes

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMDEC	Analyse des Modes de Défaillance, de leurs Effets et de leur Criticité
AST	Antibiotic Susceptibility Testing
BAAR	Bacille Acido-Alcool Résistant
BLSE	B-lactamase à spectre élargi
BMR	Bactérie Multi Résistante
BPL	Bonne Pratique de Laboratoire
CIQ	Contrôle Interne de Qualité
COFRAC	Comité Français d'Accréditation
CTCB	Centre Toulousain pour le Contrôle de Qualité en Biologie clinique
DM	Discordance Majeure
Dm	Discordance Mineure
DTM	Discordance Très Majeure
ECBU	Etude Cytobactériologique des Urines
ECME	Equipement de Contrôle, de Mesure et d'Essai
EEQ	Evaluation Externe de la Qualité
EMT	Erreur Maximale Tolérée
EPC	Entérobactérie Productrice de Carbapénémase
ERV	Entérocoque Résistant à la Vancomycine
GBEA	Guide de Bonne Exécution des Analyses
GTA	Guide Technique d'Accréditation
ISO	International Standardisation Organisation
LABM	Laboratoire d'Analyses de Biologie Médicale
LBA	Lavage Broncho Alvéolaire
LBM	Laboratoire de Biologie Médicale
LCR	Liquide Céphalo Rachidien
LNE	Laboratoire National d'Essai
ompA	Outer Membrane Protein A
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymérase Chain Reaction
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Meticilline
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> Sensible à la Meticilline
SIL	Système Informatique du Laboratoire
SMQ	Système de Management de la Qualité
SH	Santé Humaine
SHU	Syndrome Hémolytique Urémique
UFC	Unit Formant Colonie
VB	Vaginose Bactérienne

INTRODUCTION

La prise en charge médicale d'un patient est un processus complexe constitué de deux composantes :

- ✓ La composante médicale par une consultation chez le médecin, sage femme, infirmier(e) etc. qui dans certains cas suffit pour apporter un remède, par contre dans d'autres cas les observations cliniques nécessitent un support pour confirmer le diagnostic par des examens paramédicaux (deuxième composante).
- ✓ La deuxième composante de la prise en charge médicale du patient est constituée de plusieurs éléments dont l'imagerie médicale, l'anatomopathologie, la biologie médicale (au laboratoire) etc.

Les prestations fournies par le laboratoire de biologie médicale apportent une confirmation au diagnostic ou à la présomption du diagnostic posé par la composante médicale.

Ces prestations sont donc essentielles pour les soins prodigués aux patients, elles doivent satisfaire à la fois les besoins du patient, ceux des cliniciens responsables des soins prodigués aux patients et ceux de tout autre utilisateur final. **(53)**

La prise en charge d'un patient au laboratoire ne se limite pas à la simple analyse biologique, c'est une prestation qui inclut la prescription des examens, la préparation du patient et son identification, le recueil de l'échantillon, le transport de l'échantillon, le stockage avant et après traitement, le prétraitement, l'analyse de l'échantillon biologique, l'interprétation des résultats, le compte rendu et le conseil. Ainsi on ne parle plus de Laboratoire d'Analyses et de Biologie Médicale (LABM) mais plutôt de Laboratoire de Biologie Médicale (LBM)**(53, 90, 116)**.

Cette biologie est régie par une réglementation et sur le plan juridique, le laboratoire a l'obligation des moyens, c'est-à-dire que le biologiste médical met en place des dispositions réglementaires, normatives et scientifiques (selon l'état de l'art dans les domaines concernés) permettant d'assurer la fiabilité des résultats.

Ainsi la finalité d'un laboratoire de biologie médicale est double :

- ✓ La mise à disposition des résultats fiables aux patients et prescripteurs
- ✓ La satisfaction aux exigences explicites et implicites des clients et autres parties intéressées.

Pour atteindre cette finalité, l'option de la mise en place d'un système de management de la qualité conformément aux référentiels ISO 9001 : 2008 et ISO 15189 : 2012 devient un outil fortement recommandé.

Dans les pays occidentaux tels que la France, en plus de l'aspect réglementaire de mettre en place des Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) (42), il est envisagé de rendre obligatoire la mise en place d'une démarche qualité dans les laboratoires de biologie médicale dans un premier temps puis l'accréditation selon la norme ISO 15189 dans un second temps (40, 69)

Le Comité Français pour l'Accréditation (COFRAC) subdivise le domaine de la biologie médicale en six (6) sous domaines : Biochimie, Hématologie, Immunologie, Microbiologie, Génétique, Biologie de la Reproduction, chaque sous domaine étant divisé en famille. (102, 107, 108).

Dans le contexte africain au sud du Sahara, la notion de management de la qualité demeure un engagement volontaire même si les exigences réglementaires vont dans le même sens que les exigences normatives.

Au Sénégal, la direction des laboratoires dans un cadre réglementaire a publié en 2009 des exigences pour l'ouverture et l'exploitation d'un LBM (20, 77)

Le LBM BIO 24 structure privée (cadre de cette étude) s'est engagé dans la démarche qualité depuis 1999, la première certification ISO 9001 fut obtenue en 2001 et l'accréditation selon la norme ISO 15189 en 2012 dans les sous domaines de Biochimie, Hématologie et Microbiologie.

Ce dernier sous domaine est subdivisé en quatre (4) familles : Sérologie Infectieuse, Bactériologie, Parasitologie-Mycologie et Virologie. Seule la famille de la Sérologie infectieuse est concernée par la portée de l'accréditation du laboratoire BIO 24 en 2012.

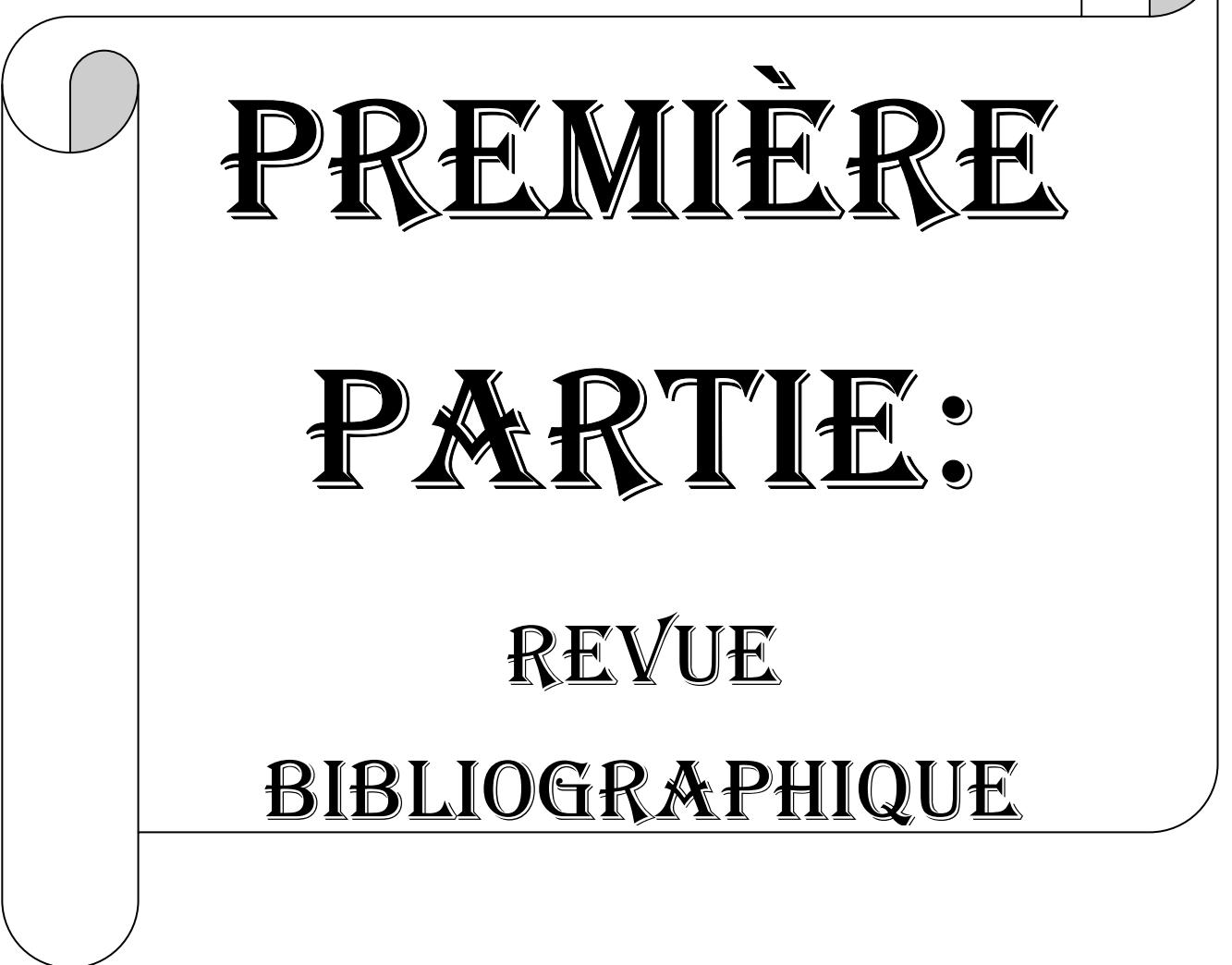
Dans la continuité du processus d'accréditation, ce travail a été entrepris dans le but de proposer une méthodologie de validation des méthodes en bactériologie conformément aux exigences de la norme ISO 15189 afin d'étendre la portée d'accréditation.

Les objectifs spécifiques de cette approche ont été de :

- ✓ Rechercher et mettre en place les exigences techniques à partir des référentiels utilisés en bactériologie
- ✓ De vérifier les performances des trois automates utilisés en bactériologie
- ✓ Vérifier les performances des sérums d'agglutination utilisés pour l'identification
- ✓ D'évaluer des points critiques et leurs moyens de maîtrise pour les analyses réalisées en routine.

Ce travail est articulé comme suit :

- ✓ La première partie sera consacrée à la revue bibliographique sur le Système de Management de la Qualité (SMQ) et les étapes de l'analyse des prélèvements en bactériologie
- ✓ La deuxième partie concernera le travail sur site avec la méthodologie, les résultats obtenus, la discussion et les conclusions.



PREMIÈRE PARTIE: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I Historique de la Qualité

I.1. Le Taylorisme

Les civilisations anciennes se sont d'abord appuyées sur l'art et l'artisanat pour faire vivre et progresser la qualité des productions au sein des sociétés. A la fin du XVII^{ème} siècle, l'industrie est née du regroupement d'artisans, de la progression des techniques et de la consommation de masse. L'offre étant très inférieure à la demande tout se vend même ce qui est de mauvaise qualité. Dans l'entreprise l'état d'esprit était dominé par des comportements artisanaux et individualistes alors qu'il s'agissait de faire œuvre d'industrie. (94)

Dans ce contexte de l'essor de l'industrialisation, l'ingénieur américain **Frederick Winslow Taylor** estime qu'il est impossible de réaliser une production de masse sans un minimum d'organisation et de discipline, ainsi le taylorisme est proposé.

Il s'agit d'une méthode de travail qui préconise l'organisation scientifique du travail grâce à une analyse détaillée des modes et techniques de production (gestes, rythmes, cadences etc.) dans le but d'obtenir la meilleure façon de produire, de rémunérer, et donc le meilleur rendement. (94)

Le taylorisme est donc une méthode de travail dans l'industrie qui consiste en une organisation rationnelle du travail qui est divisé en tâches élémentaires, simples et répétitives, confiées à des travailleurs spécialisés.

Le taylorisme fut par la suite critiqué comme méthode éprouvante et démotivante. Pour éviter les problèmes induits par le taylorisme et de permettre aux travailleurs de participer aux décisions relatives à la production, d'autres conceptions permettant d'assurer la qualité du produit final telle que le contrôle de qualité sont apparues.

I.2. Le Contrôle de Qualité

Le concept de la qualité date des années 1930 pour maîtriser la qualité de la production industrielle. Cette façon de penser a pris le jour au sein d'une entreprise aux USA «Bell Telephone Laboratories» conduite par **Walter Andrew Shewhart** mathématicien de formation. Suite aux problèmes de non-qualité des produits et services de l'entreprise, **Shewhart** propose à cette époque un contrôle des produits et services basé sur des méthodes statistiques et réalisé par des personnes indépendantes à la production concernée. C'est ainsi qu'est né le service qualité qui contrôlait à posteriori la qualité des produits livrés. Ce concept n'a pas connu un développement considérable jusqu'avant la deuxième guerre mondiale.

Vers 1941, le développement de la production industrielle va favoriser une diffusion généralisée des principes de **Shewhart**. (110)

En 1945, **Armand Vallin Feigenbaum**, qui travaillait pour General Electric, met au point une méthode de gestion économique de la qualité qui additionne les coûts d'obtention de la qualité et les coûts de non-qualité. Pour renforcer l'idée, il démontre qu'en matière de qualité, il est plus économique de mettre l'accent sur la prévention que sur le contrôle.

Dans les années 50, au lendemain de la deuxième guerre mondiale au Japon, naissent les principes de la qualité totale et l'assurance qualité pour la reconstruction de l'industrie. L'introduction de cette notion de qualité au Japon sera faite par des américains comme **William Edwards Deming, Joseph Moses Juran, Armand Vallin Feigenbaum** qui vont permettre à l'industrie japonaise une reconstruction. Ils ont fait découvrir aux japonais que la qualité n'est pas une affaire de spécialistes du contrôle, mais qu'elle implique la direction générale et exige la participation active de l'ensemble du personnel. (35)

La qualité, toujours vue sous l'angle classique du contrôle qualité et du "bon produit ou service" se diffuse dans beaucoup d'organismes et trouve bientôt ses limites. Durant cette période, un nouveau principe va naître : l'Assurance Qualité

I.3. L'Assurance Qualité et la Qualité Totale

Ce nouveau concept est basé sur la « confiance » ou la « présomption » que le produit a la qualité requise et celle-ci doit être démontrée à tout moment pendant la réalisation et l'existence du produit sur des documents écrits et archivés.

Ce nouveau concept avait permis de donner au client une garantie à priori de la qualité du produit final ou service. Ces principes seront largement diffusés dans les grandes entreprises industrielles et tout particulièrement dans les industries militaire, nucléaire et aéronautique. (35)

C'est vers 1950 que les U.S.A. lancent ce nouveau concept dans le secteur de l'armement (*Military Standards*) : au lieu de réunir un corps de nombreux contrôleurs ou d'inspecteurs pour vérifier la conformité de chaque pièce, il est préférable de s'assurer que l'entreprise qui fournit les pièces au moyen de son système de management de la qualité a acquis la capacité d'assurer elle-même la maîtrise de son processus de production et de contrôle de conformité aux exigences spécifiées. (35)

En France, l'assurance de la qualité a été introduite dans les années 1960, à l'occasion de la fabrication du premier satellite français par le Centre National d'Etudes Spatiales. Elle a pris de l'importance dans la construction des centrales nucléaires et les fabrications pour l'armement

En 1961, **Armand Feigenbaum** publie *Total Quality Control*, titre mal traduit en français par « Maîtrise de la Qualité Totale », au lieu de « Maîtrise Totale de la Qualité » (35)

Dans les années 1970, la qualité des produits japonais se fait ressentir dans les marchés occidentaux. Cet envahissement fait prendre conscience aux grandes entreprises occidentales de la nécessité de changer leur approche de la qualité, c'est ainsi qu'est née la Qualité Totale conçue par **Armand Feigenbaum**. En 1971 avec **Kaoru Ishikawa** ils fondent l'Académie Internationale de la Qualité. (50)

Ce nouveau concept était basé sur la mobilisation et l'implication du personnel, considérée comme composante importante de l'entreprise. La qualité étant définie comme une satisfaction, la qualité totale implique chaque fonction à mettre en œuvre tous ses moyens propres pour améliorer la qualité.

En occident, les conséquences de la crise et l'invasion des produits japonais de qualité supérieure d'une part, l'inversion de la tendance «l'offre qui est supérieure à la demande» d'autre part obligent aux consommateurs à l'alternative de la qualité (meilleure) et du prix (bas).

Les entreprises occidentales prennent conscience de la nécessité de changer l'approche de la qualité en initiant le concept de la qualité totale. Ce concept étant fondé sur un mode d'action basé sur la participation et la mobilisation du personnel, les préoccupations stratégiques de l'entreprise axées sur des modes d'actions techniques et organisationnels.

Après l'apprentissage de la qualité occidentale, les japonais se lancèrent dans le développement des outils du Management de la Qualité parmi lesquels les cercles de la qualité et le diagramme de causes et effets de **Kaoru Ishikawa. (50)**

I.4. Le Management de la Qualité Totale

C'est en 1980 que l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO) a créé le comité ISO/TC 176 « Assurance de la qualité » pour élaborer des normes « d'assurance de la qualité » applicables à tous les domaines de l'industrie et des services.

La première série des normes ISO publiée en 1987 (NF ISO 9000, ISO 9001, ISO 9002 et ISO 9003) complétée par la norme ISO 8402 *Qualité – Vocabulaire*, était intitulée *Gestion et assurance de la qualité* ; l'objectif était de mettre à la disposition des différents donneurs d'ordres un référentiel unique, international, de « gestion et d'assurance de la qualité » permettant d'auditer leurs différents fournisseurs. A ce stade de développement des normes ISO 9000, il n'était donc pas question de les appliquer à la certification par tierce partie des systèmes de management.

Ainsi depuis son apparition dans les années 90 et jusqu'à nos jours le Management de la Qualité Totale insiste toujours sur les vraies préoccupations stratégiques de l'entreprise (modes d'actions techniques et organisationnels). C'est ainsi qu'explose littéralement « l'assurance qualité » qui est mise en œuvre dans de nombreux secteurs.

L'assurance qualité présente plusieurs enjeux allant des enjeux internes aux enjeux externes.

Rapport-Gratuit.com

II Les enjeux de la qualité

La démarche doit être de préférence volontairement initiée par la direction de l'entreprise afin qu'elle montre dès le début son engagement et sa volonté d'améliorer la satisfaction de ses clients tout en motivant ses salariés. Les questions suivantes doivent se poser :

Mettre en place un SMQ pour quoi faire ?

Qu'est-ce qu'un SMQ va rapporter à l'entreprise ?

Qu'est-ce que la mise en place du SMQ va coûter à l'entreprise ?

Est-ce juste pour l'obtention de reconnaissance internationale (certification, accréditation) ?

Est-ce pour l'obtention d'un outil d'amélioration continue afin de progresser et d'accroître la satisfaction des clients ?

Vu sous ce dernier aspect, l'obtention d'une reconnaissance internationale concrétise la conformité et l'efficacité de la démarche par rapport à un référentiel et à l'attente des clients.

Il n'en demeure pas moins que la qualité doit être vue sous plusieurs aspects pour être pérenne, elle doit satisfaire beaucoup d'enjeux.

II.1 Les enjeux économiques

L'entreprise doit améliorer sa compétitivité par la diminution des prix de revient et maîtriser les coûts de non-qualité.

La direction doit développer des stratégies pour :

- L'amélioration de l'image de marque de l'entreprise,
- La satisfaction et fidélisation de ses clients,
- La capture de nouveaux marchés.

II.2 Les enjeux technologiques

L'encadrement technique en se basant sur l'état de l'art et la veille technologique doit mettre en place des dispositions pour :

- Maîtriser des processus de production de plus en plus complexes

- Diminuer les erreurs par la formalisation des méthodes
- Uniformiser les produits ou services
- Capitaliser le savoir faire
- Transférer les technologies
- Faciliter l'insertion du nouveau personnel (maîtrise documentaire)

II.3 Les enjeux juridiques

En se basant sur la veille réglementaire et normative, la direction doit mettre en place les dispositions pour pouvoir démontrer :

- Obligation de moyens / obligation de résultats
- Responsabilités du respect de la conformité du produit par rapport à son périmètre d'utilisation (sécurité des personnes, sécurité sanitaire et environnementale)
- Disponibilité des preuves de bonne foi : toutes les précautions ont été prises

II.4 Les enjeux sociaux

La responsabilité sociétale de l'entreprise impose de décliner les principes du développement durable à l'échelle de l'entreprise par :

- ✓ L'implication et la mobilisation du personnel
- ✓ La communication interne en mettant tout le monde au même niveau d'information
- ✓ La motivation du personnel en :
 - donnant plus de responsabilités individuelles,
 - permettant l'accomplissement de l'individu dans son travail
 - rendant les acteurs partenaires actifs.

En plus des enjeux, les référentiels relatifs au management de la qualité se fondent sur un certain nombre de principes, ceux-ci sont utilisés par la direction d'une entreprise dans le cadre de l'amélioration continue des processus.

III Les principes du management de la qualité

Les principes du management de la qualité ont été établis sur la base de l'expérience et des connaissances collectives des experts internationaux qui participent au Comité Technique ISO/TC 176, Management de la Qualité et Assurance de la Qualité. Ce comité est responsable de l'élaboration et de la mise à jour des normes de la famille ISO 9000, ces principes sont au nombre de huit. (19, 51)

La mise en pratique de ces principes a pour objectif l'amélioration des performances de l'entreprise auprès de ses différentes cibles : clients, personnel, actionnaires, fournisseurs, partenaires etc.

III.1 Principe 1 – Orientation Client

Les organismes dépendent de leurs clients, il convient donc qu'ils en comprennent les besoins présents et futurs, qu'ils satisfassent leurs exigences et qu'ils s'efforcent d'aller au-devant de leurs attentes.

L'écoute et la compréhension de leurs besoins présents et futurs est indispensable pour satisfaire leurs exigences et d'aller au devant de leurs attentes. L'orientation client doit se traduire par la mise en place d'un processus de communication avec les clients, une analyse prospective de leurs besoins, une évaluation régulière de leur satisfaction et le traitement de leurs réclamations.

Ce principe permet :

- ✓ de mieux cerner et comprendre les besoins et les attentes des clients
- ✓ de s'assurer que les objectifs de l'organisme sont en phase avec les besoins et les attentes du client
- ✓ de mieux communiquer les besoins et les attentes du client dans tout l'organisme
- ✓ de mesurer la satisfaction du client et agir sur les résultats afin d'obtenir cette satisfaction
- ✓ de gérer méthodiquement les relations avec le client
- ✓ d'assurer, dans la démarche visant la satisfaction de la clientèle, une approche équilibrée avec les autres parties intéressées (notamment la direction, les employés, les fournisseurs, les financiers, les collectivités locales et la société dans son ensemble).

III.2. Principe 2 – Leadership

Les dirigeants établissent la finalité et les orientations de l'organisme. Il convient qu'ils créent et maintiennent un environnement interne dans lequel les personnes peuvent pleinement s'impliquer dans la réalisation des objectifs de l'organisme.

Pour toute entreprise désirant mettre en place un système de management de la qualité, la direction doit déterminer clairement son réel engagement et ses orientations stratégiques. Elle doit créer un environnement favorisant l'implication du personnel, définir des objectifs et apporter de la valeur ajoutée.

La direction de l'entreprise doit établir ses objectifs et ses orientations de manière à impliquer pleinement l'ensemble de son personnel. Grâce à une bonne communication interne, ils seront compris et motivants et créeront des valeurs communes et des modèles de comportement fondés sur l'équité et l'éthique

Ce principe a l'avantage :

- ✓ de faire comprendre au personnel les objectifs de l'entreprise
- ✓ de mettre en œuvre de façon unifiée les activités de l'entreprise
- ✓ de réduire au minimum les défauts de communication
- ✓ Etablir une vision claire du futur de l'organisme
- ✓ De définir les éléments de mesure réalisables pour évaluer les processus
- ✓ Créer et entretenir des valeurs communes et des modèles de comportement fondés sur l'équité et l'éthique à tous les niveaux de l'organisme
- ✓ Etablir la confiance et éliminer les craintes
- ✓ Fournir au personnel les ressources, la formation nécessaires et la liberté d'agir de manière responsable
- ✓ Susciter, encourager et reconnaître les contributions des individus.

III.3. Principe 3 – Implication du personnel

Les personnes à tous niveaux sont l'essence même d'un organisme et une totale implication de leur part permet d'utiliser leurs aptitudes au profit de l'organisme.

Le personnel est le maillon principal et indispensable dans l'organisation d'une entreprise, son implication totale est donc fondamentale. Il faut utiliser toutes les compétences internes au profit de l'entreprise, motiver ses collaborateurs, les engager, les rendre responsables et concernés par l'amélioration continue.

Ce principe présente les avantages suivants :

- ✓ meilleure motivation, implication et engagement du personnel pour l'entreprise
- ✓ amélioration de l'innovation et la créativité pour l'entreprise
- ✓ appropriation des performances de l'entreprise par le personnel
- ✓ meilleure contribution du personnel à l'amélioration continue des processus
- ✓ meilleure compréhension de l'importance de la contribution et du rôle du personnel dans l'entreprise
- ✓ acceptation plus aisée de la responsabilité et d'assumer sa part de responsabilité dans la résolution des problèmes par le personnel
- ✓ meilleure évaluation du personnel en fonction des objectifs attribués
- ✓ accroissement de la compétence et de la connaissance du personnel

III.4. Principe 4 – Approche processus

Un résultat escompté est atteint de façon plus efficiente lorsque les ressources et activités afférentes sont gérées comme un processus.

Le processus est défini comme un ensemble d'activités corrélées ou interactives qui transforme des éléments d'entrée en éléments de sortie. Un élément de sortie d'un processus constitue souvent un élément d'entrée d'un autre processus.

Une entreprise, quelque soit sa taille et sa complexité est organisée en processus que ceux-ci soient formalisés ou non. Dans l'approche processus, ces entités doivent être liées les unes aux autres (interactions) et fonctionner ensemble pour une meilleure performance du système.

L'approche processus permet :

- ✓ L'utilisation efficace des ressources et la réduction des coûts et du cycle du produit/service
- ✓ L'obtention des résultats améliorés, cohérents et prévisibles
- ✓ une focalisation sur les opportunités d'amélioration et classement par ordre de priorité
- ✓ une définition systématique des activités nécessaires pour obtenir un résultat désiré
- ✓ l'établissement des responsabilités claires pour la gestion des activités clés
- ✓ l'analyse et la mesure du potentiel des activités clés
- ✓ l'identification des interfaces des activités clés avec et entre les différentes fonctions de l'organisme
- ✓ Focalisation sur les ressources, les méthodes et les matériels qui amélioreront les activités clés de l'organisme
- ✓ Evaluation des risques, des conséquences et des impacts des activités sur les clients, les fournisseurs et d'autres parties intéressées.

III.5. Principe 5 – Management par approche système

Identifier, comprendre et gérer des processus corrélés comme un système contribue à l'efficacité et l'efficience de l'organisme à atteindre ses objectifs.

L'approche système permet :

- ✓ L'atteinte des objectifs assignés par l'intégration et l'alignement des processus
- ✓ La focalisation des ressources et des efforts sur les processus ayant un impact direct sur la satisfaction du client
- ✓ de conférer aux parties intéressées la confiance dans la cohérence, l'efficacité et l'efficience de l'entreprise
- ✓ de clarifier le fonctionnement de l'entreprise
- ✓ de mettre à jour et de supprimer les activités redondantes ou doublons et les zones d'ombre qui sont des sources de dysfonctionnement
- ✓ une structuration et harmonisation du système pour atteindre les objectifs de l'organisme de la façon la plus efficace et efficiente
- ✓ une compréhension des interdépendances entre les processus du système

- ✓ Assurer une meilleure compréhension des rôles et des responsabilités nécessaires pour réaliser les objectifs communs et réduire ainsi les blocages inter fonctionnels
- ✓ de comprendre les possibilités organisationnelles et d'établir avant d'agir les contraintes liées aux ressources
- ✓ de cibler et définir la manière d'opérer les activités particulières au sein d'un système
- ✓ d'améliorer en continue le système par le biais d'outils de mesures et d'évaluations.

III.6. Principe 6 – Amélioration continue

Il convient que l'amélioration continue de la performance globale d'un organisme soit un objectif permanent de l'entreprise.

L'objectif permanent de l'entreprise doit être la quête de l'amélioration de sa performance globale, La performance ayant un impact direct sur la satisfaction des clients. C'est un avantage concurrentiel indéniable apportant souplesse et rapidité de réaction face aux opportunités qui pourraient se présenter. La formation du personnel aux outils et aux méthodes d'amélioration continue s'avère indispensable. L'établissement des objectifs, la mesure de l'efficacité des processus et la reconnaissance des améliorations ou les corrections à apporter sont l'essence même du principe.

Ce principe permet :

- ✓ L'alignement des activités d'amélioration à tous les niveaux par rapport aux objectifs stratégiques de l'entreprise
- ✓ de disposer d'une facilité et rapidité de réaction face aux opportunités.
- ✓ l'utilisation d'une approche cohérente à l'ensemble du système en vue de l'amélioration continue des performances de l'entreprise
- ✓ d'assurer la formation du personnel aux méthodes et outils d'amélioration continue
- ✓ de faire de l'amélioration continue des produits, processus et systèmes un objectif pour chaque individu dans l'entreprise
- ✓ d'établir des objectifs afin d'orienter l'amélioration continue et des mesures pour en assurer le suivi des processus

Le principe de l'amélioration continue est représenté par la roue de Deming ou PDCA (Planifier-Dérouler-Contrôler-Améliorer ou Plan-Do-Check-Act).



Figure 1. La roue de l'amélioration continue (www.piloter.org)

III.7. Principe 7 – Approche factuelle pour la prise de décision

Les décisions efficaces se fondent sur l'analyse de données et d'informations.

Décider c'est prendre des risques d'où la prise des décisions doit s'appuyer sur des informations fiables qui sont disponibles sous une forme permettant leur analyse et leur compréhension. La mise en place d'indicateurs pertinents à l'aide de tableaux de bord permet de répondre à ce besoin et facilite la prise de décisions.

Cette approche permet :

- ✓ de disposer de meilleure aptitude à démontrer l'efficacité des décisions antérieures par des faits et des données factuelles enregistrées
- ✓ de développer l'aptitude à examiner, mettre en cause et changer les opinions et les décisions.
- ✓ de garantir que les données et les informations sont suffisamment exactes et fiables
- ✓ Rendre les données accessibles à ceux qui en ont besoin
- ✓ d'analyser les données et les informations à l'aide de méthodes valides
- ✓ la prise de décisions et actions fondées sur une analyse factuelle, équilibrée par l'expérience et l'intuition.

III.8. Principe 8-Relations mutuellement bénéfiques avec les fournisseurs

Un organisme et ses fournisseurs sont interdépendants et des relations mutuellement bénéfiques augmentent les capacités des deux organismes à créer de la valeur.

L'entreprise établit une communication claire avec ses fournisseurs, met en commun ses acquis et ses ressources, recherche les voies d'amélioration et encourage celles réalisées par ses fournisseurs.

Ce principe a pour avantage :

- ✓ De développer les aptitudes accrues à créer de la valeur pour les deux parties

- ✓ de développer une souplesse et rapidité des réactions face à l'évolution du marché ou des besoins et des attentes du client
- ✓ d'optimisation des coûts et des ressources pour l'entreprise
- ✓ d'établir des relations avec les fournisseurs qui équilibrivent les gains à court terme et des considérations à long terme
- ✓ de mettre en commun des acquis et des ressources avec les partenaires
- ✓ d'identifier et choisir les fournisseurs clés en fonction des exigences des clients
- ✓ de communiquer de façon claire et ouverte avec partage d'information et des plans futurs
- ✓ d'établir des activités communes de développement et d'amélioration
- ✓ d'inspirer, d'encourager et reconnaître les améliorations et les réalisations des fournisseurs.

L'amélioration continue d'un SMQ est facilitée par l'utilisation d'un certain nombre d'outils dont la combinaison ou le choix varie en fonction de la complexité et de l'objectif recherché.

IV Outils utilisés dans le management de la qualité

Les outils utilisés apportent une méthodologie et permettent de rediriger les efforts et ressources afin d'éviter une contre production.

Parmi ces outils, on distingue : **AMDEC**, les **5S** les **5M**, **QQOQCCP**, Brainstorming, les 5 pourquoi etc.

IV.1. Les 5S (48)

C'est un outil d'amélioration continue conçu par les japonais pour optimiser l'organisation efficace d'un poste de travail, d'un service ou d'une entreprise. Il est basé sur la participation du personnel qui prend en charge et organise son espace de travail.

Les 5S viennent des initiales des mots suivants :

SEIRI (trier) : Identifier tout ce qui est inutile, trier et éliminer. Il faut établir une liste de tâches et du matériel nécessaire à l'exécution des tâches au poste. Il faut donc distinguer ce qui est utile et ce qui ne l'est pas en triant et en éliminant. Ainsi, on ne gardera que le strict nécessaire sur le poste de travail et dans son environnement. La manie d'accumuler et de garder parce que cela peut servir ne favorise pas la propreté et l'efficacité du travail.

SEITON (ranger) : ranger, classer, ordonner ce qui est utile. Classer tous les éléments, les outils nécessaires de façon ordonnée pour qu'ils soient faciles à trouver et à ranger : c'est savoir où disposer les outils pour réaliser les tâches de la manière la plus efficace possible. C'est définir la manière la plus efficiente de réaliser les tâches.

SEISO (nettoyer) : nettoyer l'espace, les outils, les équipements C'est avoir un espace de travail agréable, lumineux. C'est aussi s'assurer que chaque outils, matériels est en état, prêt à servir car nettoyer intelligemment c'est inspecter, trouver les anomalies C'est les premiers pas vers la maintenance autonome des machines.

SEIKUTSU (standardiser) : organiser, établir et formaliser les règles de fonctionnement de l'entreprise. C'est définir l'état standard et les tâches à réaliser régulièrement pour conserver cet état standard. La seule bonne question à se poser ici est pourquoi le standard n'est pas respecter ? S'organiser jusqu'à arriver au standard immuable, plus besoin de ranger parce que plus d'outils, pas besoin de nettoyer parce que plus de fuite, plus de source de salissure.

Il s'agit des règles, une règle sera appliquée parce que comprise et encore plus facilement encore quand le personnel participe à son élaboration car ce sont les opérateurs qui définissent leurs standards. Le **SEIKUTSU** aide à combattre la tendance naturelle au laisser-aller et le retour aux vieilles habitudes.

Une fois les trois premiers S accomplis, il faut combattre la tendance naturelle au laisser-aller et le retour aux anciennes habitudes en mettant au point des méthodes permettant de maintenir cet état et d'éviter les déviations.

SHITSUKE (rigueur) : respecter et améliorer amène la rigueur. L'exigence de la continuité dans le temps par le contrôle effectué par la ligne hiérarchique est une obligation pour la réussite des **5S**. La ligne hiérarchique doit assumer son rôle n°1 c'est-à-dire faire respecter les standards, les règles, les modes opératoires et aussi continuer à améliorer.

Pour faire vivre les 4 premiers S et repousser leurs limites initiales, dans une démarche d'amélioration continue, il faut surveiller régulièrement l'application des règles, les remettre en mémoire, en corriger les dérives en instituant un système de suivi avec affichage d'indicateurs

Les **5S** tout le monde en fait, connaît, veut en faire, rares sont les entreprises qui appliquent avec le sens profond de la méthode. On observe souvent une application partielle des 3 premiers S mais pas des 2 derniers qui sont les plus importants.

L'outil **5S** a pour avantage :

- ✓ d'améliorer la productivité, l'efficacité et la qualité
- ✓ de créer des comportements positifs et la fierté de participer au progrès
- ✓ diminuer les dysfonctionnements en terme de gravité et de fréquence
- ✓ réduire les pertes de temps
- ✓ d'impliquer et de motiver le personnel en les rendant acteur du changement
- ✓ créer l'esprit d'équipe
- ✓ inspirer la confiance et donner une bonne image
- ✓ libérer l'espace inutilement utilisé
- ✓ améliorer la sécurité au travail, réduire les risques de pollution et permettre au personnel d'avoir une meilleure qualité de vie au travail.

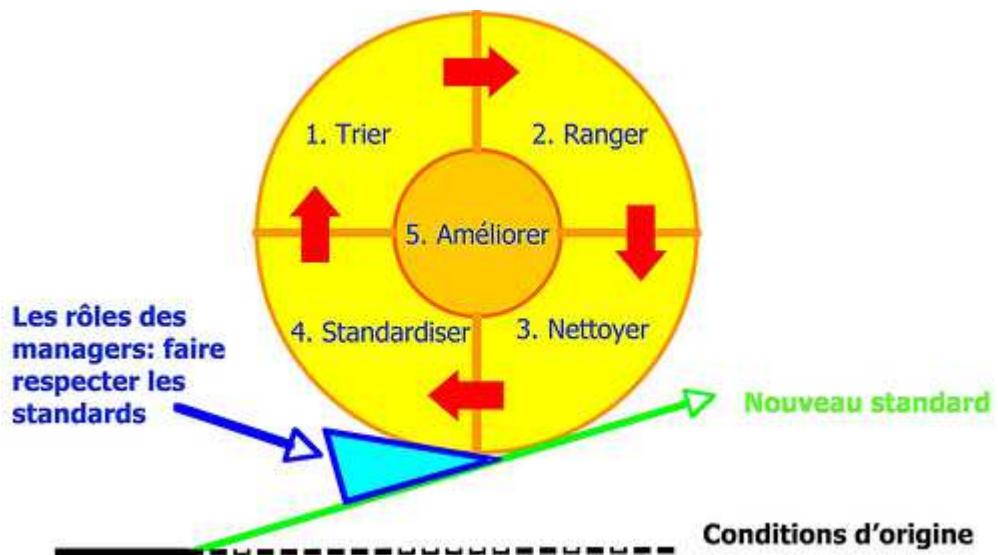


Figure 2. Fonctionnement des 5 S dans une entreprise (<http://www.sudonline> 05/12/13)

IV.2. AMDEC (Analyse des Modes de Défaillance de leurs Effets et de leur Criticité)

Une défaillance est la disparition ou la dégradation d'une fonction ou l'altération des performances requises d'un produit/service. Elle est caractérisée par une ou plusieurs causes et un ou plusieurs effets.

La cause est ce qui conduit à la défaillance, on peut estimer sa probabilité.

L'effet est la conséquence palpable de la cause sur le produit/service et sur l'utilisateur final

L'AMDEC un outil d'analyse préventive qui permet d'identifier et de traiter les causes potentielles de défauts et de défaillance avant qu'ils ne surviennent. C'est une méthode de travail en groupe par la mise en commun de l'expérience et de connaissance de chaque participant.

On distingue plusieurs types d'AMDEC :

- ✓ AMDEC produit pour vérifier la conformité développée conformément aux exigences du client.

- ✓ AMDEC processus pour valider la fiabilité du processus de fabrication ou de réalisation. Elle est utilisée pour analyser et évaluer la criticité de toutes les défaillances potentielles d'un produit engendrées par son processus.
- ✓ AMDEC moyen de production pour vérifier la fiabilité d'un équipement.

Toutes les causes potentielles de défaillance et d'estimation de la criticité sont évalués par une triple cotation :

- ✓ Gravité ou sévérité de l'effet du défaut ou de la défaillance, **G**
- ✓ Occurrence ou fréquence d'apparition de la cause, **O**
- ✓ Détection ou la probabilité de non détection de la cause, **D**

L'indice de criticité **IC = G x O x D**

Plus la criticité est importante, plus la défaillance est préoccupante. Le seuil de criticité est défini par chaque entreprise. Lorsque l'IC dépasse le seuil, le groupe de travail recherche les actions d'amélioration possible pour ramener l'IC à un niveau acceptable en jouant sur l'un des facteurs (**G, O, D**).

Pour réaliser une AMDEC, on peut utiliser un tableau qui comporte les colonnes suivantes :

- ✓ composant ou sous-ensemble,
- ✓ modes potentiels de défaillance,
- ✓ causes possibles de chaque mode de défaillance,
- ✓ effets de chaque mode de défaillance sur le système,
- ✓ indice de fréquence,
- ✓ indice de gravité,
- ✓ indice de détectabilité,
- ✓ criticité actuelle,
- ✓ actions recommandées et/ou remarques (suggestions éventuelles, etc.).

Suivant le niveau de criticité atteint, certaines actions d'amélioration sont nécessaires. Pour juger de leur impact, il faut refaire une cotation pour diminuer ainsi la criticité jusqu'à un niveau acceptable.

Pour garantir un résultat acceptable, la réalisation d'une AMDEC doit avant tout s'inscrire dans une démarche d'analyse du système. En effet, celle-ci aura permis d'identifier les fonctions, les contraintes d'utilisation et d'environnement, les paramètres critiques à mettre sous contrôle et sur lesquels les analyses type AMDEC porteront. Ainsi le périmètre sur lequel l'AMDEC doit être réalisée sera identifié.

Une fois ce périmètre établi, on identifie de manière systématique les modes de défaillance potentiels. On peut se baser sur l'expérience acquise ou, selon les domaines, sur des référentiels définissant les modes de défaillance « type » à prendre en compte. Ensuite, on identifie pour chaque mode de défaillance : ses causes, son indice de fréquence (occurrence), ses effets, son indice de gravité (classe de sévérité), les mesures mises en place pour détecter la défaillance son indice de détection (classe de probabilité de détection).

IV.3. Le Brainstorming ou Remue-ménages

C'est une méthode collective de recueil d'idées sur un problème donné afin de produire un maximum d'idées pour comprendre où résoudre un problème. Cette méthode impose une recherche d'idée en 3 temps :

1. Définition de l'objet du brainstorming et constitution du groupe de moins de 10 personnes.

Cette phase pourra être réalisée à l'aide de l'outil QZOQCCP

2. Recherche d'idées par remplissage du sac d'idées

3. Evaluation des idées en allégeant le sac et en ne gardant que les idées les plus pertinentes

Cette troisième phase pourra être exécutée à l'aide de l'outil Diagramme causes et effets et l'outil des 5 pourquoi.

Toutes les idées sont bonnes : Encourager l'émission d'une grande quantité d'idées, aucune critique des idées des autres n'est acceptée

Rebondir sur les idées des autres : Indiquer au début de la séance de brainstorming que les idées sont la propriété du groupe et pas seulement de celui qui l'émet. Il faut encourager les ricochets d'idées.

Dans le cadre de la résolution de problèmes le brainstorming est utile pour rechercher les causes des dysfonctionnements. Cet outil sera utile pour rechercher les causes possibles qui par la suite seront triées en fonction de leur pertinence.

Limites du brainstorming : délai pour réunir le groupe de travail trop important, mobilisation du groupe trop couteuse, l'importance du problème trop faible pour réunir le groupe etc.

IV.4. Le diagramme des 5M ou diagramme de causes et effets de ISHIKAWA

Cet outil permet de présenter de façon claire les causes pouvant produire un effet donné en les classant en différentes familles.

Les 5M viennent des initiales de chaque nom de famille :

- ✓ Main d'œuvre : les ressources humaines, les compétences du personnel
- ✓ Matière : Matières premières, documents, données information
- ✓ Matériel : l'équipement, les machines, le matériel informatique, les logiciels etc.
- ✓ Méthode : Règles de travail, procédures, protocoles
- ✓ Milieu : environnement matériel ou immatériel, conditions de travail

Les 5M permettent d'aboutir à une vision commune et non hiérarchisée des causes génératrices de l'effet observé.

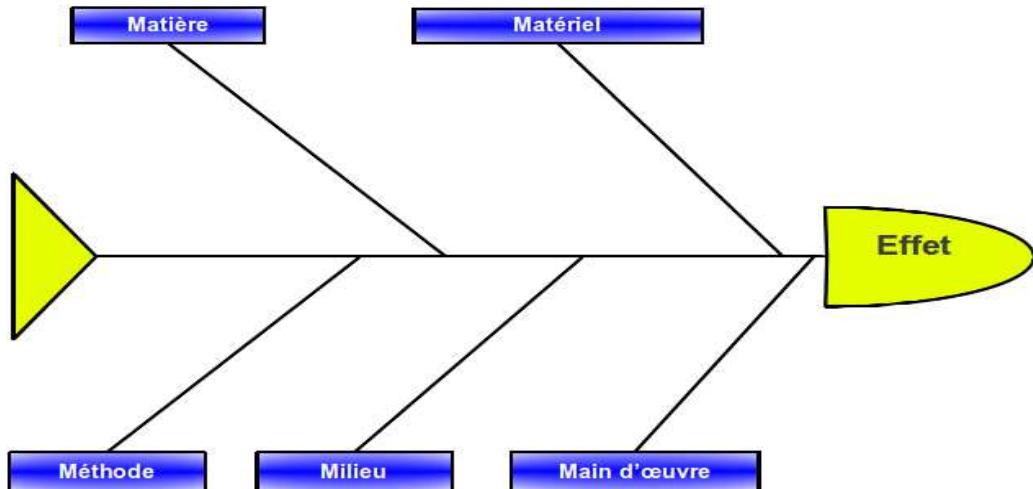


Figure 3.Diagramme d'ISHIKAWA (www.biotechno.fr 10/12/13)

Tout en gardant le même objectif, les **5M** peuvent être étendus aux autres **M** :

La Mesure qui permet de vérifier de travailler à partir d'informations fiables

Le Management qui permet de mettre en place les méthodes d'encadrement du personnel et des ressources.

Les Moyens financiers par l'élaboration du budget, pour une meilleure allocation des ressources et la gestion des coûts.

IV.5. Le diagramme de Pareto

C'est un outil qualité d'analyse d'aide à la décision. Il met en évidence la loi 80/20 c'est-à-dire que 20% des causes provoquent 80% des effets. Une grande partie des problèmes peut être résolue en traitant un nombre limité des causes. Le diagramme de Pareto permet de déterminer les priorités d'action.

Le diagramme de Pareto est également appelé méthode "ABC" ou règle des 80/20, il est le résultat des recherches de l'économiste italien **Vilfredo Frédérico Damaso** surnommé par ses étudiants : "**Marquis de Pareto**".

Le diagramme de Pareto est un graphique à colonnes qui présente les informations par ordre décroissant et fait ainsi ressortir les éléments les plus importants qui expliquent un

phénomène ou une situation. Le diagramme de Pareto fait apparaître les causes les plus importantes qui sont à l'origine du plus grand nombre d'effets. Cet outil met en évidence les 20% de causes sur lesquelles il faut agir pour résoudre 80 % du problème.

La popularité du diagramme de Pareto provient d'une part parce que de nombreux phénomènes observés obéissent à la loi des 20/80, et que d'autre part si 20% des causes produisent 80% des effets, il suffit de travailler sur ces 20% là pour influencer fortement le phénomène. La loi de Pareto est un outil efficace de prise de décision. (48)

Le diagramme de Pareto est élaboré en plusieurs étapes :

1. Déterminer le problème à résoudre.
2. Faire une collecte des données ou utiliser des données déjà existantes.
3. Classer les données en catégories et prévoir une catégorie "Divers" pour les catégories à peu d'éléments.
4. Faire le total des données de chaque catégorie et déterminer les pourcentages par rapport au total.
5. Classer ces pourcentages par valeur décroissante, la catégorie "Divers" est toujours en dernier rang.
6. calculer le pourcentage cumulé
7. déterminer une échelle adaptée pour tracer le graphique.
8. placer les colonnes (les barres) sur le graphique, en commençant par la plus grande à gauche
9. lorsque les barres y sont toutes, tracer la courbe des pourcentages cumulés
10. distinguer trois classes A, B et C qui se distribuent de la manière suivante :
 - ✓ Classe A : Les items accumulant 80% de l'effet observé
 - ✓ Classe B : Les items accumulant les 15% suivants
 - ✓ Classe C : Les items accumulant les 5% restants

IV.6. Le QQOQCCP

Il permet de cerner complètement un problème, une cause, une situation donnée. Il est très utile dans la rédaction des certains protocoles. Le nom vient des questions auxquelles on doit répondre :

Quoi : de quoi s'agit-il ? Nature et conséquence du problème, Quelle est l'activité/processus concerné par le problème

Qui : Personnes concernées par le problème, Qui a constaté le problème ? Sur quelle personne le problème a-t-il un impact ?

Où : Localisation et périmètre du problème, Où le problème a t'il des conséquences ? Quels sont les secteurs concernés ?

Quand : Caractéristique temporelle du problème. Moment de l'occurrence. Quand a lieu le problème ? Suite à quel événement ? Quelle est sa fréquence d'apparition ? Depuis combien de temps le problème existe t'il ?

Comment : Mode d'occurrence du problème, Comment le problème se révèle t'il ? Quels sont ses effets ? Comment procède-t-on (matériel, méthode, moyens) ?

Combien : quel est l'étendu du problème ou l'importance du problème ? Combien de produits ou de personnes sont concernées ou affectées ?

Pourquoi : pourquoi cela se passe-t-il ainsi ? Raisons et causes du problème (Pourra être déterminé par le diagramme de causes et effets et l'outil des 5 pourquoi). Qu'est ce qui explique l'occurrence du problème ?

IV.7. Les 5 pourquoi

C'est un outil complémentaire aux outils précédents, il permet de chercher en profondeur les causes qui expliquent l'apparition d'un problème

Bien souvent la cause, en surface, qui paraît logique n'est que la conséquence d'autres dysfonctionnements sous-jacents.

En se posant 5 fois la question du "pourquoi" on mettra en évidence les causes racines du problème.

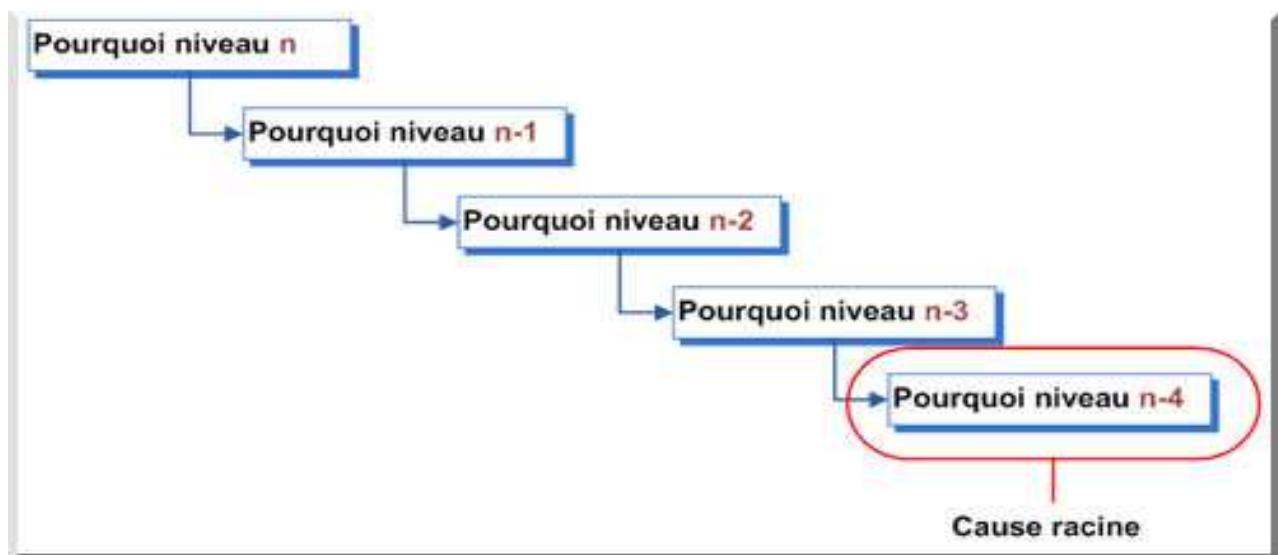


Figure 4. Les 5 pourquoi

Exemple de résultats non-conformes sur un automate

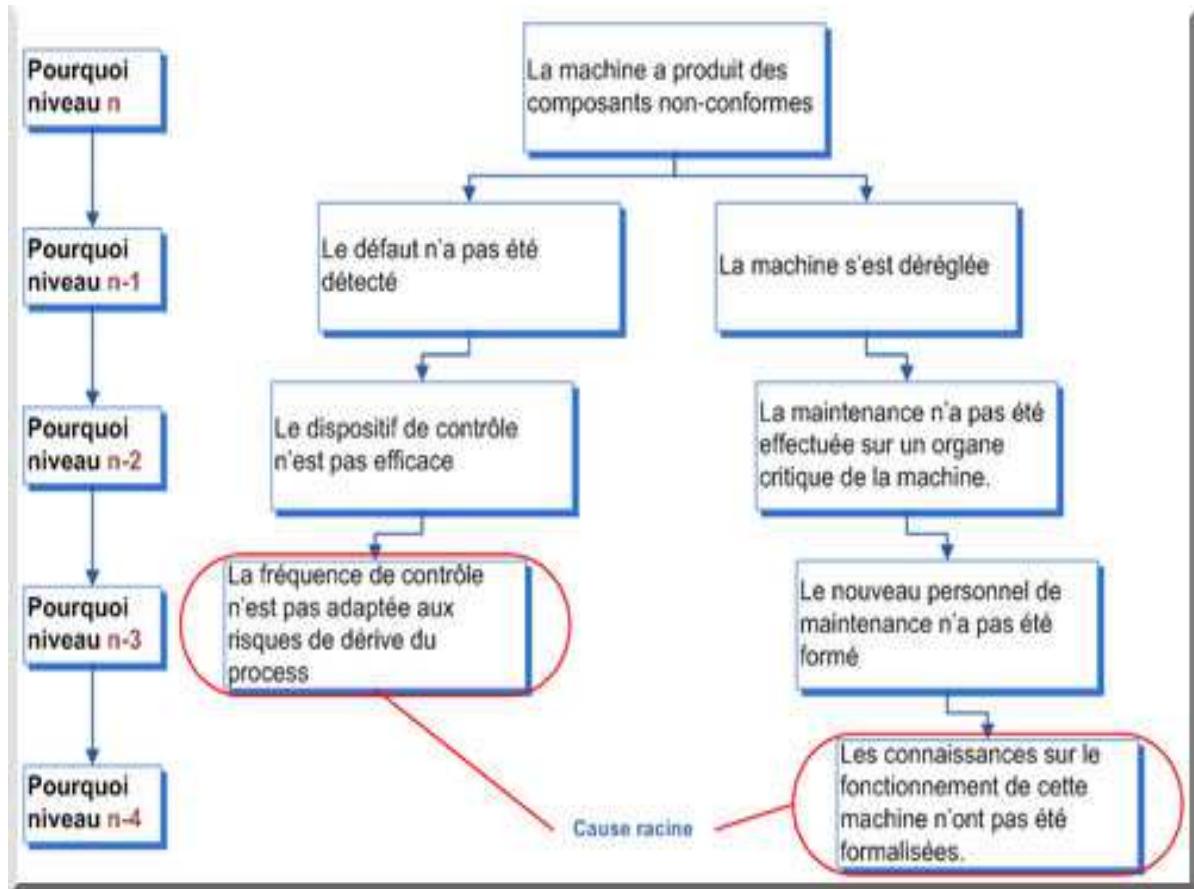


Figure 5. Recherche des causes racine

Dans cet exemple, on retrouve toutes les causes possibles, on fait ressortir les causes probables et l'outil des 5 pourquoi permet de ressortir quelles sont les causes racines.

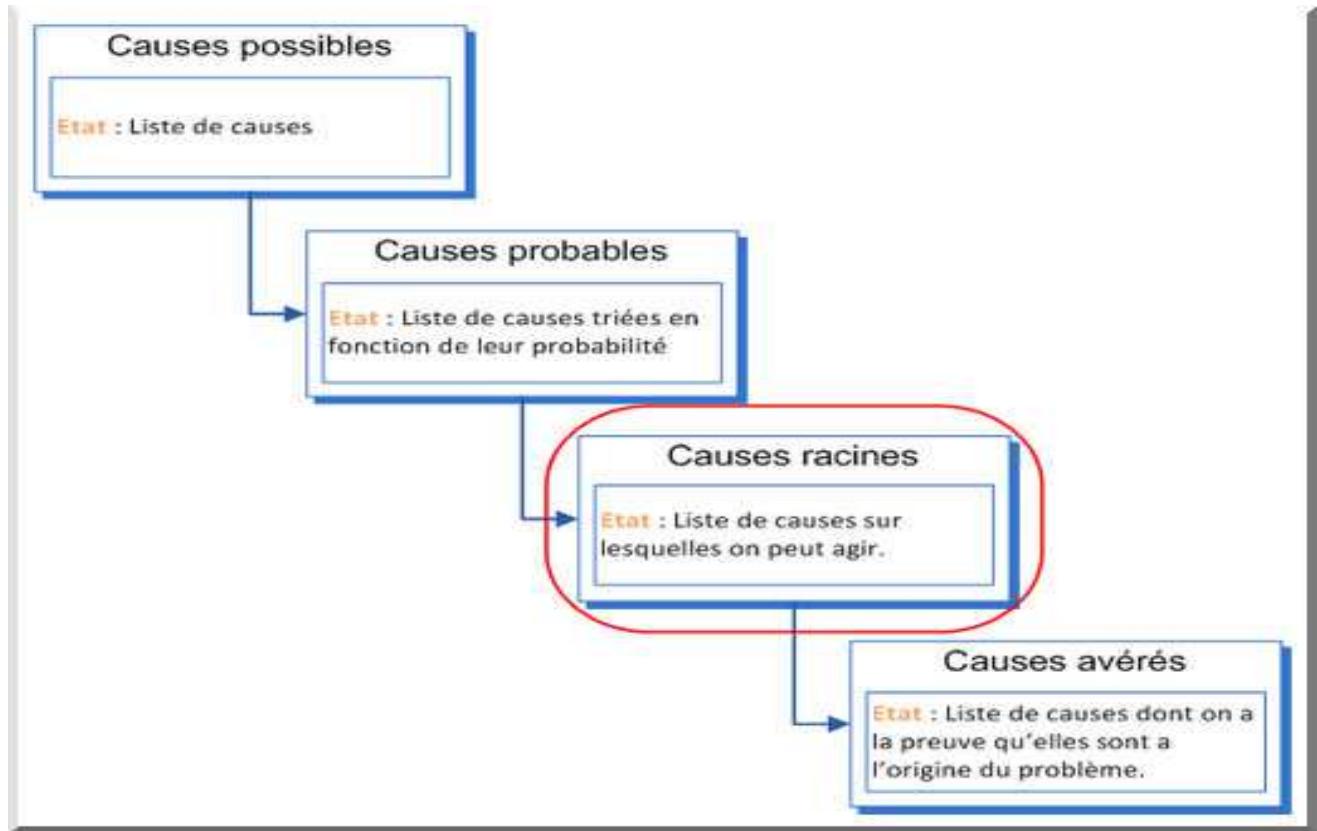


Figure 6.Liste des causes

Le SMQ est un macro-processus constitué de plusieurs composantes (principes, processus et outils). Sa réussite dans une entreprise dépend de l'approche méthodologique utilisée lors de la mise en place, celle-ci n'étant pas générique, mais dépend de la spécificité de chaque structure.

V Les différentes étapes pour la mise en place de la qualité

V.1. La méthodologie TOP-DOWN

La mise en place d'un système de management de la qualité est un projet de la direction, elle commence donc par un engagement clair de la direction vis-à-vis du projet. Le point de départ étant la vision de l'entreprise en prenant en compte les exigences réglementaires, normatives et l'écoute client.

La direction par la suite définit une politique qualité qui sera déclinée en objectifs qualité.

Cette méthodologie exige une certaine expérience de la part de l'encadrement, de la direction et du responsable qualité, à moins d'être accompagné par un qualiticien expérimenté.

V.2. La méthodologie DOWN-TOP

La méthodologie se fait dans les sens inverse de la première, le point de départ est de travailler avec les opérationnels en décrivant les activités à travers des procédures et des modes opératoires. Cette méthode a l'avantage de mobiliser et d'impliquer très tôt les acteurs ayant une incidence sur la satisfaction du client.

L'inconvénient dans cette méthodologie est de résumer le système de management de la qualité à un système documentaire.

Une méthode intermédiaire consiste à commencer avec l'encadrement par l'approche processus qui a l'avantage par sa transversalité de rompre avec la traditionnelle organisation verticale en services, départements ou secteurs.

V.3. Mise en œuvre de l'approche processus

La première étape consiste à sensibiliser et former le personnel à l'approche processus ainsi qu'aux outils utilisés dans le management de la qualité.

La deuxième étape consiste à :

- ✓ Déterminer les processus nécessaires au système de management de la qualité et leur application dans l'entreprise.
- ✓ Déterminer pour chaque processus un nom, une finalité, les données d'entrée, les activités principales, les données de sortie.
- ✓ Déterminer les séquences des processus et les interactions entre processus par une cartographie.
- ✓ Déterminer les critères et les méthodes pour assurer la maîtrise des processus (objectifs, indicateurs, valeurs cibles etc.)
- ✓ Mettre en place les procédures exigées par le règlement, les normes et nécessaires au bon fonctionnement du système de management de la qualité. Ces procédures qui sont des exigences internes et externes vont introduire les notions de non-conformité, de réclamations client, d'actions correctives, actions préventives, actions d'amélioration, d'audit qualité etc.
- ✓ Déterminer les ressources et les informations nécessaires au bon fonctionnement du processus.
- ✓ Valider les processus par formalisation et nommer les pilotes pour chaque processus.
- ✓ Faire fonctionner les processus par les pilotes afin de valider les indicateurs mises en place et enregistrer les premières non-conformités, actions préventives et correctives

- ✓ Surveiller, mesurer et analyser les processus et mettre en œuvre les actions nécessaires pour atteindre les objectifs et améliorer continuellement.

Toute activité de l'entreprise doit être réalisée dans un processus ainsi on va s'appuyer sur tous les processus pour satisfaire aux exigences des référentiels choisis.

V.4. Les familles des processus

Les processus sont regroupés en trois familles : les processus opérationnels, les processus support et les processus de pilotage.

V.4.1. Processus opérationnels ou de réalisation ou orientés client

Ils contribuent directement à la réalisation du produit ou service, il commence depuis l'expression du besoin par le client jusqu'à sa satisfaction. Ces processus constituent le cœur du métier de l'entreprise.

Exemple : Processus préanalytique, Processus analytique, Processus post-analytique, Processus de communication avec les utilisateurs du laboratoire etc.

V.4.2. Processus support ou de soutien

Ils contribuent au bon fonctionnement des autres processus en leur apportant les ressources nécessaires.

Exemples : Métrologie, Approvisionnement, Ressources Humaines, Maintenance, Hygiène et Sécurité, Ressources Financières etc.

V.4.3. Processus de pilotage ou de management ou de direction

Ils contribuent à la détermination de la stratégie de la politique qualité et au déploiement des objectifs à travers tous les processus de l'entreprise. Ils permettent leur pilotage et la mise en œuvre des actions d'amélioration.

V.5. Le management d'un processus

Le processus est managé par un responsable appelé pilote du processus dont les responsabilités doivent être clairement définies pour un meilleur fonctionnement du processus. Il doit disposer de l'autorité, de la compétence et des moyens nécessaires pour :

- ✓ vérifier le fonctionnement du processus et la bonne utilisation des ressources allouées
- ✓ suivre les indicateurs qualité du processus
- ✓ démontrer à tout moment que les objectifs qualité sont atteints
- ✓ proposer des décisions afin d'apporter des corrections sur des dysfonctionnements constatés
- ✓ proposer des actions d'amélioration
- ✓ s'assurer de la mise en œuvre des actions décidées et vérifier leur efficacité.

Le pilote doit être doué d'un pragmatisme, ces décisions doivent être prises en concertation avec les acteurs du processus.

Les résultats du processus doivent être perceptibles par tous et s'inscrivent dans le cadre de l'amélioration continue

V.6. La cartographie des processus

La cartographie permet de donner une vue globale du fonctionnement de l'entreprise en visualisant l'entreprise et son fonctionnement.

La cartographie permet une meilleure compréhension du fonctionnement par le personnel, elle facilite le pilotage global, l'intégration des nouveaux collaborateurs et met en évidence la finalité des activités.

Pour des structures plus complexes la cartographie ne peut décrire toutes les interactions, chaque processus est alors formalisé sous forme de fiche de processus avec toutes les caractéristiques du processus : intitulé, finalité, données d'entrée, activités du processus, données de sortie, les interactions, les objectifs, les indicateurs, les valeurs cibles etc.

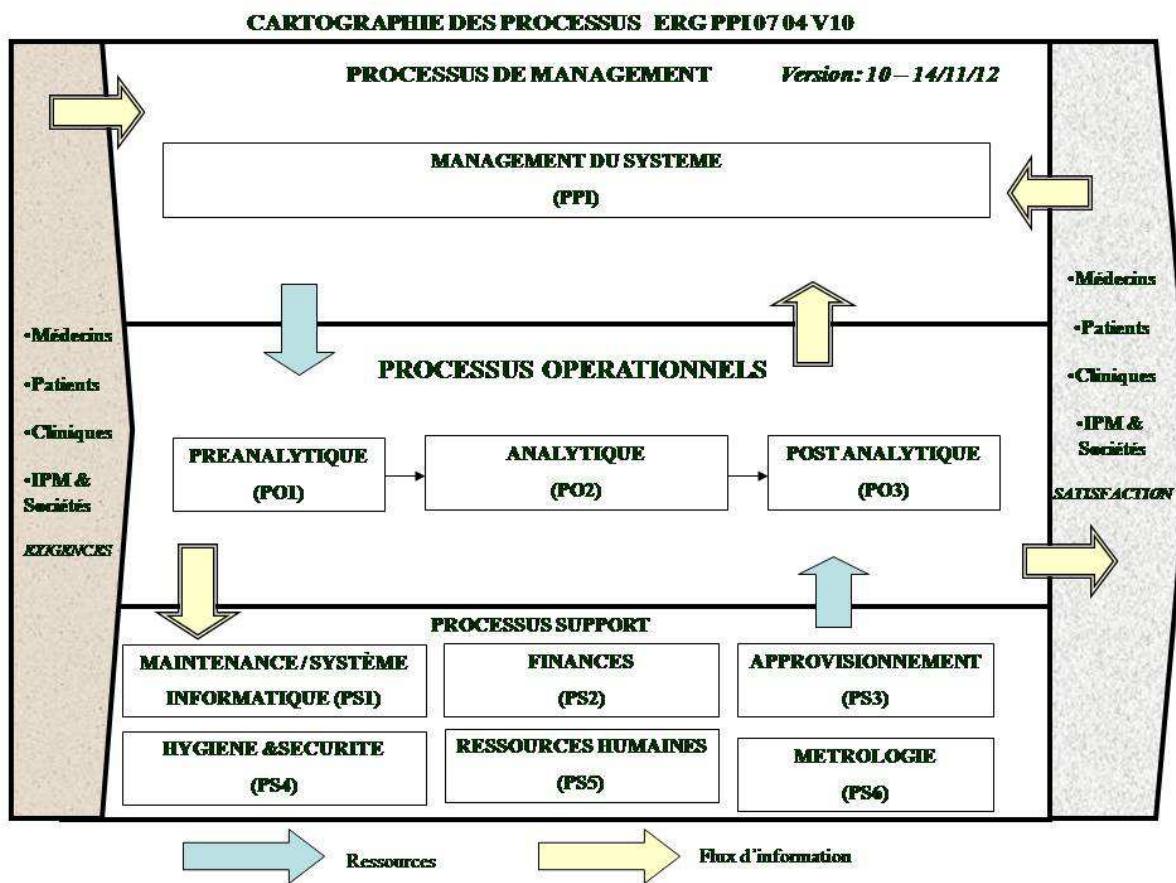
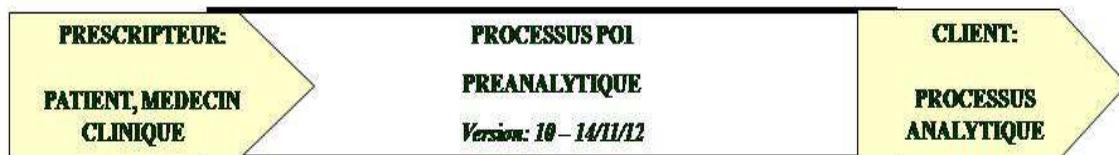


Figure 7. Cartographie des processus d'un LBM (<http://www.labobio24.sn>)



PILOTE: SECRETAIRE

FINALITE: Assurer en continu une bonne prise en charge du patient avec un contrat conforme aux exigences du client et aux offres du laboratoire et fournir des échantillons conformes aux secteurs analytiques.

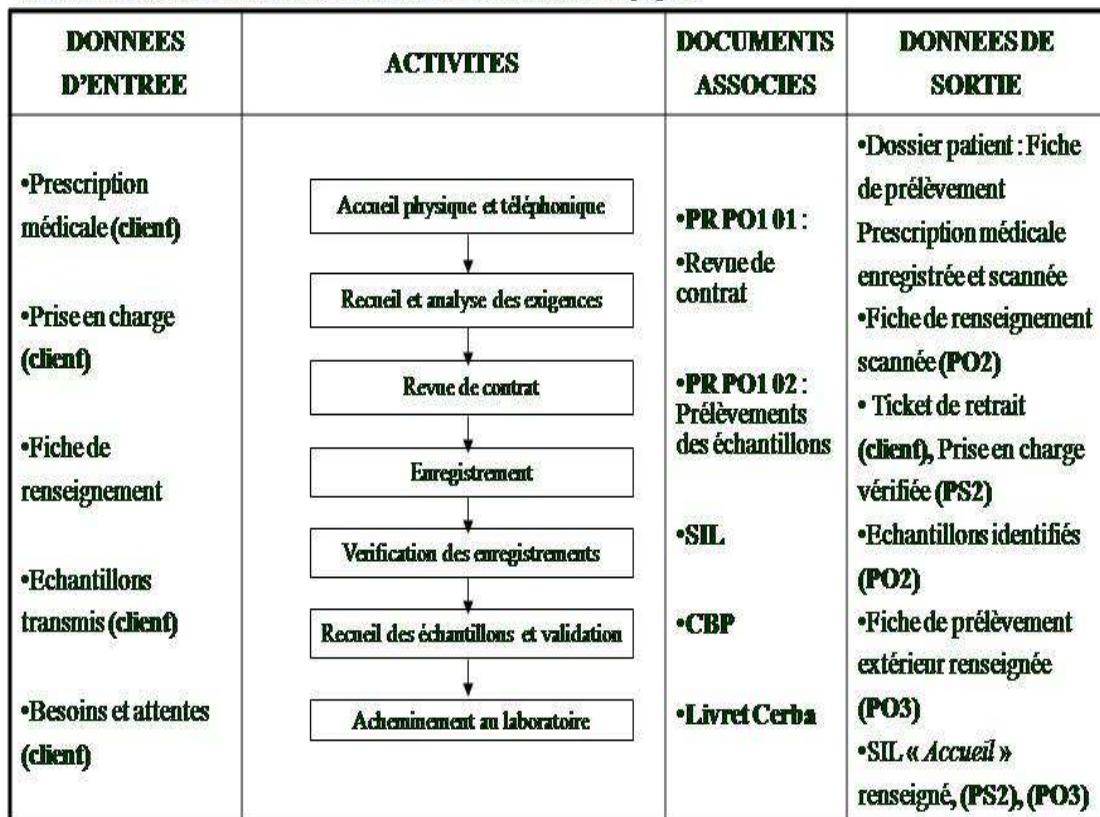


Figure 8.Fiche d'un processus AZSs opérationnel (Préanalytique) (<http://www.labobio24.sn>)

VI Analyse des prélèvements microbiologiques au laboratoire

Les analyses de microbiologie sont faites dans un but d'aider au diagnostic, au traitement et à la prévention des maladies infectieuses.

L'analyse biologique est constituée de trois phases comme décrites dans certains Guides de Bonnes Pratiques (GBEA) : la phase préanalytique, la phase analytique et la phase post-analytique.

L'exécution des ces phases met en jeu plusieurs fonctions à savoir médecin, préleur, technicien biologiste, biologiste qui doivent communiquer pour une meilleure prise en charge du patient.

Tous les actes au cours de ces phases doivent être tracés pour permettre de retrouver *a posteriori* les auteurs en cas de dysfonctionnement.

VI.1. La phase préanalytique

La diversité des échantillons cliniques en microbiologie confère à la phase préanalytique une complexité particulière qui doit être maîtrisée par tous les acteurs.

La phase préanalytique comprend : la prescription, les informations cliniques, thérapeutiques et épidémiologiques liées au patient, le mode de recueil de l'échantillon, les conditions de transport, les conditions de conservation préanalytique.

VI.1.1 La prescription

La prescription est rédigée par le médecin en général ou par un autre acteur de la composante médicale. Du fait de la complexité du plateau technique du laboratoire, le prescripteur peut souvent avoir besoin du support d'un biologiste pour le choix sur les tests, leurs indications et limites ainsi que leur fréquence (30, 34, 116).

La prescription est en général rédigée dans le but d'un isolement et de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques.

Dans les cas particuliers, la prescription doit préciser le type de recherche : portage de bactérie multi-résistante en vue d'une prévention, recherche de l'équilibre d'une flore, portage asymptomatique de bactéries opportuniste etc.

La prescription doit comporter :

- ✓ Le nom et la qualité du prescripteur ainsi que les coordonnées permettant de le contacter.
- ✓ Le nom, prénom, date de naissance du patient, localisation pour le patient hospitalisé (service, numéro du lit) etc. **(118)**
- ✓ Le diagnostic étiologique de l'infection
- ✓ L'information sur un éventuel traitement en cours
- ✓ Le but de l'examen pour les cas particulier (diagnostic, recherche d'une colonisation)
- ✓ Le site et la nature du produit pathologique
- ✓ La recherche éventuelle d'un micro-organisme particulier

VI.1.2 Le prélèvement

Le prélèvement est un acte clé de la phase préanalytique et peut être exécuté par divers professionnels de santé habilité. La qualité du prélèvement ayant une influence considérable sur le résultat, il est impératif que le recueil de l'échantillon soit fait dans les règles de l'art. Le biologiste est donc responsable du prélèvement qu'il soit transmis ou collecté par le laboratoire. Les écarts entre les conditions préanalytiques et le recueil d'un échantillon doivent être signalés et tracés afin de porter des réserves sur le résultat obtenu surtout lorsqu'il s'agit d'un prélèvement précieux comme Liquide Céphalo-Rachidien (LCR), liquide de ponction, pièce opératoire etc.) **(73)**.

L'échantillon doit porter un nom, prénom, date de naissance, nature de l'échantillon, date et heure de prélèvement.

Il doit être en quantité suffisante pour être représentatif du tissu contaminé et pour permettre son examen direct et sa mise en culture.

Il doit être recueilli de façon à ne pas ramener les germes commensaux ou à être contaminé par les germes de l'environnement lors du recueil.

Son délai d'acheminement doit tenir compte de la fragilité des germes à rechercher.

Lorsque la présence des germes est intermittente sur le site de prélèvement, la répétition des prélèvements est recommandée

VI.1.3 La conservation et transport

La situation idéale est l'acheminement de l'échantillon aussitôt après collection, lorsque cela n'est pas faisable, l'échantillon doit être transporté ou conservé en tenant compte de la préservation des germes et de la prolifération des contaminants qui se fait à une vitesse plus grande que les germes pathogènes. Les germes les plus fragiles supportent un délai inférieur à une heure, au-delà, l'utilisation des milieux de transport est recommandée ou lorsque possible l'échantillon est conservé à des températures compatibles à la physiologie des germes potentiellement responsables de l'infection.

VI.1.4 Le rebut des prélèvements inappropriés

Le biologiste est le seul responsable du prélèvement même si le recueil n'a pas été effectué par le laboratoire, il doit donc définir les règles de rebut des échantillons. Dans certaines situations un prélèvement peut être accepté en dépit d'un écart avéré du fait de la difficulté d'obtention de l'échantillon (méthode invasive), pronostic vital du patient engagé ou d'une thérapie déjà instaurée. Ces échantillons seront ainsi acceptés par le biologiste avec des réserves portées dans le compte rendu.

VI.2 La phase analytique

C'est la réalisation des analyses selon les procédures préalablement définies. La méthodologie varie en fonction du produit pathologique et de la bactérie recherchée.

L'analyse proprement dite comporte :

- ✓ une observation macroscopique pouvant dans certain cas orienter le diagnostic
- ✓ un examen microscopique direct pouvant aidant dans certains cas au choix des milieux
- ✓ la mise en culture orientée ou à spectre large couvrant un grand nombre de germes
- ✓ en cas d'infection l'isolement et l'identification du germe
- ✓ tests de sensibilité aux antibiotiques

VI.2.1. L'identification bactérienne

Malgré une automatisation de plus en plus utilisée, certaines étapes demeurent indispensables en bactériologie et servent de tests d'orientation.

- ✓ L'examen macroscopique de la colonie : taille, pigment texture, consistance etc.
- ✓ L'examen microscopique : morphologie, mode de groupement, mobilité, coloration de Gram etc.
- ✓ Caractères culturaux : délai de croissance, atmosphère de croissance, exigences nutritives, culture sur milieux sélectifs

A ce niveau, un diagnostic d'orientation de famille ou du genre est déjà perceptible et peut déjà servir au prescripteur pour une prise en charge en cas d'infection grave (57, 62).

Certains caractères biochimiques disponibles sur les milieux d'isolement, électifs ou sélectifs peuvent être utilisés pour confirmer cette orientation vers un groupe précis

D'autres tests d'orientation comme l'oxydase, la catalase font avancer l'orientation du diagnostic.

A partir de cette étape l'identification peut être compléter par une galerie biochimie complète aboutissant à une identification complète d'espèce ou nécessitant quelques caractères complémentaires.

Certaines méthodes permettent une identification rapide du germe par :

- ✓ La recherche directe des composés bactériens de surface par sérotypie ou à l'aide des tests immuno-chromatographiques (13, 80)
- ✓ Par la recherche d'un fragment du génome bactérien par PCR (89)
- ✓ Par un profile de composés chimiques des constituants bactériens (15, 101)

VI.2.2. La sensibilité aux antibiotiques

La décision de réaliser ou non un antibiogramme dépend du germe et du type d'infection ou de la lésion (59).

Les méthodes sont nombreuses avec leurs avantages et inconvénients, la plus accessible et recommandée par l'OMS pour sa simplicité et son coût bas est la méthode de diffusion de Kirby Bauer. (59)

Le choix des antibiotiques varie en fonction du germe isolé, du site de l'infection (pharmacocinétique) et de l'état physiologique du patient. (59)

VI.3 La phase post-analytique

C'est la résultante de toutes les phases précédentes et elle est sous la responsabilité directe du biologiste

La phase post-analytique est constituée :

- ✓ de la validation technique et biologique par les techniciens au niveau des paillasses et des biologistes. Elles tiennent compte de la maîtrise du couple réactif/équipement ou réactif/méthode, des données cliniques du patient.
- ✓ des interprétations varient en fonction des patients, elles peuvent être codifiées pour les cas les plus couramment rencontrés
- ✓ des conseils qui peuvent être adressés au médecin ou aux patients suite à l'observation des valeurs critiques ou à des examens complémentaires
- ✓ conservations des données des patients par des sauvegardes informatiques et la gestion des enregistrements techniques. (90).

En bactériologie, les analyses se font soit à l'aide d'un automate soit en méthode manuelle.

Quel que soit la méthode utilisée, ces analyses doivent être validées avant leur utilisation dans un LBM. Cette validation se fait conformément aux recommandations de certaines sociétés savantes (95, 105).

VII VALIDATION DES METHODES (105, 106)

Le COFRAC distingue deux types de flexibilité :

On parle de portée flexible A lorsque le LBM utilise une méthode telle que recommandée par le fournisseur. La méthode est dite adoptée, avec uniquement une vérification de performances sur site,

On parle de portée flexible B lorsque la méthode du fournisseur est adaptée ou lorsqu'une méthode est développée en interne (conception) avec une validation de méthode.

Schématiquement, on distingue deux types de méthodes d'examen : quantitative et qualitative

Les méthodes quantitatives fournissent un résultat chiffré, sur une échelle continue à partir de la mesure d'un signal en relation directe avec une quantité (analyte, molécule, substance, cellule ou organisme etc.) ou une activité donnée de l'analyte (enzymes).

Les méthodes qualitatives n'apportent pas d'information sur la quantité de l'analyte (cellule ou organisme), mais seulement sur sa présence ou son absence (positif/négatif), ou l'identification de la caractéristique recherchée. On peut classer dans cette catégorie tous les examens où aucune mesure d'une donnée quantifiable ne peut être déterminée et ceux dont le résultat est obtenu par l'observation de la réaction, par comparaison avec des témoins positif et négatif.

La plupart des analyses en bactériologie sont de type qualitatif

VII.1. Vérification sur site d'une méthode de type qualitatif

Dans les méthodes de type qualitatif en bactériologie, la difficulté réside en l'obtention des échantillons positifs ou négatifs en nombre suffisant pour vérifier la spécificité et la sensibilité diagnostique d'une méthode.

Dans ces conditions, la vérification peut se limiter à une vérification bibliographique ou aux résultats obtenus suite aux EEQ, à l'évaluation des risques ou à la qualification du personnel.

Un dossier de validation de la méthode sera conçu sous forme d'enregistrement et contiendra au minimum les éléments suivants :

- ✓ La contamination entre échantillon s'il y a lieu
- ✓ Stabilité des réactifs après ouverture (données du fournisseur)
- ✓ Comparaison avec une méthode déjà disponible au laboratoire
- ✓ La sensibilité et la spécificité peuvent être étudiées si de tels échantillons sont disponibles (CIQ des coffrets) ou la participation aux EEQ.

VII.2. Maîtrise de la qualité d'un examen de type qualitatif

La maîtrise de la qualité d'un examen de type qualitatif nécessite la mise en œuvre de moyens divers, autres que les CIQ et les EEQ, on distingue :

- ✓ Maîtrise de la qualification/habilitation et maintien continu des compétences du personnel
- ✓ Maîtrise des conditions environnementales
- ✓ Maîtrise continue des équipements
- ✓ Maîtrise de l'échantillon primaire
- ✓ Maîtrise de la qualité des réactifs
- ✓ Maîtrise des méthodes de travail utilisée
- ✓ Planification des CIQ et EEQ si disponibles
- ✓ Suivi des performances de la méthode
- ✓ Amélioration continue



DEUXIÈME

PARTIE :

TRAVAIL PERSONNEL

Justification de l'étude

Le management de la qualité jadis concerné en majorité par le domaine industriel gagne de plus en plus le domaine de la santé et en particulier le laboratoire.

La contribution aux soins apportés aux patients exige une qualité pérenne et une amélioration continue des prestations d'où l'importance de la mise en place d'outils permettant d'atteindre ces objectifs et d'assurer la qualité des prestations.

En tant que laboratoire accrédité, BIO 24 se doit à intervalle de temps régulier d'élargir la portée d'accréditation afin de couvrir le maximum de ses activités par l'accréditation.

Les prochaines étapes consistent à élargir la diversité de la portée d'accréditation à la famille de la bactériologie

Objectifs

L'objectif général de cette étude est d'élargir la portée d'accréditation du laboratoire BIO 24 à la famille de la bactériologie en validant les méthodes utilisées dans l'unité de microbiologie.

Les objectifs spécifiques sont :

- ✓ Recueillir des exigences supplémentaires applicables en bactériologies contenues dans les référentiels choisis.
- ✓ Vérifier conformément aux recommandations du COFRAC les performances des trois automates: BacT/ALERT™, COBAS TaqMan™ et VITEK 2 Compact™.
- ✓ Vérifier les performances des sérum d'agglutination utilisés pour l'identification
- ✓ Evaluer les points critiques et proposer les dispositions de maîtrise à mettre en place suite à l'analyse des risques par une combinaison des outils dont l'AMDEC et le diagramme des causes et effets de ISHIKAWA.

Cadre de l'étude

BIO 24 est un laboratoire de biologie médicale polyvalent situé au 13 bis, rue Saint Michel. Il a été créé le 03/01/1994 par un médecin biologiste sénégalais qui en assure la direction.

De forme individuelle, le laboratoire est devenu Société Anonyme en juin 2001.

Il intervient dans la réalisation d'analyses médicales. Il fonctionne en permanence 24 heures sur 24 et 07 jours sur 07. Pour ce faire, il utilise une soixantaine d'agents répartis entre personnel technique et personnel administratif.

Le personnel technique est constitué de :

- ✓ 16 Techniciens biologistes de jour qui constituent le cœur du métier et qui sont chargés de réaliser les analyses
- ✓ 08 infirmiers et préleveurs qui interviennent aussi bien localement qu'en dehors du laboratoire.
- ✓ 07 Techniciennes de surface qui assurent la propreté et l'hygiène des lieux.

Tous ces agents sont placés sous la supervision d'une technicienne Major.

Pour assurer la continuité du service de jour comme de nuit, une rotation des techniciens est assurée. Ceux-ci sont placés sous la tutelle du biologiste assistant.

Le Major est placé sous la supervision des biologistes assistant. et ces derniers au nombre de 04 sont sous la tutelle directe du Directeur.

Le programme qualité est géré par un responsable du management de la qualité (biologiste).

Sur le plan administratif, le Directeur est assisté par :

- ✓ 01 Responsable des ressources humaines chargé de définir la politique en la matière, il a sous son autorité :
 - ❖ Les Agents Administratifs chargés du dépôt des résultats, de la récupération des échantillons et de diverses courses relatives au bon fonctionnement du laboratoire.

- ❖ Les Secrétaires Administratifs et Comptables chargés de la facturation, du recouvrement et de la gestion des prélèvements extérieurs
- ✓ 01 Chef Comptable qui supervise et coordonne le service «Comptabilité» composé d'un Comptable et d'un Assistant Comptable : activité externalisée dans les premières années d'exploitation, le développement du laboratoire a conduit à tenir une comptabilité interne et en temps réel
- ✓ 01 Responsable du pool des secrétaires qui gère le secrétariat médical chargé de l'accueil des patients et du traitement de leur dossier.
- ✓ 01 Ingénieur biomédical chargé de la gestion des équipements. Il est assisté par un Technicien biomédical.
- ✓ 01 Contrôleur de Gestion chargé de veiller à l'efficience de la gestion

Le laboratoire s'est engagé dans une démarche qualité depuis 1999 et avait obtenu sa première certification ISO 9002 version 1994 en décembre 2001, la certification ISO 9001 version 2000 en novembre 2003 et la certification ISO 9001 version 2008 en 2009.

La démarche sur l'accréditation conformément à la norme ISO 15189 fut entamée en 2005 et l'accréditation par le COFRAC fut obtenue en mars 2012.

METHODOLOGIE

I Exigences applicables

La mise en place des bonnes pratiques de laboratoire est basée sur des exigences contenues dans un référentiel, guide technique ou autre documents choisis par le laboratoire et considérés comme référentiel.

Les documents de référence choisis pour la recherche des exigences sont :

- ✓ La norme ISO 9001 : 2008
- ✓ La norme ISO 15189 : 2012
- ✓ Le Référentiel de Microbiologie Médicale (REMIC)
- ✓ Comité Qualité de la Société Française de Microbiologie (QUAMIC)
- ✓ European Manual of Clinical Microbiology
- ✓ Guide de Bonne Exécution des Analyses (GBEA)
- ✓ Microbiology Check List CAP Accreditation Program

Une revue des exigences contenues dans ces documents a été faite dans le but de compléter celles existant et de les mettre en application dans la pratique quotidienne du LBM BIO 24.

Ces exigences ont concerné les phases Préanalytique, Analytique et Post-analytique ainsi que les processus support ayant un impact sur la qualité des résultats :

- ✓ Recueil des échantillons, transport et conservation
- ✓ Analyse ou traitement des produits pathologiques
- ✓ Isolement et identification des micro-organismes
- ✓ Tests de sensibilité aux antibiotiques
- ✓ Maintenance des équipements et autre matériel
- ✓ Compétence de personnel
- ✓ Approvisionnement de réactifs
- ✓ Gestion de la documentation
- ✓ Environnement de travail

II. Vérification des performances des méthodes automatisée

Trois automates étaient concernés par cette validation

BacT/ALERTTM de BioMérieux pour les hémocultures

COBASTaqManTM de ROCHE DIAGNOSTIC pour la PCR de *Chlamydia trachomatis*

VITEK 2 CompactTM de BioMérieux pour identification et tests de sensibilité aux antibiotiques.

II.1. BacT/ALERT



Figure 9. Automate BacT/ALERTTM (www.biomerieux-usa.com)

II.1.1. Principe de la méthode

BacT/ALERT est un système de détection de la culture microbienne dans des échantillons de sang ou autres liquides biologiques (ascite, pleural, articulaire etc.). Les flacons sont constitués d'un milieu de culture qui offre des conditions optimales aux micro-organismes habituellement rencontrés dans ces produits pathologiques. Le flacon inoculé est placé dans l'instrument et suivi en continu pour détecter la présence de germes.

La détection est basée sur une méthode colorimétrique. Le substrat inclus dans le milieu est métabolisé et produit du CO₂ dissous dans le milieu traverse la membrane qui recouvre le détecteur, celui-ci change de couleur en passant du bleu-vert au jaune. La couleur jaune augmente les unités de réflectance et l'automate détecte le flacon comme positif.



Figure 10.Flacons aérobie et anaérobie et pédiatriques positif et négatif du BacT/ALERT (www.biomerieux-usa.com)

II.1.2. Matériaux

Automate BacT/ALERTTM

Souches bactériennes

Micropipettes

Densitomètre DensiChekTM

Flacons hémoculture : aérobie et anaérobie

Incubateur de bactériologie

II.1.3. Méthode

Les souches utilisées sont les souches de référence : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC BAA1744, *Klebsiella oxytoca* ATCC 700324, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 24212.

A partir d'une culture âgée de 18 à 24 h, un inoculum de 0,5 McFarland soit 10^8 UFC/mL a été préparée puis diluée en cascade afin d'obtenir une suspension de 10 UFC/mL.

Pour chaque souche, 1 mL de cette suspension a été inoculée sur deux flacons aérobies et deux flacons anaérobies à l'aide d'une seringue. Un exemplaire de chaque flacon a été ensemencé dans BacT/ALERT et dans l'étuve.

Après positivité de BacT/ALERT, le ballon de l'étuve a été observé au microscope. Les ballons ont été repiqués puis identifiés pour comparaison.

II.2. Cobas TaqMan™ CT v2.0

II.2.1. Principe de la méthode

Le test COBASTaqMan™ CT v2.0 repose sur deux procédures majeures :

La préparation manuelle de l'échantillon pour obtenir de l'ADN de *Chlamydia trachomatis*

L'amplification par PCR simultanée d'ADN cible à l'aide d'amorces complémentaires spécifiques de CT et la détection des amplicons de CT et de l'ADN contrôle interne qui est amplifié et détecté simultanément avec l'échantillon.

Le mélange réactionnel contient deux paires d'amorces et des sondes spécifiques d'un plasmide cryptique de CT, de l'ADN chromosomique du gène *ompA* de CT et de l'ADN du contrôle interne de CT.

La détection des amplicons utilise la technologie PCR en temps réel. Les sondes sont doublement marquées avec un fluorophore et un inhibiteur de la fluorescence. Les sondes du plasmide et du gène *ompA* ont le même fluorophore tandis que celui du contrôle interne CT a un fluorophore différent.

Lorsque la sonde n'est pas hybridée, la fluorescence est inhibée suite aux effets de transfert d'énergie. Par contre lorsque la sonde est hybridée à sa cible, l'inhibition de la fluorescence est levée par clivage de l'inhibiteur à l'aide de l'activité nucléasique 5' → 3' de l'ADN polymérase thermostable.

La détection se fait donc en temps réel au fur et à mesure que l'amplification se poursuit.

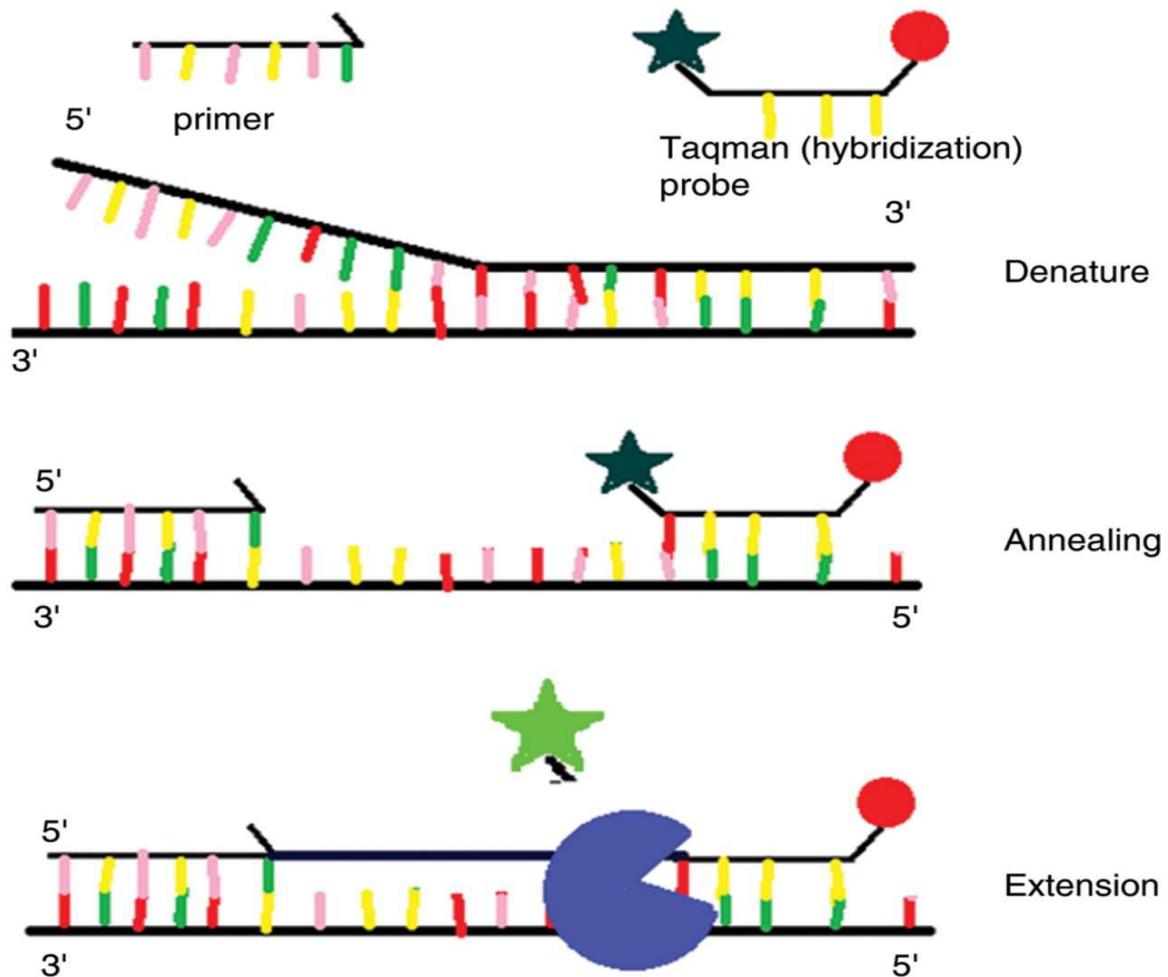


Figure 11. Principe du COBAS TaqMan (molecular.roche.com)

II.2.2. Matériaux

L'automate COBAS TaqMan (Roche Diagnostic)

AMPLICOR CT/NG Specimen Preparation Kit

- ✓ tampon de lyse,
- ✓ diluant d'échantillon

COBAS TaqMan CT Test, v2.0

- ✓ Contrôle interne avec 8 copies/ μ L d'ADN plasmidique non infectieux
- ✓ Contrôle positif
- ✓ Contrôle négatif

Réactifs d'amplification et de détection

- ✓ Master Mix
- ✓ Tampon Mn²⁺

Tubes K pour l'amplification, Portoir de tube K

Tube d'extraction Sarstedt, Portoir de tube Sarstedt

Mixeur type vortex

Micropipettes : 50, 100, 200, Embouts à filtre

Milieu de transport M4RT®



Figure 12. Réactifs COBAS TaqManTM CT v2.0 (molecular.roche.com)



Figure 13. Appareil COBAS TaqMan™ (molecular.roche.com)

II.2.3. Méthode

La vérification a été faite conformément aux recommandations du COFRAC (105)

Une répétabilité en utilisant le même coffret avec 24 passages d'un échantillon clinique positif

Une répétabilité en utilisant le même coffret avec 24 passages d'un échantillon clinique négatif

Une reproductibilité 30 valeurs de chaque contrôle du coffret (contrôle positif et négatif) dans plusieurs séries de passage des échantillons cliniques et avec des lots de réactif d'extraction et d'amplification différents.

Etude de la contamination pendant l'extraction en alternant 12 échantillons positifs de 12 échantillons négatifs.

Une Evaluation Externe de la Qualité (EEQ) avec les échantillons du Centre Toulousain de Contrôle en Biologie (CTCB)

L'extraction de l'ADN a été effectuée conformément aux recommandations du fournisseur de la manière suivante :

Recueillir l'échantillon par écouvillonnage cervical sous speculum. L'écouvillon est déchargé dans le milieu de transport par vortexage.

Transférer 100 µL de cette suspension dans un tube Sarstedt

Ajouter 100 µL de tampon de lyse et vortexer

Laisser agir pendant 10 min

Neutraliser avec 200 µL de diluant et vortexer

Laisser agir pendant 10 min, l'extraction est prête pour l'amplification.

Préparation du mélange réactionnel

Vortexer vigoureusement le contrôle interne et le tampon Mn²⁺

Ajouter dans le Master Mix avec 50 µL de contrôle interne et 150 µL de tampon Mn²⁺

Mélanger 10 fois par retournement, ***ne jamais vortexer.***

Distribuer 50 µL du mélange réactionnel dans les tubes K

Distribuer 50 µL de l'extrait d'ADN

Placer le portoir K dans l'amplificateur dans les 90 min et lancer le cycle d'amplification qui dure environ 2h 30 min.

II.3. VITEK 2 Compact

II.3.1. Principe de la méthode

Le principe de lecture des cartes d'identification est basée la méthode colorimétrique.

Le principe de lecture des cartes AST est basé sur une méthode néphélimétrique avec un rapport entre l'absorbance d'un puits avec antibiotique et d'un puits témoin sans antibiotique. Le résultat de ce rapport permet de donner les catégories cliniques S, I et R. Il s'ajoute le système expert qui modifie les résultats en fonction des phénotypes de l'identification et de phénotype de résistances observés.

Le support des réactions est une cassette munie de cupules contenant des antibiotiques ou des substrats chromogènes ou non chromogènes.

II.3.2. Matériel

Automate VITEK 2 Compact, Densitomètre (DensiChek™ Plus)

Micropipettes, Embouts stériles

Solution saline stérile BioMérieux

Carte GN : identification des bacilles à Gram négatif

Carte GP: identification des cocci à Gram positif

Carte AST-N235 : sensibilité aux antibiotiques bacilles à Gram négatif d'isolats urinaires

Carte AST-N233 : sensibilité aux antibiotiques bacilles à Gram négatif d'isolats non urinaires

Carte AST-N222 : sensibilité aux antibiotiques bacilles à Gram négatif non fermentant

Carte AST-P580 sensibilité aux antibiotiques *Staphylococcus aureus*

Carte AST-P592 sensibilité aux antibiotiques *Streptococcus* et *Enterococcus*

Carte AST-P576 sensibilité aux antibiotiques *Streptococcus pneumoniae*

Carte AST-XNO5 : sensibilité des Bacilles Multi-Résistants (BMR)

Portoir VITEK 2, Tubes de dilution et de préparation d'inoculum fournis par BioMérieux

Souches bactériennes

Disques d'antibiotique et applicateur de disques



Figure 14. Automate VITEK 2 Compact et carte d'identification (www.biomerieux-usa.com)

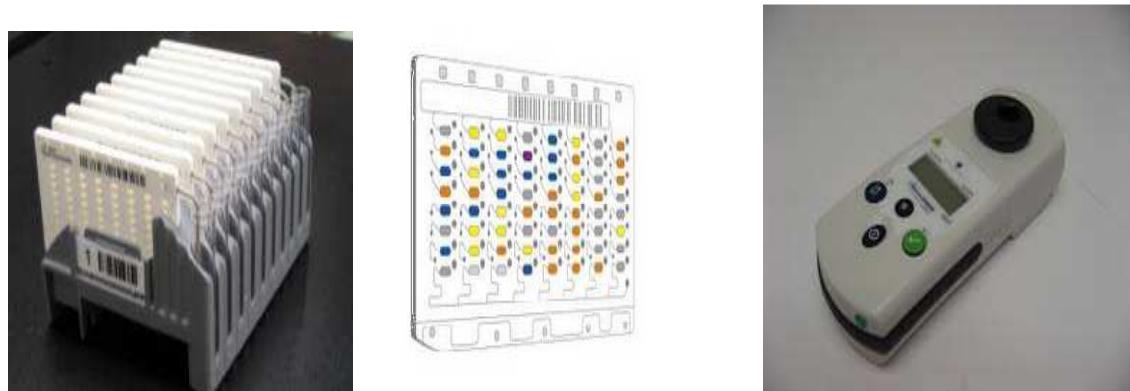


Figure 15. Carte AST sur portoir, carte identification VITEK 2 Compact et DensiChek Plus (www.biomerieux-usa.com)

II.3.3. Méthode

Pour l'identification, les souches choisies sont *Proteus vulgaris* ATCC 6380, *Klebsiella oxytoca* ATCC 700324, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC BAA 750.

Pour la sensibilité les souches choisies sont *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 24212.

Pour la répétabilité, ces souches ont été analysées 15 fois dans la même série avec les cartes d'un même coffret.

Pour la reproductibilité, les souches seront analysées dans des séries différentes avec des lots de réactifs différents.

Les isolats des EEQ fournis par College of American Pathologist (CAP) et CTCB ont été identifiés et les tests de sensibilité aux antibiotiques ont été effectués sur le VITEK 2 Compact.

La carte AST XNO5 pour la recherche de β -lactamase à spectre élargie a été validée par comparaison avec la méthode de diffusion de disque avec recherche du «bouchon de champagne» (14) en utilisant 20 isolats des patients considérés comme multi-résistants avec les cartes AST 233 ou AST 235.

La préparation de l'inoculum se fait conformément aux recommandations du fournisseur de la manière suivante :

A partir d'une culture pure âgée de moins de 24 heures, un inoculum de 0,5 McFarland est préparé à l'aide du densitomètre (DensiChek) dans un tube dédié au DensiChek.

Pour l'identification, l'inoculum est de 0,5 McFarland

Pour l'antibiogramme des bacilles à Gram négatif, 145 μ L de 0,5 McFarland sont transférés dans un autre tube contenant 3 mL de solution saline

Pour l'antibiogramme des bacilles à Gram positif, 280 µL de 0,5 McFarland sont transférés dans un autre tube contenant 3 mL de solution saline.

Ces tubes sont placés sur le portoir puis la tubulure de la carte y est immergée. Le tout est chargé dans l'automate après enregistrement.

L'antibiogramme par la méthode des disques a été fait conformément aux recommandations du CA-SFM 2013 et EUCAST de la manière suivante :

A partir d'une culture de moins de 24 heures, une suspension de 0,5 McFarland est obtenue et diluée au 1/10^{ème} les boîtes sont inoculées par la méthode de l'écouvillonnage et les disques sont déposées à l'aide d'un applicateur de disques. L'incubation se fait pendant 18 à 24 heures

Tableau 1. Résumé de la méthodologie de vérification des performances

Equipement	Sensibilité	Répétabilité	Réproduct	EEQ	Comparaison
BacT/Alert	10 UFC	NA	NA	NA	NA
COBAS	NA	X 24	X 30	Effectuée	NA
VITEK 2	NA	X 15	X 30	Effectuée	Effectuée

III. Vérification de la performance des méthodes d'identification par agglutination

Il s'agit de la vérification sur site des performances des méthodes d'agglutination utilisées pour l'identification.

Le principe de ces méthodes est basé sur la réactivité antigène-anticorps, la réaction positive se caractérise par une agglutination macroscopique alors qu'une réaction négative se caractérise par une suspension homogène.

La souche à identifier en culture pure est émulsionnée dans une goutte du réactif déposée sur une lame ou plaque. Un mouvement de rotation est appliqué pendant environ 30 sec à la recherche d'une agglutination.

III.1. Sérum anti-Salmonella (OMA et OMB)

50 isolats des patients ayant les caractéristiques biochimiques de *Salmonella* et agglutinant avec l'un des sérums polyvalents OMA ou OMB ont été identifiés en parallèle sur VITEK 2 COMPACT.

III.2. Sérum anti-*Staphylococcus aureus* (PASTOREXTM STAPH-PLUS)

20 isolats des patients répondant aux caractères d'orientation du genre *Staphylococcus* ont été agglutinés avec le réactif **PASTOREXTM STAPH-PLUS** puis identifiés sur VITEK 2 Compact.

Pour la traçabilité métrologique, le contrôle interne du coffret et deux souches de référence de staphylocoque ont été utilisées : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC BAA 750.

Evaluation Externe de la Qualité avec des isolats de *Staphylococcus*

IV. Evaluation des points critiques

La validation d'une méthode automatisée commence par la vérification sur site des performances annoncées par le fournisseur, puis de façon continue par des contrôles de qualité. L'automate n'étant pas le seul composant ayant un impact sur le résultat, il est nécessaire d'évaluer les autres points critiques pouvant influencer le résultat final.

Pour une analyse qualitative non automatisée, la validation est plus complexe que celle des analyses de type quantitatif du fait que sa mise en œuvre requiert des moyens autre que les CIQ et les EEQ du fait que dans la majorité des cas ces contrôles ne sont pas disponibles.

Ainsi la validation en termes de maîtrise du processus dans toutes ses étapes a été faite par la maîtrise des différents points critiques par la combinaison de AMDEC et de l'analyse des causes et effets ou le diagramme des 5 M de **Kaoru ISHIKAWA**.

IV.1. Maîtrise des 5M

M1 pour la Main d'œuvre

- ✓ Gestion des habilitations
- ✓ Evaluation des pratiques professionnelles
- ✓ Harmonisation des pratiques professionnelles

M2 pour le Matériel

Le matériel est constitué des équipements de mesure et des équipements qui n'interviennent pas dans la mesure mais ayant un impact sur la qualité du résultat

Parmi les équipements on distingue :

Les analyseurs : Identification et antibiogramme, Densitomètre, Hémoculture, Thermocycleur

Les enceintes thermiques : Les réfrigérateurs, Les incubateurs, Les autoclaves

Les équipements de mesure : Les thermomètres, Les pipettes, La balance

Matériels divers : La centrifugeuse, Poste de Sécurité Microbiologique

M3 pour Matière

Par matière on considère tout ce qui entre dans la fabrication, préparation ou formation du produit finale, on distingue :

L'échantillon

- ✓ Son mode de recueil
- ✓ Ses conditions de transport
- ✓ Sa conservation avant et après traitement

Les réactifs

Parmi les réactifs ayant un impact sur la qualité des résultats on distingue

- ✓ Les milieux de culture préparés au laboratoire
- ✓ Les milieux commercialisés prêts à l'emploi
- ✓ Les cartes d'identification et de sensibilité aux antibiotiques
- ✓ Les réactifs d'agglutination
- ✓ Les tests d'orientation pour l'identification
- ✓ Les disques d'antibiotique
- ✓ Les colorants

M4 pour Méthode

Rédaction conformément à l'état de l'art

Validation dans le contexte du laboratoire

M5 pour Milieu

Conditions de l'environnement :

- ✓ Température
- ✓ Humidité
- ✓ Poussière

IV.2. Etude de la criticité des réactifs et processus

L'évaluation de la criticité est basée sur 3 paramètres de la cause ou anomalie cotés de **1 à 3**, il s'agit de la fréquence, la gravité et la détectabilité. Les données sur les fréquences sont basées sur les non-conformités observées au LBM BIO 24

La fréquence(F) d'apparition des anomalies constatées par le laboratoire peut être cotée de la façon suivante :

- ✓ **1** pour une fréquence de 0 à 1 fois par an,
- ✓ **2** pour une fréquence de 2 à 3 fois par an,
- ✓ **3** pour une fréquence supérieure à 3 fois par an.

La gravité(G) de l'anomalie sur le processus analytique et ses incidences sur le diagnostic, le traitement ou l'épidémiologie :

- ✓ **1** pour aucune incidence,
- ✓ **2** pour une incidence probable,
- ✓ **3** pour une incidence certaine.

La détectabilité(D) de l'anomalie au cours du processus analytique incluant les phases pré et post analytique :

- ✓ **1** pour une anomalie détectable au cours du processus analytique,
- ✓ **2** pour une anomalie dont la détection peut être possible au cours du processus analytique,
- ✓ **3** pour une anomalie non détectable au cours du processus analytique.

La cotation de chaque paramètre permet de calculer l'indice de criticité

$$\mathbf{IC} = \mathbf{F} \times \mathbf{G} \times \mathbf{D}$$

Un indice de criticité ≥ 6 est considéré comme un risque donc nécessite une disposition pour la maîtrise.

RESULTS

I. Recueil des exigences

Les exigences recueillies ont été regroupées en deux catégories, les exigences générales et les exigences techniques liées à des analyses spécifiques.

I.1. Les exigences générales

La maîtrise des documents externes

Chaque nouvelle version de la notice d'un fournisseur contient des informations nouvelles, celles ci doivent être revues afin de modifier éventuellement la disposition prise par rapport à l'ancienne version.

Moyen de maîtrise : faire une liste des produits utilisés en microbiologie et pour chaque produit noter la dernière version de la notice utilisée. Pour les produits livrés sans notice, vérifier si la notice est disponible sur le site du fournisseur. Faire une veille documentaire à chaque livraison si le coffret contient une nouvelle version de la notice.

La réactovigilance

Les lots des réactifs utilisés doivent être tracés afin de pouvoir analyser l'impact sur les résultats des patients en cas de retour d'information du fournisseur sur des lots défectueux non détectés lors du contrôle.

Moyens de maîtrise : deux niveaux d'enregistrement, le premier avec le logiciel de gestion des stocks à la réception, le deuxième lors de la première utilisation au laboratoire à l'aide d'un enregistrement en feuillet Excel lors de la mise à disposition.

Classement en niveau d'urgence de prise en charge des examens de bactériologie.

Les examens de bactériologie dont l'exécution ne peut être différée sont classés en 4 catégories.

Examens de classe A

Le résultat de ces examens peut modifier le pronostic vital ou fonctionnel. La mise en œuvre immédiate et la réponse même partielle est justifiée 7 jours /7.

Maîtrise de l'exigence : Une liste des examens considérés comme de classe A doit être disponible au laboratoire avec un indicateur de suivi (délai de transmission après réception inférieur à une heure).

Exemples : hémoculture, LCR, liquide de dialyse péritonéale, Lavage Broncho-Alvéolaire (LBA), Aspiration bronchique, aspiration gastrique du nouveau né, urines au cours d'une pyélonéphrite, les suppurations profondes etc.

Examens de classe B

Le résultat de ces examens a un impact en terme de santé publique, il met en évidence un risque de situation épidémique.

Exemples : recherche de *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae* 01, recherche ou isolement de bactéries multi-résistantes SARM, ERV, EPC, BLSE etc.

Maîtrise de l'exigence : une liste des isolats considérés comme de classe B doit être disponible au laboratoire avec un enregistrement pour formaliser la déclaration et les contacts des prescripteurs ou des autorités sanitaires notifiés.

Examens de classe C

Ce sont des examens médicalement importants mais pour lequel le patient n'est plus en situation d'urgence parce que déjà pris en charge médicalement. Ils correspondent aussi à la

spécificité technologique de la culture bactérienne qui nécessite des temps de réponse plus longue.

Examens de classe D

Ce sont des examens devant être traités pour préserver les chances de diagnostic parce que tout retard serait préjudiciable aux résultats (faux négatifs du à la fragilité du germe)

Exemple : tout produit pathologique susceptible de contenir un germe fragile

Maîtrise de l'exigence : le manuel de prélèvements doit préciser les délais de réalisation après recueil de l'échantillon.

I.2. Les exigences techniques

Qualité du matériel de recueil

Les écouvillons en coton avec tige en bois sont à proscrire, les écouvillons recommandés pour le recueil des échantillons doivent être en nylon ou en dacron (polyester)

Pour les échantillons collectés par écouvillonnage, il est recommandé de faire deux écouvillons un pour la réalisation du frottis et l'autre destiné à la culture.

Quantité de sang en hémoculture

Hémoculture : volume minimum conseillé pour l'adulte est de 20 ml soit deux ballons de 10 mL, le volume maximal est de 60 mL soit six ballons de 10 mL. Un volume supérieur à 60 mL n'apporte pas de valeur ajoutée.

Chez l'enfant, le volume varie en fonction du poids :

De 1 à 2 kg : 1,5 à 4,5 mL dans un flacon soit 4,5% du volume total

De 2,1 à 12 kg : 3 à 6 mL dans un flacon soit 3% du volume total

De 13 à 36 kg : 5 à 7 mL par flacon avec un maximum de 4 flacons soit 2,9% du volume total

> 36 kg même volume que l'adulte : 10 mL par flacon avec un maximum de 6 flacons

Maîtrise et suivi de l'exigence : Mesurer le volume de sang recueilli dans le flacon, et suivre le taux de flacons non conformes (volume insuffisant) tout en traçant les préleveurs concernés.

Hémoculture en cas d'endocardite

Faire les prélèvements à tout moment car la bactériémie est constante. Si les trois hémocultures sont requises, espacer les ponctions avec un intervalle minimum d'une heure.

En cas de résultat négatif, les prochaines hémocultures se feront à 72 heures d'intervalle.

Hémocultures pour une septicémie à porte d'entrée dispositif intra-vasculaire

Lorsque le dispositif est en place, faire deux séries d'hémoculture espacées de 10 min, la première série avec deux flacons par ponction veineuse périphérique et la deuxième série la ponction se fait à travers le dispositif, c'est l'hémoculture apparentée.

Conditions de recueil des urines

Sauf contre indication telle que l'impériosité urinaire, le prélèvement est fait au moins 4 heures après la miction précédente pour permettre un temps de stase suffisant dans la vessie.

En cas de recueil par un collecteur, la durée du collecteur doit être inférieure à une heure

Pour la recherche des BAAR, recueillir la totalité de la miction matinale 3 jours de suite.

Le délai de réalisation de l'ECBU après recueil des urines est de 2 heures.

Fréquence de réalisation des CIQ pour l'identification et l'antibiogramme

La fréquence idéale des CIQ pour la sensibilité et l'identification des germes est d'une fois par semaine.

La fréquence minimale est de une fois chaque deux semaines ou après chacune des situations suivantes : nouveau lot de réactif, intervention sur l'équipement.

Les écarts tolérés sont de moins de 10% par test ($< 2/20$ ou $< 3/30$).

Si l'erreur n'est pas identifiable, refaire le test pendant cinq jours consécutifs.

Etude de corrélation des méthodes

Faire une étude de la corrélation soit avec le passage des CIQ soit sur les isolats des patients sur chaque type de carte AST entre le VITEK 2 CompactTM et l'antibiogramme par la méthode de diffusion de disques.

Etude de l'impact sur les dossiers des patients

En cas de CQI non conforme, faire l'étude de l'impact sur les résultats des patients depuis le dernier CQI conforme en tenant compte des types de discordances pour les catégories Sensible (S), Intermédiaire (I) et Résistante (R),

- ✓ Discordance Majeure (DM) pour un résultat rendu à tort R au lieu de S
- ✓ Discordance Très Majeure (DTM) pour un résultat rendu à tort S au lieu de R
- ✓ Discordance Mineure (Dm) pour résultat rendu à tort S ou R au lieu de I ou rendu à tort I au lieu de S ou R

Le dénombrement microscopique des éléments figurés doit se faire soit à l'aide d'un automate de numération cellulaire soit à l'aide d'un dispositif de type cellule de Malassez ou cellule de KOVA. Le résultat est exprimé par mL d'urines.

La méthode de numération semi quantitative par champ microscopique sur urines centrifugée n'est pas reproductible et ne doit plus être utilisée pour le dénombrement cellulaire.

Recherche de mécanisme de résistance

La recherche de pénicillinase obligatoire par méthode chromogénique pour les souches de *Haemophilus*, *Neisseria*, SASM sensibles à la pénicilline.

La recherche de SARM est faite avec les disques de moxalactam 30 µg ou de la céfoxitine 30 µg avec une meilleure spécificité qu'avec le disque d'oxacilline 5 µg.

La recherche de BLSE est obligatoire pour les bactéries à Gram négatif (entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp*) à chaque fois qu'une résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération est observée.

Condition d'incubation

La température optimale d'incubation recommandée pour la culture des bactéries mésophiles est de 35 °C

Délai d'incubation des échantillons

- ✓ Pour l'hémoculture avec suspicion d'endocardite, le délai d'incubation est de 21 jours
- ✓ Pour le LCR, le délai d'incubation 5 jours
- ✓ Pour la recherche de *Neisseria gonorrhoeae*, l'incubation est de 72 heures
- ✓ Pour le diagnostic microbiologique des sécrétions broncho-pulmonaires, si la recherche de *Nocardia* ou *Actinomyces* est demandée, le délai d'incubation est de 20 jours.
- ✓ Pour les collections suppurées, la durée d'incubation est de 72 heures

Disponibilité des résultats partiels

Pour toutes les analyses de la classe A comme le LCR, les résultats de la microscopie doivent être disponible pour la transmission au prescripteur dans l'heure après réception de l'échantillon au laboratoire.

Recherche de germes entéropathogènes

Dans les diarrhées sanguinolentes en plus des germes de la coproculture standard (*Salmonella*, *Shigella*), les sérovars de *Escherichia. coli* O157:H7, O26, O55, O91, O103 et O111 doivent être recherchés.

Quantification de la flore bactérienne vaginale et son équilibre

Le diagnostic de la vaginose bactérienne doit se faire avec le score de Nugent-Krohn-Hillier avec la classification suivante en fonction du score de Nugent :

- ✓ Score de 0 à 3, flore normale avec prédominance de flore de Doderlein
- ✓ Score de 4 à 6, flore intermédiaire avec prédominance d'une flore autre que Doderlein
- ✓ Score de 7 à 10, absence de Doderlein et présence d'une flore mono ou polymorphe.

Le diagnostic de la vaginose bactérienne (VB) est posé par un score de Nugent > 6 associé au morphotype *Gardnerella* et anaérobie avec ou sans morphotype *Mobilincus*.

Tableau 2. Score de Nugent-Krohn-Hillier

Quantité de bactérie /champ (x1000)	> 30	6 à 30	1 à 5	< 1	0
Morphotype Lactobacilles	0	1	2	3	4
Morphotype <i>Gardnerella</i> et anaérobie	4	3	2	1	0
Morphotype <i>Mobilincus</i>	2	2	1	1	0

Signification de la présence des salmonelles dans les selles

- ✓ L'isolement de *Salmonella spp* doit préciser s'il s'agit d'un isolement direct (en faveur d'une symptomatologie aigue) ou d'un isolement après enrichissement (en faveur d'un portage)
- ✓ En cas d'infection ou de portage, la coproculture réglementaire est considérée comme normale lorsque deux coprocultures sont négatives à 24 heures d'intervalle et 48 heures après la fin du traitement.

Intervalle biologique de référence

- ✓ Pour l'ECBU, les valeurs de référence des leucocytes et hématies sont $< 10^3/\text{mL}$
- ✓ Pour le LCR, les valeurs de référence des leucocytes sont $< 5/\text{mm}^3$. En cas de contamination par le sang, le nombre de leucocytes augmente dans les proportions suivantes : 1 leucocyte pour 700 hématies.
- ✓ La bactériospermie est significative avec un dénombrement de 10^3 UFC/mL

Pour le diagnostic microbiologique des sécrétions broncho-pulmonaires, les valeurs seuil pour le dénombrement :

- ✓ Expectorations : $\geq 10^7 \text{ UFC/mL}$ pour une à deux types de colonies
- ✓ Aspiration bronchique ou LBA : $\geq 10^7 \text{ UFC/mL}$
- ✓ Prélèvement distal protégé : $\geq 10^7 \text{ UFC/mL}$

Les valeurs de références des diamètres des disques pour certains antibiotiques varient en fonction des espèces bactériennes, il convient donc d'attribuer ces valeurs en fonction des espèces bactériennes.

II. Vérification des performances des méthodes

II.1.BacT/ALERTTM

Les inoculations réalisées dans les ballons aérobie et anaérobie avec les différents types de bactéries, bacilles à Gram négatif et cocci à Gram positif ont monté les résultats suivants :

La souche de *Klebsiella oxytoca* ATCC 700324 était la première à être positive après environ 4 heures de temps dans le flacon aérobie suivie de son flacon anaérobie environ 12 heures de temps après.

Le deuxième germe à être positif était le *Pseudomonas aeruginosa* ATCC BAA 1744 dans le flacon aérobie après environ 16 heures d'incubation.

Les cocci *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *Enterococcus faecalis* ATCC 24212 ont été positif après environ 17 heures d'incubation.

Le flacon anaérobie de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC BAA 1744 a été positif après 48 heures d'incubation.

Les flacons incubés dans l'étuve n'ont pas montré de signe de croissance à l'examen microscopique aux mêmes délais de positivité des flacons du Bact/ALERTTM.

L'examen microscopique a montré des signes de croissance après 24 heures d'incubation pour tous les flacons sauf le flacon anaérobie de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC BAA 1744 qui a montré des signes microscopiques de croissance après 48 heures d'incubation.

L'identification effectuée pour la spécificité sur les flacons aérobies a confirmé la présence des germes inoculés.

II.2. COBASTaqManTM

II.2.1. Répétabilité

L'échantillon négatif analysé 24 fois dans la même série a montré un résultat négatif sans inhibition du contrôle interne.

Le nombre de cycles du contrôle interne avant l'apparition du signal est satisfaisante et varie de 38 à 43.

L'échantillon positif analysé 24 fois dans la même série a montré un résultat positif avec un nombre de cycles avant l'apparition du signal allant de 26 à 26,3 et celui du contrôle interne variant de 37,7 à 40,1. Aucune inhibition n'a été observée sur la série effectuée.

Tableau 3. Performances COBAS TaqMan

Cobas TaqMan	Répétabilité	Reproductibilité	Contamination	EEQ
	Satisfaisante	Satisfaisante	Absence	Satisfaisante

II.2.2. Vérification de la non contamination inter échantillon

L'extraction des échantillons positifs et négatifs en alternance n'a pas montré de contamination par les échantillons positifs, tous les échantillons négatifs n'ont montré aucun signe d'amplification.

II.2.3. Reproductibilité

Le passage des contrôles internes du kit positif et négatif dans plusieurs séries de passage des échantillons cliniques a montré des résultats satisfaisants même après changement de lot de réactifs aussi bien d'extraction que d'amplification.

Aucune inhibition du contrôle positif n'a été observée ni de contamination du contrôle négatif.

II.2.4 Evaluation Externe de la Qualité

Les échantillons des EEQ fournis par le Centre Toulousain de Contrôle de Qualité en Biologie clinique au cours de l'année 2013 ont montré des résultats satisfaisants

II.3. VITEK 2 CompactTM

II.3.1. Carte Identification

Sur les 64 réactions de la carte GN, les deux souches utilisées (*Proteus vulgaris* ATCC 6380 et *Klebsiella oxytoca* ATCC 700324) ont montré une très bonne répétabilité et une concordance sur les résultats attendus.

La souche testée avec la carte GP, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC BAA 750 a été identifiée correctement avec une bonne répétabilité sur les 64 réactions de la carte.

II.3.2. Carte AST (Antimicrobial Susceptibility Testing)

Sur la carte AST-N233, la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 a été passée 15 fois, 14 passages ont montré des résultats identiques sur les 18 antibiotiques de la carte.

Concernant la carte avec des résultats discordants, sur les 18 molécules, 12 ont montré un résultat discordant. Aucune de ces discordances n'a été observée sur les 14 autres cartes.

Sur la carte AST-N235, les 15 passages de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 ont montré une bonne répétabilité sur les 19 antibiotiques de la carte avec une concordance parfaite sur les résultats attendus.

On observe une bonne corrélation des résultats avec la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 sur les molécules communes des cartes AST-N233 et AST-N235.

La souche de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 qui a été passée 15 fois sur la carte AST-N222 a montré une bonne répétabilité avec une bonne concordance sur les 18 antibiotiques constituant la carte.

Les résultats préliminaires sur la reproductibilité montrent la même tendance observée avec la répétabilité aussi bien avec les cartes d'identification (GP et GN) qu'avec les cartes AST.

Les EEQ ont été analysées avec résultats satisfaisants pour les cartes GN, GP et AST :

- ✓ CAP D4-A2013 avec identification de *Enterococcus faecalis* et *Citrobacter freundii* avec test de sensibilité aux antibiotiques.
- ✓ CAP D4-B 2013 *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* avec test de sensibilité aux antibiotiques.
- ✓ CAP D4-C 2013 résultats non reçus

- ✓ CTCB 131 *Staphylococcus aureus* et *Stenotrophomonas maltophilia* avec test de sensibilité aux antibiotiques.
- ✓ CTCB 132 *Nocardia sp* (identifié par la carte ANC non encore évaluée sur le site) et *Pasteurella multocida* avec test de sensibilité aux antibiotiques.
- ✓ CTCB 133 *Listeria monocytogenes* (identifié par la carte ANC non encore évaluée sur le site) et *Klebsiella pneumoniae* avec test de sensibilité aux antibiotiques
- ✓ CTCB 134 *Leifsonia sp* (identifié par la carte ANC non encore évaluée sur le site) et *Raoultella ornithinolytica* avec test de sensibilité aux antibiotiques

Les tests de sensibilité avec les cartes AST P592 (streptocoques et entérocoques) et AST P580 (staphylocoques) et AST P576 (pneumocoque) ont montré une très mauvaise répétabilité avec des messages d'erreur en faveur d'une culture insuffisante même après augmentation de l'inoculum. Ces résultats sont identiques sur des lots de cartes différents. Les tests de sensibilité faits en parallèle avec la méthode de diffusion de disques sur les souches de référence et les isolats des patients ne montrent pas de signes de contamination ni de faible inoculum. Ce phénomène est étendu à toutes les cartes AST des cocci à Gram positif.

Tableau 4. Résultats performances VITEK 2 Compact

Carte	Souche de référence	Répétabilité	Reproductibilité	EEQ
GP	ATCC BAA 750	Satisfaisante	Satisfaisante	Satisfaisante
GN	<i>P. vulgaris</i> ATCC 6380 et <i>K. oxytoca</i> ATCC 700324	Satisfaisante	Satisfaisante	Satisfaisante
AST N233	ATCC 25922	Satisfaisante	Satisfaisante	Satisfaisante
AST N235	ATCC 25922	Satisfaisante	Satisfaisante	Satisfaisante
AST-N222	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Satisfaisante	Satisfaisante	Satisfaisante
AST cocci	ATCC 29213 ATCC 24212.	Non satisfaisante	Non satisfaisante	Non satisfaisante

La comparaison des résultats de la carte AST-XNO5 avec la méthode de disque pour la recherche de BLSE sur les 20 isolats cliniques ont donné les résultats suivants

Tableau 5. Comparaison AST-XNO5 et la méthode de diffusion de disques

		Diffusion des disques		Total
		BLSE +	BLSE -	
AST-XNO5	BLSE +	11	2	13
	BLSE -	0	7	7
	Total	11	9	20

Les discordances observées ont concerné deux BLSE détectées sur AST-NXNO5 sans image de bouchon de champagne ces isolats sont résistants à l'association amoxicilline-acide clavulanique, céfoxitine et toutes les céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération. Par contre les profils de résistance observés par groupe de molécules sont identiques

Aucune contamination n'a été observée sur les géloses par la méthode de diffusion.

Pour les molécules communes entre AST-NXO5 et les cartes AST-N233 et AST-N235, on observe une bonne concordance confirmant les résistances observées

II.4. Identification par les sérum d'agglutination

Les 50 souches agglutinant avec les sérum polyvalents OMA et OMB ont été identifiées correctement comme *Salmonella spp* avec un pourcentage d'identification bonne > 90% par le VITEK 2 CompactTM.

Le sérum anti-*Staphylococcus aureus* PASTOREXTM STAPH-PLUS a montré des résultats satisfaisants avec les souches de référence *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, agglutination positive et *Staphylococcus saprophyticus* ATCC BAA 750 agglutination négative.

Sur les 20 souches, 16 ont agglutiné avec le réactif on été identifiés comme *Staphylococcus aureus* par le VITEK 2 Compact. Les 4 autres souches non agglutinantes ont été identifiées comme *Staphylococcus saprophyticus*.

Les EEQ avec les isolats de *Staphylococcus* ont été correctement agglutinés : agglutination positive pour *Staphylococcus aureus* et agglutination négative pour *Staphylococcus caprae*, ces souches ont été correctement identifiées par le VITEK 2 Compact

III. Evaluation des points critiques

III.1. Maîtrise des 5M

De façon générale, les **5M** ont fait l'objet de suivi et d'amélioration continue dans tous les secteurs du laboratoire BIO 24.

III.1.1 Main d'œuvre : maîtrise et maintien de la compétence du personnel

Tout le personnel travaillant dans le secteur de bactériologie sur les échantillons de patients est habilité pour chaque tâche dont il a la charge. Un tableau de polyvalence est progressivement renseigné afin de gérer les disponibilités des compétences pour une continuité des prestations. Le taux des opérateurs polyvalents est maintenu proportionnellement à la charge du travail.

Il existe une évaluation des pratiques professionnelles (sur les activités habilitées) pour maintenir les compétences acquises pour chaque opérateur.

Une harmonisation des pratiques de lecture a été mise en place pour les lectures microscopiques et les dénombrements des germes elle se fera à une fréquence planifiée.

Tableau 1. Exemple d'enregistrement de l'harmonisation des pratiques de lecture

Opérateur	Pratiques de lecture		Conclusion sur l'harmonisation
	Dénombrement leucocytes	Dénombrement hématies	
Opérateur 1			
Opérateur 2			

La concordance des résultats est basée sur un écart maximal toléré par exemple < 10% pour la cytologie et le dénombrement des germes.

Les écarts sont revus sur le champ avec le superviseur pour apporter une correction.

Lorsque la dispersion est importante, l'échantillon est observé au microscope à double tête branché sur un moniteur pour harmoniser la lecture.

Les techniciens et secrétaires sont habilités à saisir les résultats dans le Système Informatique du laboratoire (SIL).

En heure de garde, les techniciens sont formés et habilités à transmettre les résultats.

Les biologistes sont formés et habilités à la prestation de conseils en pré et post-analytique.

III.1.2. Milieu : maîtrise de l'environnement de travail

En préanalytique, l'espace accueil permet de recueillir les informations en toute confidentialité de même la collecte des échantillons se fait dans un espace garantissant l'intimité des patients.

La température de la salle de l'unité de microbiologie est contrôlée en continue par prise de température chaque 15 min (thermomètre SPYTM) et les données sont transférées à une unité centrale (logiciel Sirius JRI) par radio fréquence.

L'intervalle de tolérance est fixé de 22 à 25 °C en tenant compte du fonctionnement des automates et enceintes thermiques, de la conservation des milieux et réactifs (stock local) et du confort du personnel.

L'accessibilité limitée et l'étanchéité des fenêtres permettent de garder un environnement de travail exempté de rayons solaires et de poussière du moins à un niveau n'entrant pas de souillures des milieux de culture ou des échantillons.

L'aménagement de l'espace de travail utilise la méthode des 5S pour gérer l'espace étroit et faciliter les mouvements du personnel opérant sur place.

Les surfaces de travail et le petit matériel sont désinfectées avec du SurfaniosTM conformément aux recommandations du fournisseur pour maîtriser le risque infectieux.

III.1.3. Matériel : maîtrise de l'équipement utilisé

La maîtrise de l'équipement commence lors de son acquisition avec un cahier de charge comme cela est fait de façon courante au laboratoire BIO 24.

Pour les automates, l'installation au laboratoire et la formation des utilisateurs sont assurées par le fournisseur. Ces automates ne sont utilisés que par le personnel habilité.

Les contrats de maintenance préventive sont signés avec les fournisseurs pour les équipements dont l'ingénieur de BIO 24 n'est pas formé.

Les maintenances de l'ingénieur et utilisateur sont planifiées conformément aux recommandations du fournisseur.

L'application de ces dispositions est suivie par l'ingénieur de BIO 24, vérifiée lors des audits et communiquée à la direction lors des réunions de pilotage et la revue de direction.

Sur le plan métrologique, les équipements disposant d'étalon ou de matériel de contrôle sont vérifiés à fréquence planifiée.

La balance utilisée pour la pesée des milieux et réactifs est vérifiée pour plusieurs paramètres (fidélité, justesse, fluage, excentration) à l'aide des masses étalons elles mêmes reliées à des étalons internationaux par le LNE (Laboratoire National d'Essai en France).

Les pipettes sont vérifiées l'aide de la balance par pesée d'eau distillée comme recommandé par le fournisseur. Les écarts type obtenus lors de la mesure de la justesse permettent de catégoriser la pipette ou de la déclasser par rapport à une manipulation et son incertitude.

Les thermomètres sont vérifiés à l'aide d'un thermomètre étalon qui est relié à un étalon international. L'écart maximal toléré (EMT) étant de 1 °C, les thermomètres qui affichent un écart > EMT sont retirés de l'effectif.

Les enceintes thermiques (étuves, réfrigérateurs et congélateurs) sont caractérisées une fois par an afin de délimiter la zone de travail compatible aux exigences spécifiées par le fournisseur ou la méthode.

Le Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) est maîtrisé pour sa capacité de protéger l'échantillon et de protéger le manipulateur :

- ✓ la vitesse du flux est vérifiée à l'aide anémomètre
- ✓ le test de contamination à l'aide des fumigènes placés à l'extérieur et à l'intérieur
- ✓ la saturation ou colmatage du filtre est surveillée à l'aide d'un signal sonore.

III.1.4. Matière : maîtrise de l'échantillon et des réactifs

L'échantillon qu'il soit collecté par le laboratoire ou transmis par une autre structure est sous la responsabilité du laboratoire d'où le livret de prélèvement pour définir les conditions de recueil, le volume minimal, la température et le délai de transport avant réalisation.

La plupart des réactifs sont choisis chez des fournisseurs ayant le marquage CE. La conservation se fait conformément aux recommandations du fournisseur et la vérification des performances se fait avec des contrôles.

Les milieux de culture commercialisés et prêts à l'emploi ont des certificats de conformité mis à disposition par les fournisseurs.

Tous les milieux préparés au laboratoire font l'objet d'un CIQ en vérifiant la stérilité, la fertilité, les caractères biochimiques etc.

Pour les réactifs tels que les colorants, la maîtrise est double : maîtrise de la technique de coloration et des réactifs de coloration. Des lames préfixées sont préparées (bacilles à Gram-, cocci à Gram+, BAAR) et insérées à chaque série de coloration.

Tableau 2. Exemple CIQ préparation du milieu Hektoen

Opérateur date	Lot du milieu	Contrôle stérilité	Caractères du milieu	Souches de référence	Décision	Opérateur contrôle	Visa du biogiste
Oper1 01/12/13	H2D1510	RAS	Lactose + Lactose – SH ₂ + Négative	<i>E. coli</i> <i>Proteus</i> <i>Proteus</i> <i>S aureus</i>	Lot conforme	Oper2	Lot mis en circulation Biol1

III.1.5. Méthode : maîtrise des procédures et modes opératoires

Les éléments entrant dans la méthode sont constitués des 4 premiers M dont la maîtrise est démontrée. L'élément fondamental de la méthode est son contenu et la séquence de ses activités, sa base scientifique doit être démontrée ou reliée à un document de référence ou prouvés scientifiquement. Une fois ce principe acquis, la mise en place peut commencer.

La rédaction des documents sera effectuée par les opérationnels ou avec leur participation. Tout document rédigé doit être vérifié les et approuvés avant diffusion comme l'impose l'exigence de la maîtrise des documents.

L'encadrement doit s'assurer que le contenu est bien compris et appliqué par les opérationnels et que les versions des documents en vigueur sont sur les lieux de travail.

III.2. Evaluation des points critiques sur l'ECBU

III.2.1. Anomalies de la phase préanalytique

- ✓ Non respect du délai de stase urinaire

Fréquence	3
Gravité	2
Détectabilité	3
Indice de Criticité	18

Moyens de maîtrise : interroger sur l'heure de la dernière miction et noter le temps de la stase sur la fiche technique ECBU. Notifier l'écart si délai < à 4 heures.

- ✓ Non respect du délai d'acheminement au laboratoire

Fréquence	3
Gravité	2
Détectabilité	2
Indice de Criticité	12

Moyens de maîtrise : noter l'heure de recueil, noter l'heure de réception/réalisation de l'analyse. Si délai > à 2 heures, notifier l'écart.

III.2.2. Anomalies de la phase analytique

- ✓ Mauvais dénombrement cellulaire

Fréquence	3
Gravité	2
Détectabilité	3
Indice de Criticité	18

Moyen de maîtrise : instauration de la double lecture et corrélation inter opérateurs

- ✓ Mauvais dénombrement des germes urinaires

Fréquence	3
Gravité	2
Détectabilité	3
Indice de Criticité	18

Moyen de maîtrise : instauration de la double lecture et corrélation inter opérateurs

III.3. Evaluation des points critiques sur la recherche de *C trachomatis*

III.3.1. Anomalie de la phase préanalytique

- ✓ Mauvais recueil du prélèvement (pauci cellulaire)

Fréquence	3 (estimée de façon indirecte avec les FCU pauci cellulaires)
Gravité	2
Détectabilité	3
Indice de Criticité	18

Moyens de maîtrise : éviter les écouvillons en coton, utiliser les écouvillons en dacron ou en alginate, éviter la période péri-ovulatoire avec abondance de glaire cervicale. L'urine du premier jet doit être recueillie après au moins 4 heures de stase

III.3.2. Anomalie de la phase analytique

- ✓ Contamination inter échantillon

Fréquence	1
Gravité	3
Détectabilité	3
Indice de Criticité	9

Moyens de maîtrise : manipuler le contrôle positif après avoir fermé tous les tubes des patients. Reprendre l'extraction et l'amplification de tous les échantillons positifs en contigu.

III.4. Evaluation des points critiques sur la recherche des mycoplasmes

III.4.1. Anomalies de la phase préanalytique

- ✓ Mauvais recueil du prélèvement (pauci cellulaire)

Fréquence	3 (estimée de façon indirecte avec les FCU pauci cellulaires)
Gravité	2
Détectabilité	3
Indice de Criticité	18

Moyens de maîtrise : éviter les écouvillons en coton, utiliser les écouvillons en dacron ou en alginate, éviter la période péri-ovulatoire avec abondance de glaire cervicale.

- ✓ Non respect du nettoyage cervical

Fréquence	3
Gravité	3
Détectabilité	1
Indice de Criticité	9

Moyens de maîtrise : communication avec les préleveurs par remontée d'informations sur le taux des géloses A7 souillées pour améliorer le nettoyage de l'exocol

- ✓ Non respect du délai d'acheminement au laboratoire

Fréquence	1
Gravité	3
Détectabilité	2
Indice de Criticité	6

Moyens de maîtrise : noter l'heure de recueil, noter l'heure de réception/réalisation de l'analyse. Si délai > à 2 heures, notifier l'écart.

III.4.2. Anomalie de la phase analytique

- ✓ Mauvais dénombrement des mycoplasmes

Fréquence	3
Gravité	2
Détectabilité	3
Indice de Criticité	18

Moyen de maîtrise : instauration de la double lecture et corrélation inter opérateurs

III.5. Evaluation des points critiques sur le diagnostic de la VB

III.5.1. Anomalie de la phase préanalytique

- ✓ Mauvais recueil du prélèvement (prélèvement vulvaire au lieu de vaginal)

Fréquence	3
Gravité	2
Détectabilité	3
Indice de Criticité	18

Moyens de maîtrise : communiquer aux infirmières sur l'utilité de faire un écouvillonnage vaginal au lieu de l'écouvillonnage vulvaire chez la jeune fille (vierge).

III.5.1. Anomalie de la phase analytique

- ✓ Erreur sur la lecture du frottis vaginal

Fréquence	3
Gravité	2
Détectabilité	3
Indice de Criticité	18

Moyen de maîtrise : instauration de la double lecture et corrélation inter opérateurs, formation et évaluation sur le score de Nugent-Krohn-Hillier

III.6. Evaluation des points critiques sur l'hémoculture

III.6.1. Anomalie de la phase préanalytique

- ✓ Volume sanguin insuffisant

Fréquence	3
Gravité	3
Détectabilité	1
Indice de Criticité	9

Moyens de maîtrise : communiquer aux préleveurs sur l'utilité d'augmenter le volume sanguin le plus proche possible du volume maximal qui est le volume idéal. Modifier le mode opératoire, le Code de Bon Prélèvement (CBP) et le livret de prélèvement en ajoutant la correspondance entre le poids et le volume sanguin à prélever chez les enfants.

- ✓ Mauvaise désinfection du site de prélèvement

Fréquence	3
Gravité	3
Détectabilité	3
Indice de Criticité	27

Moyens de maîtrise : Procédure de désinfection dans le mode opératoire « Hémoculture », disponibilité des produits de désinfection dans les salles et les mallettes des préleveurs.

III.6.2. Anomalie de la phase analytique

- ✓ Incubation du ballon dans l'étuve puis dans l'automate

Fréquence	3
Gravité	3
Détectabilité	1
Indice de Criticité	9

Moyens de maîtrise : communiquer aux préleveurs sur l'utilité de garder les flacons à température ambiante lorsque l'automate n'est pas accessible

III.6.3. Anomalie de la phase post-analytique

- ✓ Isolat non pathogène, souillure de la peau ou de l'environnement

Fréquence	3
Gravité	3
Déetectabilité	2
Indice de Criticité	18

Moyens de maîtrise : standardiser les commentaires pour les souches non pathogènes ou pour les isolats sur ballon unique. Evaluer les taux de souillures et tracer les préleveurs associés.

III.7. Evaluation des points critiques sur l'identification et l'antibiogramme

III.7.1. Anomalie de la phase analytique

✓ Pureté et âge de la culture

Fréquence	3
Gravité	2
Détectabilité	2
Indice de Criticité	12

Moyens de maîtrise : repiquage de la souche en cas de doute de pureté, prélever superficiellement les grosses colonies.

✓ Stérilité de la solution saline et du distributeur

Fréquence	2
Gravité	3
Détectabilité	2
Indice de Criticité	12

Moyens de maîtrise : éviter de pipeter dans le flacon, faire des aliquotes. N'utiliser le distributeur qu'avec des tubes stériles, ne jamais l'utiliser pour réajuster l'inoculum. Stériliser par autoclavage à fréquence régulière le dispositif de distribution, et conserver le dispositif entre 2 et 4 °C après chaque utilisation.

✓ Erreur de choix de carte

Fréquence	3
Gravité	3
Détectabilité	1
Indice de Criticité	9

Moyens de maîtrise : réaliser les tests d'orientation vers le diagnostic du genre, ne pas se contenter de l'aspect des colonies ou la couleur sur milieu chromogène : morphologie, Gram, mobilité, catalase, oxydase.

✓ Erreur sur l'ajustement de l'inoculum

Fréquence	2
Gravité	3
Détectabilité	3
Indice de Criticité	18

Moyens de maîtrise : utiliser un densitomètre contrôlé, à défaut des étalons de McFarland.

Eviter de racler la gélose en prélevant les colonies

✓ Etat physiologique de la bactérie : culture âgée ou bactérie isolée sur un milieu sélectif

Fréquence	2
Gravité	3
Détectabilité	3
Indice de Criticité	18

Moyens de maîtrise : Préparer l'inoculum à partir d'une culture de moins de 48 heures et sur milieu non sélectif

✓ Les pseudo-résistances

Fréquence	2
Gravité	3
Détectabilité	2
Indice de Criticité	12

Moyens de maîtrise : Vérifier toutes les BMR sur milieu gélosés pour éventuelle contamination

III.7.2. Anomalie de la phase post-analytique

- ✓ Phénotype de résistance non modifié

Fréquence	3
Gravité	3
Détectabilité	1
Indice de Criticité	12

Moyens de maîtrise : En cas d'indisponibilité de la méthode automatisée, vérifier les phénotypes de résistance avant toute validation

- ✓ Antibiotique non adapté au site de prélèvement

Fréquence	3
Gravité	3
Détectabilité	2
Indice de Criticité	18

Moyens de maîtrise : choisir des modèles de saisie en fonction des produits pathologique et de la pharmacocinétique des antibiotiques

DISCUSSION

La validation des méthodes utilisées dans un LBM est une approche permettant de garantir la fiabilité des résultats.

Les exigences contenues dans le référentiel ISO 15189 (53) ainsi que les recommandations des guides des sociétés savantes (14, 86, 95, 105, 106, 105) permettent de mettre en place des dispositions dont l'application aboutit à des résultats fiables.

Les exigences recueillies ont été reparties en deux catégories, les exigences générales et les exigences techniques. Ces exigences ont complété celles existant déjà au laboratoire mais surtout renforcées celles non formalisées ou dont l'application n'est pas documentée.

Les exigences générales ont concerné la maîtrise des notices des fournisseurs, la traçabilité des lots des réactifs utilisés et le classement des analyses en catégorie d'urgence et de la disponibilité de leurs résultats.

Ces exigences font souvent l'objet de questionnaire d'audits lors de la mesure de l'efficacité des processus (41, 45, 81)

La plupart des LBM fonctionnent en portée A (105), il est donc nécessaire de suivre les modifications apportées par les fournisseurs dans les notices afin de modifier éventuellement les documents de travail et les pratiques.

La traçabilité des lots des produits utilisés permet au laboratoire d'analyser l'impact sur les résultats des patients en cas de retour d'information du fournisseur sur les anomalies des lots, mais également sur le plan réglementaire de faire des déclarations aux autorités (8, 118)

Le LBM BIO 24 fonctionnant 24/24 se doit de disposer dans tous les sous domaines d'une liste d'analyse urgente dont la disponibilité et la mise à disposition des résultats doit être formalisée et utilisée comme indicateur sur les soins apportés aux patients (5, 57, 62).

Les exigences recueillies couvrent les phases préanalytique, analytique et post-analytique.

Les exigences de la phase préanalytique ont concerné le matériel utilisé pour le recueil des échantillons par écouvillon, les volumes requis de sang pour hémoculture en fonction de l'âge et le recueil des urines pour les examens cytobactériologiques.

L'utilisation des écouvillons avec tige en bois et embout en coton déjà prohibée (86), cette interdiction s'étend à tout autre prélèvement du fait de la libération des substances inhibitrices par le bois et d'un faible pourcentage de relargage des germes par le coton (98). Ce faible relargage pour donc aboutir à un dénombrement bactérien faible.

Le fournisseur de BacT/Alert recommande pour un adulte un volume de 5 à 10 mL pour l'adulte et de 1 à 4 mL pour les enfants. Plusieurs auteurs ont montré que le volume de 20 mL de sang à raison de 10 mL par flacon permet d'augmenter le taux d'isolats de 30% comparé à un volume \leq 10 mL (9, 22, 86, 98, 33). Les recommandations européenne et américaine proposent un minimum de 20 mL et un volume idéal de 40 à 60 mL par 24 heures pour un adulte (33, 86, 98). Pour les enfants, seuls les guides européens tiennent compte du rapport poids et volume sanguin à prélever et au-delà de 36 kg, le volume à prélever est le même que pour un adulte (33, 85, 98).

Malgré sa simplicité d'exécution, l'ECBU peut devenir un examen d'interprétation difficile lorsque les conditions préanalytiques ne sont pas rigoureusement respectées (31, 55). Le temps de stase urinaire de 4 heures et le délai d'acheminement $<$ 2 heures ont été préconisés par plusieurs auteurs et guides. (31, 55, 86, 98).

Les pratiques du LBM BIO 24 n'utilisent pas de conservateur du type borate ni la conservation pendant 24 heures à 4 °C du fait des distances rapprochées entre le laboratoire et les sites de prélèvements externes tel est le cas dans les pays occidentaux. (23, 112)

Les exigences techniques recueillies ont concerné la température et les délais d'incubation, les fréquences des CIQ et l'impact de leurs dérives sur les résultats des patients, l'étude de corrélation des méthodes, les méthodes de dénombrement cellulaire et les mécanismes de résistance, la recherche de germes entéropathogènes, sur le diagnostic de la vaginose bactérienne et certaines valeurs biologiques de référence.

L'examen microscopique peut à lui seul dans certains produits pathologiques poser le diagnostic ou apporter une information importante pour la prise en charge du patient (57, 62).

Le dénombrement cellulaire dans l'ECBU est un aspect très important dans le diagnostic de l'ITU, il n'est reproductible et précis que s'il est réalisé soit à l'aide d'un automate par cytométrie en flux soit par une cellule de numération (1, 55).

Le diagnostic de la VB n'utilise que l'examen microscopique après coloration de Gram, la culture n'ayant pas de valeur ajoutée (18, 37, 87). L'importance de la précision dans le diagnostic de la VB est surtout due à sa responsabilité dans les complications obstétricales et les désagréments gynécologiques (10, 58).

Il existe d'autres critères pour le diagnostic de la VB bactérienne tel que les critères d'Amsel (109), critères de Hay et Ison (12, 55). Ils diffèrent du score de Nugent par une appréciation non quantifiable de la flore et des critères subjectifs comme le test à la potasse et la couleur du papier pH Hamsel (82).

Bohbot pense que le diagnostic est généralement clinique et que l'examen cytobactériologique vaginal est rarement utile (4).

La température de croissance prescrite par plusieurs auteurs pour les bactéries mésophiles est de 37 °C (2, 22, 36) comparée à 35 °C tel que recommandé par le Rémic. Dans les incubateurs de bactériologie, l'air sec associé à une hausse de température peut aboutir à la déshydratation des milieux gélosés et donc à l'échec d'une culture. La tendance vers le bas aura moins de conséquences du fait de la limite inférieur tolérable pour obtenir une culture (80, 100).

La prolongation des délais d'incubation des produits pathologiques a été également rapportée par **Denis** pour les pus, le LCR, la recherche de *N. gonorrhoeae* et autres germes de culture et d'identification difficile (100).

L'étude de la corrélation entre deux méthodes utilisées dans un laboratoire est une exigence qui permet de garantir que les méthodes disponibles dans un LBM sont superposables et qu'en cas d'indisponibilité de la méthode principale, la deuxième méthode (« Back Up ») peut être utilisée tout en garantissant la fiabilité des résultats. (53, 105).

Les documents réglementaires et normatifs (43, 52, 53, 77) exigent que les CIQ soient réalisés mais sans préciser la fréquence. La fréquence proposée par les sociétés savantes et certains auteurs (16, 22, 95, 98) est minimum une fois chaque 15 jours, la fréquence hebdomadaire serait idéale. En plus de la fréquence choisie, chaque nouveau lot devant être contrôlé et toute intervention sur l'équipement devrait être validé par un contrôle. Le choix de la fréquence par le biologiste dépendra de la cadence des tests réalisés et de l'analyse de l'impact sur les résultats des patients (120, 121). Plus les CIQ sont rapprochés moins l'étude sur l'impact sera importante. L'étude sur l'impact devra se focaliser sur les DTM (résultats R rendu S) avec risque d'échec thérapeutique et DM (résultat R rendu S) pour permettre au patient de bénéficier d'un traitement plus léger et à moindre coût.

Les méthodes utilisées doivent détecter les mécanismes de résistance les plus couramment rencontrées en routine ou être complétées par des tests supplémentaires (74, 91, 92). La découverte de ces mécanismes permet au biologiste d'intervenir pour orienter le prescripteur

sur le choix des antibiotiques à prescrire (17, 56, 67, 68) Les isolats cliniques hébergeant ces mécanismes ont un caractère épidémiogène, leur dissémination a été démontrée dans plusieurs études (11, 26, 49), une déclaration précoce par le LBM contribuera à la rupture de cette dissémination.

La sensibilité d'un isolat n'a un sens que lorsque le rôle pathogène de la souche est avéré, cette attribution n'est pas facile dans les produits pathologiques polymicrobiens comme les selles avec les espèces comme *E. coli* ou encore avec les sérotypes de *Salmonella* sp. (3, 29, 75, 86).

Dans les selles hémorragiques, en plus des shigelles et salmonelles, la recherche de sérotypes de *E. coli* sérotype O157 : H7 et autres sérotypes apparentés a une importance particulière du fait de la possibilité d'évolution vers les pathologies plus graves comme le SHU. (3, 22, 98).

La présence des salmonelles a un rôle pathogène plus avéré, la décision de traiter varie en fonction des pratiques du fait que certaines salmonelles ne sont qu'à l'état de portage et non responsable d'un syndrome aigu. Il est donc nécessaire de préciser dans le compte rendu si l'isolat a été obtenu directement ou après enrichissement.

La mise en place des exigences dans un SMQ a pour finalité de formaliser un cadre de conformité à partir duquel la surveillance va détecter des non conformités dont la maîtrise aboutira à l'amélioration continue du processus (42).

La vérification sur sites des performances des méthodes font parties des exigences qu'un SMQ doit faire, ainsi les trois automates utilisés (BacT/Alert, COBAS TaqMan et VITEK 2 Compact) ont montré des performances satisfaisantes.

Le choix des souches utilisées est justifié par l'épidémiologie des souches isolées au LBM BIO 24.

Le temps moyen de détection < 24 heures a été observé dans d'autres études avec la même taille de l'inoculum (99, 111). Cette performance de détection précoce est confirmée par d'autres auteurs qui montrent que lors des septicémies, tous les isolats sont détectés au maximum à la 72^{ème} heure et que le prolongement au delà des 5 jours n'est nécessaire qu'en cas de situation clinique particulièrement exprimée par le prescripteur (6, 7, 47, 60). La taille de l'inoculum de 10 UFC a été choisie en fonction de la concentration bactérienne sanguine pour vérifier la sensibilité du système. Des seuils plus faibles ont pu être détectés par des tests

de stérilité des produits sanguins et pharmaceutiques montrant ainsi une bonne sensibilité de la méthode. (60, 79, 93).

Pour le COBAS TaqMan, la vérification des performances attendues a été satisfaisante.

Le nombre de 24 échantillons au lieu de 30 tel que recommandé par le guide de validation du COFRAC (105) est dû à la configuration du thermocycleur.

Le choix d'un échantillon positif au lieu du contrôle interne du coffret pour faire la répétabilité est justifié par la nécessité de contrôler l'étape de l'extraction car le contrôle interne du kit est un fragment d'ADN extracellulaire.

La méthodologie TaqMan disposant d'un principe de destruction d'éventuels amplicons avant les cycles d'amplification et d'élimination des K-tubes sans les ouvrir, limitent la vérification de la contamination aux étapes d'extraction et distribution dans les K-tubes. Ainsi la méthode choisie par intercalation de 12 échantillons positifs et négatifs a permis de montrer que la pratique du laboratoire n'expose pas les échantillons négatifs à une contamination.

L'EEQ a permis de confirmer la spécificité et l'exactitude de la méthode.

Ces performances sont confirmées par plusieurs études montrant la capacité de détecter des faux négatifs sur des échantillons contenant des inhibiteurs (119), l'amplification des nouveaux variants génotypiques par amplification des cibles plasmidique et chromosomique (46, 84).

Les tests de performances du VITEK 2 Compact ont été satisfaisants pour toutes les cassettes à l'exception des cassettes AST des cocci à Gram positif (AST P580, AST P592) dont les résultats des mesures de sensibilité apparaissent avec un messager d'erreur « insuffisant de croissance bactérienne). Toutes les préparations étant faites dans les mêmes conditions que les autres cartes, la cause du message ne peut être due à la taille de l'inoculum. Toutes les hypothèses probables évoquées par le fournisseur ont été appliquées sans amélioration. Après un brainstorming et la recherche de toutes les causes, l'hypothèse la plus probable retenue est l'installation de la nouvelle version du logiciel de VITEK 2 Compact. Les logiciels des automates sont considérés comme des équipements et doivent subir la même procédure de vérification du traitement des résultats d'analyse (88, 104). Une correspondance a été faite au fournisseur pour la résolution de l'incident ou écart. Des études attestant le bon fonctionnement des cartes AST des cocci ont déjà été publiées (76).

La répétabilité n'a été effectuée qu'avec 15 échantillons du fait que l'automate de peut analyser que 15 positions (carte) à la fois.

Les études menées sur l'identification des cocci et bacilles ont montré des performances satisfaisantes (21, 38, 39, 96).

Certains paramètres métrologiques des automates étant directement difficiles à maîtriser tel que le suivi de la température et les systèmes de lecture colorimétriques et néphélimétriques. L'exploitation des CIQ et EEQ peut être utilisée indirectement comme moyen de maîtrise analytique et métrologique des instruments d'analyses (28, 63, 117).

Ainsi les résultats satisfaisants des EEQ de l'année 2013 peuvent être considérés comme preuves indirectes de la maîtrise métrologique du VITEK 2 Compact.

La comparaison de la carte AST-XNO5 avec la méthode de diffusion a permis d'une part de vérifier la pureté des isolats pour exclure des fausses résistances dues aux souillures et d'autre part d'observer les différences et de déduire les limites de chaque méthode (59). Les isolats discordants présentent le profil de céphalosporinase hyper produite, lorsque ce phénotype est associé à une BLSE, la présence de cette dernière ne peut être détectée par l'image de synergie (14, 17c) par contre le test BLSE est positif sur AST-XNO5.

La carte AST-XNO5 présente également l'avantage de tester certaines molécules telles que tigecycline et colistine pouvant être utilisée au traitement des BMR.

En plus de la vérification des performances, la validation des processus nécessite l'analyse des points critiques ainsi que leurs moyens de maîtrise.

La particularité de la bactériologie qui est peu automatisée comparée aux autres sous domaines rend cette analyse particulière dans tous les processus (78, 113, 67, 68). La méthode des 5M est la méthode la plus utilisées dans les LBM (70, 122).

La gestion des ressources humaines est un aspect essentiel en terme de disponibilité des compétences surtout des LBM à service continu (65).

L'harmonisation des pratiques professionnelles est un outil permettant de standardiser les résultats quelque soit l'opérateur et le moment du service mais également une source d'identification des besoins en formation. (65).

Le milieu qui est l'espace qui contient les clients, les ressources humaines et le matériel, il doit être en harmonie avec ses conteneurs pour une meilleure efficacité des processus (78, 113). Dans un laboratoire de microbiologie, en plus de sa conception pour contenir le risque infectieux, s'ajoutent les BPL et de l'utilisation des équipements de protection (66)

Le matériel est constitué d'équipements et petits matériels, leur maîtrise passe par la qualification et l'habilitation des opérateurs puis le contrôle métrologique par les équipements de contrôle, de mesure et d'essai (ECME). Le raccordement des ECME est une exigence permettant de s'assurer du bon fonctionnement du matériel (27).

En bactériologie, la matière est tout élément qui entre dans la composition du produit final, il s'agit donc de l'échantillon et des réactifs.

Le matériel conditionne la qualité du résultat, la qualité des échantillons est assurée par la disponibilité et le respect des préconisations du manuel de prélèvement (30, 73).

La maîtrise des réactifs commence par son choix puis la vérification de sa performance.

Les méthodes conditionnent également le résultat, elle doit être choisie en fonction des **4M** précédent.

Après la maîtrise des 5M et la mise en route d'un processus, une dernière analyse s'impose, celle des points critiques du processus ou encore maillon faible.

L'AMDEC est un outil adapté pour décider de la nécessité de mettre en place une mesure préventive en fonction de la probabilité d'occurrence d'une anomalie.

La mesure préventive une fois mise en place devient une exigence formalisée qui crée donc un cadre de conformité.

Ce moyen de maîtrise de la dérive doit être suivi et les données collectées (indicateurs) feront l'objet d'analyses. Celles-ci aboutiront à des conclusions quant à l'adéquation de cette disposition par rapport à la pratique du laboratoire et à la qualité des prestations attendues.

La roue de **DEMING** est en marche.

CONCLUSIONS

Le laboratoire est une des composantes de la prise en charge médicale dont la fiabilité des résultats est un minimum requis pour la bonne prise en charge du patient.

Le domaine de biologie humaine étant composé de plusieurs sous domaines, celui de la microbiologie est composé de plusieurs familles dont la bactériologie.

En bactériologie, malgré l'arrivée progressive de l'automatisation, la plupart des activités est encore manuelle nécessitant des moyens de maîtrise plus complexes et à plusieurs niveaux.

L'organisation internationale de normalisation avec la norme ISO 15189 ainsi que les guides rédigés par les sociétés savantes dans le domaine de la santé humaine ont énuméré un certains nombre d'exigences permettant la maîtrise des risques dont les effets aboutissent à l'altération des résultats. La mise en place et l'application de ces exigences est une voie qui mène vers la garantie de résultats fiables.

Dans ce travail, nous avons dressé la liste des exigences dans tous les processus dont l'application par le LBM BIO 24 permettra de renforcer les dispositions déjà existantes.

La vérification sur site des performances de 3 automates (BacT/Alert, VITEK 2 Compact et COBAS TaqMan) ainsi que 2 sérum d'agglutinations utilisés pour identifier les salmonelles et *S. aureus* a permis de démontrer que les performances assignées sont obtenues lorsque tous les points critiques sont maîtrisés.

L'évaluation des points critiques a été faite par une combinaison des 5M et de l'AMDEC pour un certains nombre d'analyses (comme l'ECBU, l'hémoculture, la recherche de *Chlamydia* et mycoplasmes, le diagnostic de la vaginose bactérienne, l'identification et les tests de sensibilité aux antibiotiques) et a permis d'énumérer des dispositions à mettre en place pour la maîtrise de ces risques donc l'amélioration de ces analyses.

La mise en place des dispositions obtenues au cours de ce travail avec des indicateurs de performance pour améliorer continuellement le processus permettront au laboratoire BIO 24 de pouvoir présenter les dossiers des analyses de la famille de la bactériologie lors du prochain suivi du cycle d'audit COFRAC et également d'élargir cette méthodologie à la famille de Parasitologie-Mycologie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1.AFSSAPS.** Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires du nourrisson et de l'enfant. Recommandation février 2007
- 2.Avril JL, Dabertnat H, Denis F, Monteil H.** Bactériologie clinique. 3^{ème} Ed. Editions ellipses ; 2000 Paris
- 3.Berche P, Gaillard JL, Simonet M.** Bactériologie médicale. Editions Flammarion ; 1991 Paris.
- 4.Bohbot JM.** Vaginose bactérienne. *Feuil Biol* 2009 ; 288 : 29-31.
- 5.Boucaud-Maitre Y, Thoinet S.** Apport des tests rapides directs en bactériologie. *Spec Biol* 150 : 37-40.
- 6.Bourbeau PP, Pohlman JK.** Three days of incubation may be sufficient for routine blood cultures with BacT/Alert FAN blood culture bottles. *J clin microbial* 2001;39(6):2079-82.
- 7.Bourbeau PP, Foltzer M.** Routine incubation of BacT/Alert FA and FN blood culture bottles for more than 3 days may not be necessary. *J Clin Microbiol* 2005 ; 43(5):2506-9.
- 8.Burc L.** La réactovigilance en 2009. *Spec Biol* 2009 ; 175 : 52-58
- 9.Carbonnelle B, Denis F, Marmonier A, Pinon G, Vargues R.** Bactériologie Médicale. Techniques usuelles. Editions SIMEP ; 1987 Paris.
- 10.Chantrel J, Brabant G, Bissinger MC, Leignel C, Fruchart, A Subtil D.** Conséquence obstétricales de la vaginose bactérienne. *Feuil Biol* 2008 ; 281 : 35-39.
- 11.Chardon H.** Les bactéries multi-résistantes. *Feuil Biol* 2007 ; 277 :21-26.
- 12.Chawla R, Bhalla P, Chadha S, Grover S and Garg S.** Comparison of Hay's criteria with Nugent's scoring system for diagnostic of bacterial vaginosis. *BiomMed Res Int* 2013
- 13.Chiadmi F, Schlatte, J, Mounkassa Ovetchkine P, Vermerie N.** Tests de diagnostic rapide dans la prise en charge des angines à streptocoques β -hémolytiques du groupe A. *Ann Biol Clin* 2004 62 (5) 573-7.
- 14.Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.** Recommandations ; 2013.
- 15.Courcol R.** Quelles utilisation de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en microbiologie ?. *Rev fr lab* 2009 Nov. 416 : 61-64.
- 16.Courvalain P, Leclercq R.** Antibiogramme. 3^{ème} ed. Paris ESKA 2012 Paris.
- 17.Cruaud P.** Le rôle du biologiste comme consultant en antibiothérapie. *Feuil Biol* 2005 ; 266 : 5-13

- 18.Dat S.** Flore vaginale normale, déséquilibrée, pathologiques, principales infections d'origine exogène. *Feuil Biol* 2009 ; 291 : 9-11.
- 19.Daunizeau A.** Management de la qualité. Processus support. 2013. *Ann Biol Clin*; 70 (Hors série n°1).
- 20.Décret** portant application de la loi N°2009-11 du 23 janvier 2009 relative aux laboratoire d'analyses et de biologie médicale.
- 21.Delmas J, Chacornac JP, Robin F, Giammarinaro P, Talon R, and Bonnet R.** Evaluation of VITEK 2 System with a variety of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* 2008;46(1): 311-3.
- 22.Denis F, Ploy MC, Martin C, Bingen E, Quentin R.** Bactériologie Médicale. Techniques usuelles. Editions Masson ; 2007 Paris.
- 23.Dialma P, Piaulenne S, Baty S, Zeitoun T.** Préanalytique et accréditation : critères d'acceptation des échantillons en LBM multisites. *Ann Biol Clin.* 2013 ; 71(1) : 121-8.
- 24.Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Levy B.** Clinical impact of Rapid in vitro susceptibility Testing and Bacterial Identification. *J Clin Microbiol* 1994 ;32(7):1757-62.
- 25.Doray B.** Le taylorisme, une folie rationnelle. Editions Dunod ; 1981 Paris.
- 26.Dortet L, Poirel, Nordmann p.** Epidémiologie des infections et identification des entérobactéries productrices de carbapénémases. *Feuil Biol* 2013 : 5-16.
- 27.Dumontet, M, Vassault A, Fuss-Olien I, Guitel F, Perrin A, Giroud C et al.** Recommandation pour l'installation de la fonction métrologique et de la documentation correspondante (Document B). *ann Biol Clin* 2004 ; 62 : 479-86.
- 28.Dumontet M.** Mise en œuvre, utilisation et exploitation du contrôle de qualité afin d'assurer la validation analytique, la maîtrise métrologie des instruments d'analyses et la détermination d'incertitude de mesure. *Spec Bio.* 2007 ;157 : 27-36.
- 29.Eloy C.** Diarrhée infectieuse ? Prouvez le ! *Feuil Biol* 2004 ; 261 : 17-18.
- 30.Eloy, C Goudard B, Thouvenin M.** Le préanalytique en microbiologie. *Feuil Biol* 2010 ; 297 : 45-52.
- 31.Emile C.** Les pièges de l'interprétation de l'ECBU. *Opt Bio* 2011 ; 460 : 19-21.
- 32.EUCAST.** Détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Méthodes de diffusion EUCAST en gélose. Version 2.1 Février 2012.
- 33.European Manual of Clinical Microbiology.** 1^{ère} Ed. ESCMID ; 2012 Epernay.
- 34.Fauchère JL, Avril J.L.** Bactériologie générale et médicale. Editions ellipses; 2002 Paris.

35.Feigenbaum AV. Total Quality Control. 3^{ème} Ed. Editions New-York McGraw-Hill ; 1961.

36.Freney F, Renaud F, Hansen W, Bollet C. Précis de bactériologie clinique. Editions ESKA ; 2000. Paris

37.Fruchart A, Canis F, Bissinger MC. Dépistage de la vaginose bactérienne chez les femmes enceintes : intérêt et limites du score de Nugent-Krohn-Hillier. *Feuil Biol* 2012 ; 306 : 39-44.

38.Funke G, Monnet D, Debernadis C, Von Gaevenitz A and Freney J. evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of medically relevant Gram-negative rods. *J Clin Microbiol* 1998;36(7):1948-52.

39.Funke G, Funke-Kissling P.Performance of New VITEK 2 GP Card for Identification of Medically Relevant Gram-Positive cocci in a Routine Clinical Laboratory. *J Clin Microbil* 2005;43 (1) : 84-8.

40.Gallot AM. L'accréditation des laboratoires de biologie médicale, décision inéluctable de la réforme. *Feuil Biol*2011 ; 299 : 53-54.

41.Garcia-Hejl C, Chianéa D, Dedome E, Sanmartin N, Bugier S, Linard C et al Audit interne dans un LBM : quels moyens de maîtrise pour un processus d'audit efficace ? *Ann Biol Clin* 2013 ; 71(5) : 615-24.

41.Gardet V, Vaubourdolle. Présentation et utilité du recueil des exigences spécifiques pour l'accreditation des LBM. *Feuil Biol* 2011 ; 299 : 55-57.

43.GBEA arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale modifié par arrêté du 26 avril 2002.

44.Gogue JM. Les six samuraï de la qualité. Edition Economica ; 1990 Paris.

45.Guez P, Vassault A, Aurignac R, Braconnier F, Dizazzo M, Marion S et al. Questionnaire d'audit interne de qualité dans les LABM des établissements de santé. *Ann Biol Clin* 2002 ; 60 : 111-22.

46.Hadad R, Fredlund H, Unemo M. Evaluation of the new COBAS TaqMan CT test v2.0 and impact on the proportion of new variant Chlamydia trachomatis by the introduction of diagnostics detecting new variant *C. trachomatis* in Orebro county, Sweden. *Sex Transm Infect* 2009;85(3):190-3.

47.Hardy DJ, Hulbert BB, Migneault PC. Time to detection of positive BacT/Alert blood culture and lack of need for routine subculture of 5 to 7 day negative cultures. *J Clin Microbiol* 1992;30(10):2743-5

48.Hohmann C. Guide pratique des 5S pour les managers et les encadrants. Editions d'Organisation ; 2006. Paris

49.**Hu F, Chen S, Xu X, Guo Y, Liu Y, Zhu D et al** Emergence of carbapenem-resistant clinical *Enterobacteriaceae* isolates from a teaching hospital in Shanghai, China. *J Med Microbiol* 2012; 61: 132-136

50.**Ishikawa, K.** La gestion de la qualité, outils et application pratique. Editions Dunod ; 2007. Paris

51.ISO 9000 : 2000. Système de Management de la Qualité Principes essentiels et vocabulaire.

52.ISO 9001 : 2008. Système de management de la qualité. Exigences.

53.ISO 15189 : 2012. Laboratoire de biologie médicale. Exigences concernant la qualité et la compétence 3^{ème} édition.

54.Ison CA, Hay PE. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect* 2002;78:413-5

55.Janvier F, Mbongo-Kama E, Mérens A, Cavallo JD. Les difficultés d'interprétation de l'examen cytobactériologique des urines. *Rev Fr Lab* 2008 ; 406 : 51-59.

56.Jeanne L. prestations de conseils en LBM privé : de la prescription à l'interprétation en passant par le prélèvement, opportunités et contraintes. *Opt Bio* 2011 :24-25.

57.Jeanne L. L'examen direct en bactériologie. *Opt Bio* 2011 ; 464 : 17-19

58.Jeannot K, Plésiat P. Suivi bactériologique de la femme enceinte. *Feuil Biol* 2011 ; 301 :7-12

59.Jehl F, Chomarat M, Weber M, Gérard A. De l'antibiogramme à la prescription. 2^{ème} éd. Editions BioMérieux ; 2003 Marcy L'Etoile.

60.Jimenez L, Rana N, Amalraj J, Walker K and Travers K. Validation of BacT/Alert 3D system for rapid sterility testing of biopharmaceutical samples. *PDA J Pharm* 2012;66(1):38-54.

61.Joffin, J.N., Leyral. G. Microbiologie technique. Dictionnaire des techniques Tome 1. 4^{ème} Ed. Editions Scéren ; 2006 Aquitaine.

62.Joly-Guillou ML, Eveillard M. avantages et limites de l'examen direct en bactériologie. *Rev Fr Lab* 2011 ; 434 : 33-38.

63.Klein JP. Utilisation et exploitation des contrôles qualité en bactériologie. *Spec Bio* 2011; 190 : 54-64.

64.Klein JP. L'accréditation en bactériologie. *Rev Fr Lab* 2011; 436 : 39-50.

65.Klein JP. Accréditation et gestion des ressources humaines : pour une harmonisation des pratiques professionnelles. *Spec Biol* 2012 ; 192 : 29-39.

66.Klein JP. Le poste de sécurité microbiologique : de la réglementation à l'accréditation. *Rev Fr Lab* 2012 ; 445 : 91-100.

67.Klein JP. Prestations de conseils et compte rendus en bactériologie clinique. *Feuil Biol* 2013 ; 310 : 51-59.

68.Klein JP. Le processus post-analytique en bactériologie clinique dans le cadre de l'accréditation. *Rev Fr Lab* 2013; 449 : 25-37.

69.Klein JP. L'accréditation : obstacle ou transparence ? Quel dynamisme engager pour garantir la qualité et la sécurité des soins. *Opt Bio* 2013; 489 : 3-5

70.Klein JP, Hammad M, Garnier JM, Hidri N, Carod JF. Evaluation des points critiques en laboratoire de biologie médicale : l'exemple de bactériologie clinique. *Feuil Biol* 2013; 314 : 45-64

71.Klint M, Hadad R, christerson L, Loré B, Anagrius C, Osterlund A et al. Prevalent trends in Sweden for the new variant of *Chlamydia trachomatis*. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(5):683-9.

72.Larrose C, Le Carrer D. Traitement des non-conformité en pratique quotidienne. *Ann Biol Clin* 2007 ; 65(1) : 99-105.

73.Leblanc RM. Conditions d'acceptation des prélèvements. *Feuil Biol* 2008 ; 281 : 45-49.

74.Leclercq R. L'antibiogramme selon EUCAST : évolution ou révolution ? *Spect Biol* 2011 ; 188 : 26-32

75.Lescat M, Picard, B. Place des *Escherichia coli* enterovirulents dans l'étiologie des diarrhées infectieuses. *Feuil Biol* 2007 ; 274 : 13-19.

76.Logozzi M, Bernini C, Bonora M.G, De Fatima M, Zuliani J. and Fontana R. Evaluation of the VITEK 2 System for the Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of medically Relevant Gram-Positive Cocc. *I Clin Microbiol*2002 ;40(5):1681-6.

77.Loi N°2009-11 relative aux laboratoires d'analyses de biologie médicale. Exposé des motifs.

78.Lunte D. La revue de contrat. *Feuil Biol* 2013; 314 : 41-43

79.Mastronardi C, Perkins H, Derksen P, Denadmirant M and Ramirez-Arcos S. Evaluation of the BacT/Alert 3D system for the implementation of in-house QC sterility testing at Canadian blood service. *Clin Chem Lab Med* 2010;48(8):1179-87.

80.Meyer, A., Deiona, J, Bernard, A. Cours de microbiologie générale. 2^{ème} Editions doin ; 2010 Paris.

81.Microbiology Checklist. CAP Accreditation program. 2013.

82.Modak T, Arora P, Agnes C, Ray R, Goswami S, Ghosh P *et al* *J Infect Dev Ctries* 2011;5(5):353-60.

83.Mohanty S, Sood S, Kapil Arti and Mittal S. Interobserver variation in the interpretation of Nugent scoring method for diagnosis of bacterial vaginosis. *Indian J Med Res* 2010;131:88-91

84.Moller JK, Pedersen LN, and Persson K. Comparison of Abbott RealTime CT New formulation assay with two other commercial assays for detection of wild-type variant strains of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 2010;48(2):440-3.

85.Murray PR, Jo Baron E, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller. Manual of Clinical Microbiology. ASM Press 9th ed. 2007 Washington DC.

86.Nakhjavani FA, Emaneini M, Hosseini H, Iman-Eini. H, Aligholi M, Aligholi M *et al*. Molecular analysis of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea. *Journal of Med Microbiol* 2013; 62: 191-195.

87.Oduyebo O, Afolabi BA, Ogunsola FT, Osuntoki A and Anorlu RI. Correlation of H₂O₂ production of Lactobacillus species with Nugent scores of young Nigerian women. *Brit Microbiol Res J* 2013;3(4):557-63

88.Otter, M. Validation du système informatique d'un laboratoire de biologie médicale. *Feuil Bio* 2013 312 : 53-57.

89.Pangon, B., Peigue-Lafeuille, H. Infection sexuellement transmissibles : examens microbiologiques à faire et à ne pas faire. *Feuil Biol* 2011;303 : 7-13

90.Perrin A, Pernet P. Phase post-analytique. Biologie délocalisée. 2012 *Ann Biol Clin* 70 (Hors série n°1)

91.Philippon A, Arlet G. β -lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! *Ann Biol Clin* 2006 ; 64(1) : 37-51.

92.Philippon A, Arlet G. Entérobactéries et β -lactamines : phénotypes de résistance naturelle. *Pathol Biol* Elsevier Masson 2012.

93.Plantamura E, Huydhe G, Panterne B, Delesalle N, Theopot A, Reverdy ME *et al*.Validation of the bacT/Alert 3D automated culture system for detection of microbial contamination of epithelial cell culture medium. *Cell Tissue Bank.* 2012;13(3):453-9.

94.Pouget M. Taylor et le taylorisme. 1^{ère} Ed. Editions PUF ; 1998.

95.QUAMIC. Comité qualité de la Société Française de Microbiologie. 2013.

96.Quesada MD, Gimenez M, Molinos S, Fernandez G, Sanchez MD, Rivelor *et al*. Performance of VITEK 2 Compact and Overnight Microscan panel for direct identification and susceptibility testing of Gram-negative bacilli from positive FAN BacT/Alert blood culture. *Clin Microbiol Inf* 2009;16(2):137-140.

97.Ray D. Mesurer et développer la satisfaction clients. 3^{ème} Ed. Editions d'Organisation ; 2002. Paris

98.Rémic. Référentiel en microbiologie médicale. Société française de microbiologie 2010. Paris

99.Riedel S, Junkins A, Stamper PD, Cress G, Widness JA, and Doern GV. Comparison of the Bactec 9240 and BacT/Alert blood culture systems for evaluation of placental cord blood for transfusion in neonates. *J Clin Microbiol* 2009 ; 47(6):1645-9.

100.Riegel P, Archambaud M, Clavé D, Vergnaud M. Bactéries de culture et d'identification difficile. Editions Biomérieux ; 2006 Marcy L'Etoile..

101.Ros, A., Carricajo, A. Utilisation en routine du système d'identification bactérienne par spectroscopie de Masse par MALDI-TOF. *Spectra Bio* 2011 188 : 34-40.

102.SH INF 50 Portées-types d'accréditation. Révision mai 2011.

103.SH GTA 01. Guide technique d'accréditation en biologie médicale Révision 00 Mai 2041.

104.SH GTA 02. Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des systèmes informatiques en biologie médicale. Révision 00.

105.SH GTA 04. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. Révision 00 avril 2011.

106.SH GTA 06. Guide technique d'accréditation contrôle de qualité en biologie médicale. Révision 00.

107.SH REF 02. Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme ISO 15189 : 2012 révision 04.

108.SH REF 08. Expression et évaluation des portées d'accréditation. Révision 01.

109.Sha BE, Chen HY, Wang QJ, Zariffard MR, Cohen and Cohen GT. Utility of Amsel criteria, Nugent score and quantitative PCR for *G. vaginalis*, *M. hominis* and *Lactobacillus* spp. Diagnosis of bacterial vaginosis in human immunodeficiency virus-infected women. *J Clin Microbiol* 2005 Sep;43(9):4607-12.

110.Shewhart, W.A. Les fondements de la maîtrise de la qualité. Editions Economica Paris ; 1989.

111.Simth JA, Bryce EA, Ngu-Yen JH and Roberts FJ. comparison of BACTEC 9240 and BacT/Alert Blood Culture Systems in an Adult Hospital. *J Clin Microbiol* 1995 ;1905-8.

112.Simonet C. quelques règles à propos du transport par route des échantillons biologiques. *Ann Biol Clin* 2000 ; 58 :111-7.

113.**Suiro A.** Accueil au laboratoire : confidentialité vis-à-vis des patients, des autres professionnels de santé, des intervenants hors personnel médical. *Feuil Biol* 2008 ; 281 : 41-43.

114.**Szymanowicz A.** Bilan annuel du correspondant de réactovigilance. *Spec Bio* 2009 ;175 : 59-64.

115.**Szymanowicz A.** démarche et outils pour la maîtrise de la phase préanalytique norme en 15189/22870. *Feuil Biol* 2010 ; 292 : 13-24.

116.**Szymanowicz A, Vassaut A.** Phase préanalytique. Phase analytique. 2010 *Ann Biol Clin*, 68 (Hors série n°1).

117.**Szymanowicz A.** Interprétation optimisée et utilisation pertinente de l'évaluation externe de la qualité. *Feuil. Bio* 2010 294 : 63-72.

118.**Szymanowicz, A.** Propositions pour une gestion optimisée des examens de biologie à réaliser en situation médicale urgente. *Feuil Biol* 2012; 306 : 47-52.

119.**Vanmassenhove B, Persijn L, Alliet G.** Validation of COBAS TaqMan CT test v2.0 on the rotor Gene Q platform. *Abst 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 31-03-2012 – 03-04-2012.

120.**Vassaut A.** conduite à tenir en cas de résultats d'EEQ non conformes. *Feuil Bio* 2013 313 : 35-38

121.**Vassaut A.** conduite à tenir en cas de résultats CIQ non conformes. *Feuil Bio* 2013 312 : 49-51.

122.**Védy S.** Vérification sur site en microbiologie : exemple du BacT/Alert 3D (Biomérieux). *Ann Biol Clin*2013 ; 71 (3) : 353-61.